

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Estudo taxonômico e evolutivo em populações de  
*Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*  
(Diptera; Drosophilidae)

André Luiz Henriques Esguícero

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte  
das exigências para a obtenção do título de Mestre em  
Ciências, Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO - SP  
2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Estudo taxonômico e evolutivo em populações de  
*Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*  
(Diptera; Drosophilidae)

Pós-Graduando: André Luiz Henriques Esguícero

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maura Helena Manfrin

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte  
das exigências para a obtenção do título de Mestre em  
Ciências, Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO - SP  
2006

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Esguícero, André Luiz Henriques

Estudo taxonômico e evolutivo em populações de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae).

Ribeirão Preto, 2006.

047p.: il.; 30cm

Tese, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP – Departamento de Biologia.

Orientador: Manfrin, Maura Helena

1. “cluster” *buzzatii*
2. Morfologia da Asa
3. Taxonomia

**DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS PAIS**

## Agradecimentos

- À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maura Helena Manfrin, pela orientação, apoio, disponibilidade e colaboração nas diferentes etapas desta dissertação.
- Ao Prof. Dr. Fábio de Melo Sene, pela ajuda e pelas oportunas sugestões ao longo deste trabalho.
- Ao Paulo Roberto Epifânio, pela ajuda técnica e amizade durante esses anos.
- Aos funcionários do Bloco A, pela amizade e ajuda sempre que preciso.
- A todos os amigos do laboratório de Genética Evolutiva de *Drosophila* da América do Sul, Adriana, Ângelo, Camila, Cíntia, Érica, Fernando, Gabriela, Juliana, Luís, Manami, e tantos outros que já passaram por aqui.
- À minha namorada Janaina Fernandes da Silva, pela paciência, companhia e amor.
- Ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada.
- À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.
- À CAPES, FINEP, FAPESP, CNPq, e USP, cujas verbas mantêm o Laboratório de Genética Evolutiva de *Drosophila*.
- Ao Prof. Dr. Jonh C. MacNamara, Coordenador da Pós-graduação em Biologia Comparada.
- À Renata Andrade Cavalari, secretária da Pós-graduação em Biologia Comparada, pela gentileza e prontidão.
- A todos que, direta ou indiretamente, me auxiliaram durante a execução deste trabalho.

## Resumo

Esguícero, A.L.H. **Estudo taxonômico e evolutivo em populações de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae)**. 2006, 047p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

A análise de caracteres morfológicos de insetos tem sido muito útil em estudos taxonômicos e sistemáticos. A diferenciação populacional e sistemática do “cluster” *buzzatii*, composto por sete espécies crípticas naturalmente endêmicas da América do Sul, vêm sendo analisada com o auxílio de informações provenientes de trabalhos envolvendo isolamento reprodutivo, marcadores morfológicos e marcadores moleculares. Como essas espécies são cactofílicas, suas ocorrências acompanham a distribuição dos cactos na América do Sul. Populações das espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, pertencentes ao “cluster” *buzzatii*, foram analisadas com auxílio de diversos marcadores, e como resultado desses trabalhos, populações das regiões litorâneas dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul foram descritas como pertencentes a uma zona de contato entre estas espécies. Além disso, a espécie *Drosophila serido*, ao contrário da espécie *Drosophila antonietae*, apresentou grande variação interpopulacional para todos os marcadores estudados. No presente trabalho, as variações inter e intraespecíficas da morfologia da asa foram analisados em amostras de populações das espécies *Drosophila antonietae*, *Drosophila serido* e populações presentes na zona de contato descrita para estas espécies. O objetivo deste trabalho foi: caracterizar populações das espécies *Drosophila antonietae* e *Drosophila serido* através da morfologia da asa, para acrescentar informações sobre a história evolutiva destas espécies e das populações da zona de contato descrita para elas nas regiões litorâneas dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Para tanto, os dados referentes às medidas morfométricas, obtidas com auxílio do método da elipse, foram analisados utilizando a análise dos componentes principais, análise discriminante “stepwise” e análise de agrupamento Neighbor-Joining. Com base nos resultados obtidos na análise da morfologia da asa foi possível discriminar as espécies *Drosophila antonietae* e *Drosophila serido*. Os resultados obtidos confirmaram a existência de uma significativa divergência intraespecífica em *Drosophila serido*. Em *Drosophila antonietae*, ao contrário dos resultados obtidos anteriormente a partir de outros marcadores, foi observada variação intraespecífica significativa. Os resultados também caracterizaram as populações da zona de contato como populações distintas, sendo que, das quatro populações aqui analisadas, três apresentaram morfologia da asa mais semelhante a da espécie *Drosophila antonietae*, e uma população, localizada mais ao norte da zona de contato, apresentou morfologia da asa mais semelhante a da espécie *Drosophila serido*.

Palavras-chave: “cluster” *buzzatii*, morfologia da asa, taxonomia.

## Abstract

Esguícero, A.L.H. **Taxonomic and evolutionary studies in *Drosophila serido* and *Drosophila antonietae* populations (Diptera; Drosophilidae)**. 2006, 047p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

The analysis of insect morphological traits has been very useful in systematics and taxonomics studies, being the wing's morphology one of the markers used on these studies. The population differentiation and systematics of the *Drosophila buzzatii* cluster, composed of seven sibling species, endemic of South America, has been analyzed based on informations of works involving reproductive isolation, morphological and molecular markers. Due to the fact that these species are cactophilic, their occurrence is determined by the cacti distribution in the South America. The populations of *Drosophila serido* and *Drosophila antonietae* species, both belonging to the *Drosophila buzzatii* cluster, were analyzed with different kind of markers, and the results of these works, suggests that the coast regions of Santa Catarina and Rio Grande do Sul states belonging to a secondary contact zone between these two species. Beyond this, the *Drosophila serido* species, different of *Drosophila antonietae* species, show a great intraspecific variation to all the marks studied. In the present work, the inter and intraspecific variation of wing's morphology were analyzed in a sample of *Drosophila serido* and *Drosophila antonietae* populations, including populations pertaining to the contact zone described to these species. The aim of this work was: characterize populations of *Drosophila serido* and *Drosophila antonietae* species with the wing's morphology, to add information about the evolutionary history of these species and of the populations pertaining to the contact zone described to them at the coast regions of Santa Catarina and Rio Grande do Sul states. For this, the morphological measurements of the wings, obtained with the ellipse method, were analyzed using the principal components analysis, stepwise discriminant analysis and the cluster analysis Neighbor-Joining. Based on the results obtained for the wing's morphology analysis, was possible discriminate the *Drosophila serido* and *Drosophila antonietae* species. The results obtained confirm the existence of a significant intraspecific divergence in *Drosophila serido* species. In *Drosophila antonietae* species, disagreeing of the results obtained previously with the analysis of other markers, was observed a significant intraspecific variation. The results characterized the contact zone populations as distinct populations, were three populations shows wing's morphology similar to the morphology of *Drosophila antonietae* species, and one population shows the wing's morphology more similar to the morphology of *Drosophila serido* species.

Key words: *Drosophila buzzatii* cluster, wing's morphology, taxonomy.

# Índice

<b>I - Introdução</b> .....	<b>01</b>
- Gênero <i>Drosophila</i> , grupo <i>repleta</i> , “cluster” <i>buzzatii</i> .....	<b>01</b>
- <i>Drosophila serido</i> .....	<b>03</b>
- <i>Drosophila antonietae</i> .....	<b>05</b>
- Áreas de Contato entre <i>Drosophila serido</i> e <i>Drosophila antonietae</i> .....	<b>06</b>
- Morfologia da Asa .....	<b>07</b>
<b>II - Objetivos</b> .....	<b>09</b>
- Objetivos Gerais .....	<b>09</b>
- Objetivos Específicos .....	<b>09</b>
<b>III - Material e Métodos</b> .....	<b>10</b>
- Material Biológico .....	<b>10</b>
- Preparação das Asas .....	<b>10</b>
- Análises Morfométricas .....	<b>11</b>
- Obtenção das Medidas .....	<b>12</b>
- Análises Estatísticas .....	<b>13</b>
<b>IV - Resultados</b> .....	<b>15</b>
- Variação interpopulacional em <i>Drosophila serido</i> .....	<b>15</b>
- Variação interpopulacional em <i>Drosophila antonietae</i> .....	<b>18</b>
- Variação morfológica entre as espécies <i>Drosophila serido</i> e <i>Drosophila antonietae</i> .....	<b>21</b>
- Variação interpopulacional na zona de contato .....	<b>23</b>
<b>V - Discussão e Conclusões</b> .....	<b>26</b>
<b>VI - Bibliografia</b> .....	<b>33</b>



## I - Introdução

Ocasionalmente, ao se estudar um grupo de organismos, são encontradas populações que, à primeira vista, aparentam pertencer a uma única espécie do ponto de vista morfológico, mas que na verdade são populações naturais, morfológicamente semelhantes ou idênticas, mas reprodutivamente isoladas (Mayr, 1977). Devido a essa grande semelhança morfológica, as espécies crípticas representam um grande problema para os taxonomistas, pois, entre outros motivos, levam a uma subestimação da biodiversidade e não permitem uma clara delimitação dos grupos naturais de indivíduos como espécies bem estabelecidas. Contudo, a utilização de análises morfométricas em diferentes estruturas morfológicas tem fornecido variáveis quantitativas que, por sua vez, têm permitido uma clara discriminação entre essas espécies e entre suas populações (Adams e Funk, 1996; Ayala, 1965; Mather e Dobzhansky, 1939; Miller e Sanger, 1969; Moraes et al., 2004b; Tidon-Sklorz e Sene, 1995).

### - Gênero *Drosophila*, grupo *repleta*, “cluster” *buzzatii*:

As moscas do gênero *Drosophila* vêm sendo utilizadas em experimentos laboratoriais há mais de um século (Allen, 1975), essa extensa utilização deve-se principalmente às suas características biológicas, praticidade na utilização em experimentos laboratoriais e a quantidade de informações genéticas, ecológicas e filogenéticas acumuladas durante todos esses anos.

Um dos grupos com maior número de espécies e de maior interesse dentro do subgênero *Drosophila* (gênero *Drosophila*) é o grupo *repleta*, sendo que a maioria das espécies pertencentes a este grupo ovipositam em cladódios em decomposição de várias espécies da família Cactacea, e são dependentes desses tecidos em decomposição pelo menos durante o estágio larval (Pereira *et al.*, 1983; Vilela, 1983; Wasserman, 1992).

Entre os agrupamentos de espécies cactófilas do grupo *repleta*, o “cluster” *buzzatii* (Manfrin e Sene, 2006) é composto atualmente por sete espécies nominais, naturalmente endêmicas da América do Sul: *Drosophila serido*, *Drosophila borborema* (Vilela e Sene, 1977), *Drosophila seriema* (Tidon-Sklorz e Sene, 1995), *Drosophila gouveai*, *Drosophila antonietae* (Tidon-Sklorz e Sene, 2001), *Drosophila koepferae* (Fontdevila *et al.*, 1988) e *Drosophila buzzatii* (Patterson e Wheeler, 1942), sendo a genitália masculina a principal característica discriminante entre elas. Devido à associação das espécies deste “cluster” com as cactáceas, as suas populações apresentam uma distribuição geográfica que acompanha as

áreas de ocorrência dos cactos, sendo encontradas nas regiões nordeste, centro-oeste, sul e sudeste do Brasil e no Domínio Chaquenho.

Também em decorrência desta especificidade ecológica, as hipóteses de diversificação e estruturas populacionais descritas para este grupo, sugerem processos relacionados aos eventos não sincrônicos de expansão e retração das formações vegetais abertas e fechadas da América do Sul (Sene *et al.*, 1982; Manfrin e Sene, 2006), que provavelmente ocorreram do Plioceno Superior para o Pleistoceno, quando se sucederam períodos de expansão de formações vegetais diretamente associadas ao clima quente e úmido, característico nas fases interglaciais, e associadas ao clima seco e relativamente frio, característico nas fases glaciais (Ab'Saber, 1977; Sene *et al.*, 1982; Vanzolini, 1981). Alguns trabalhos e comparações com a distribuição de outros grupos de insetos têm indicado eventos de fragmentação e vicariância pré-quartenários no processo de diversificação do “cluster” *buzzatii* (Manfrin *et al.*, 2001; de Brito *et al.*, 2002a).

As relações filogenéticas para o “cluster” são definidas, principalmente, com base em inversões cromossômicas (Ruiz e Wasserman, 1993; Ruiz *et al.*, 2000) e seqüências de DNA mitocondrial (Manfrin *et al.*, 2001). Estes dados sugerem que este “cluster” é formado por quatro linhagens filéticas. Uma compreende a espécie *Drosophila buzzatii*, e a segunda a espécie *Drosophila koepferae*, sendo estas duas simpátricas no Domínio Chaquenho. A terceira linhagem compreende a espécie *Drosophila antonietae*, cuja distribuição geográfica está restrita à região formada pela baía do rio Paraná-Paraguai. A quarta linhagem é formada pelas espécies *Drosophila serido*, *Drosophila seriema*, *Drosophila gouveai* e *Drosophila borborema*, que ocorrem no litoral, na região nordeste e central do Brasil. As análises filogenéticas não definem as relações de parentesco dentro desta linhagem, apesar dos vários caracteres diagnósticos descritos para estas espécies (Moraes *et al.*, 2004b; Franco *et al.*, 2006; Esguícero e Manfrin, 2005); isso pode ser devido ao fato dessas espécies terem uma origem recente ou uma origem antiga com ocorrência de eventos de hibridização (Manfrin *et al.*, 2001; de Brito *et al.*, 2002b).

As análises intraespecíficas desenvolvidas para este grupo, com diferentes marcadores, mostram pouca estruturação populacional com fluxo gênico restrito pela distância em algumas espécies (Mateus e Sene, 2003; Machado, 2003; Morales, 2005), ausência de estrutura em outras (de Brito *et al.*, 2002b), expansão de área de ocorrência, com eventos de contato secundário com introgressão (Manfrin *et al.*, 2001), e simpatria (Morales, 2005; Ruiz *et al.*, 2000), especialmente entre populações limítrofes da distribuição das espécies, politipia

(Baimai *et al.*, 1983) e assimetria interpopulacional em experimentos de acasalamentos (Madi-Ravazzi *et al.*, 1996). Existe uma variação para a ocorrência desses eventos que depende da espécie e da origem geográfica das populações que estão sendo analisadas.

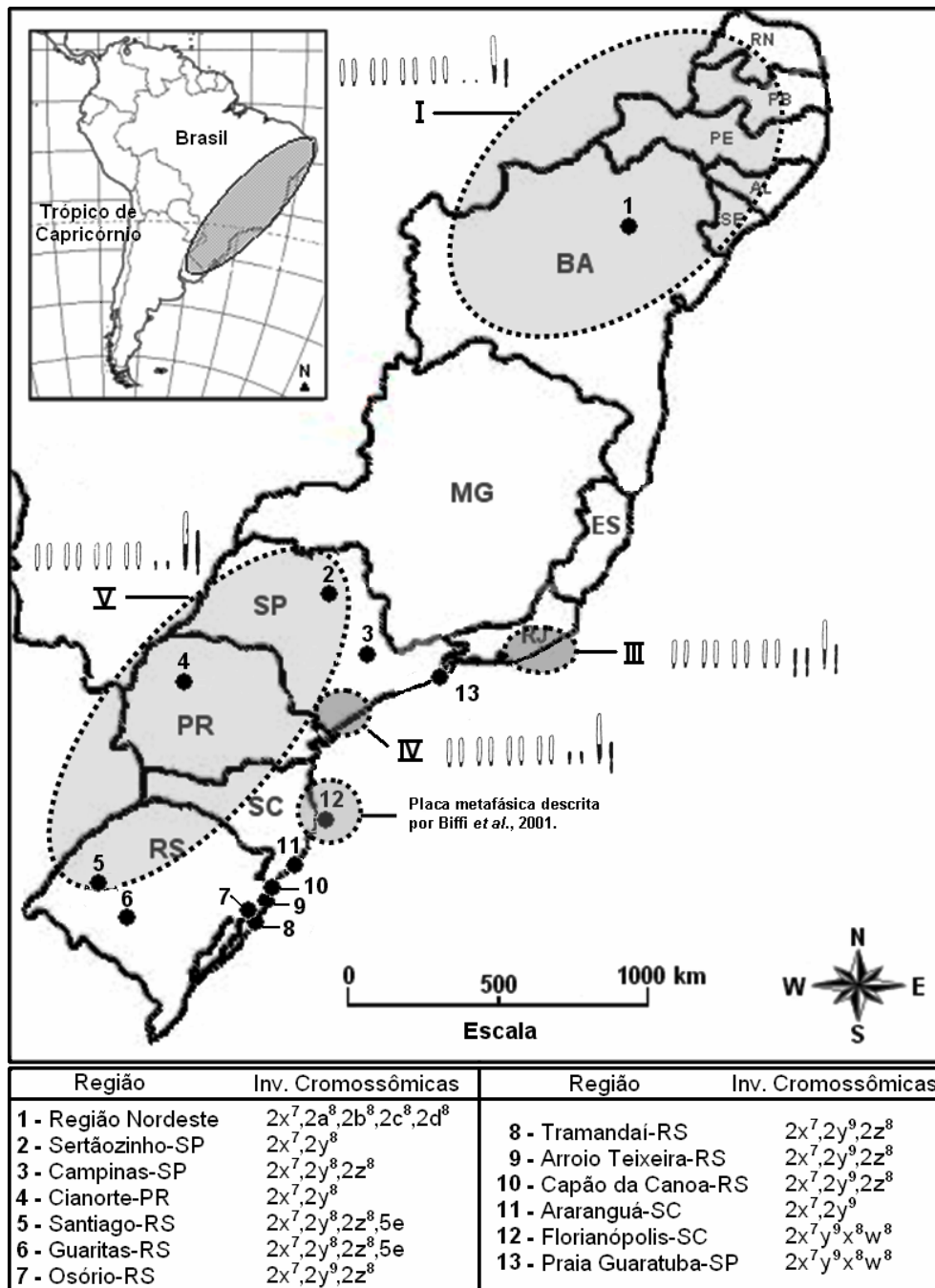
### **- *Drosophila serido*:**

Em 1977, Vilela e Sene descreveram duas espécies de *Drosophila* a partir de uma amostra coletada em Milagres no estado da Bahia. Essas espécies foram facilmente distinguidas pela genitália masculina e denominadas *Drosophila borborema* e *Drosophila serido*. A espécie *Drosophila serido* foi coletada em várias localidades, situadas em diversos estados brasileiros, sendo a localidade de Milagres – BA considerada como “localidade-tipo” da espécie (Vilela e Sene, 1977).

As populações de *Drosophila serido* são caracterizadas como morfotipo A de edeago e apresentam uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo no nordeste do Brasil e ao longo da Costa Atlântica até o estado de Santa Catarina. Todas estas populações estão associadas a diferentes gêneros e espécies de cactos, tais como: *Cephalocereus piauhyensis* (Paulo Afonso-BA), *Cereus sp.*(Arraial do Cabo-RJ e Barra de São João-RJ) e *Cereus fernambucensis* (Peruíbe-SP) (Pereira *et al.*, 1983). As suas populações apresentam a inversão cromossômica fixa  $2x^7$  e, baseado em dados de inversões cromossômicas polimórficas (Figura 1; Ruiz *et al.*, 2000), cromossomos metafásicos (Figura 1; Baimai *et al.*, 1983) e haplótipos mitocondriais (de Brito *et al.*, 2002a, Manfrin *et al.*, 2001), essa espécie é caracterizada por apresentar uma forte estrutura populacional, sendo que suas populações podem ser facilmente divididas em dois grupos bem definidos e separados. Um deles é formado por populações do interior do nordeste, as quais apresentam placa metafásica tipo I e inversões cromossômicas polimórficas  $2a^8$ ,  $2b^8$ ,  $2c^8$  e  $2d^8$ . O outro é formado por populações do litoral do Brasil, as quais apresentam as inversões cromossômicas polimórficas  $2y^9$ ,  $2x^8$  e  $2w^8$ , sendo que as inversões  $2x^8$  e  $2w^8$  ocorreram sobre a inversão  $2y^9$  (Figura 1; Ruiz *et al.*, 2000). Neste grupo de populações foram encontradas três tipos de placas metafásicas: a placa metafásica tipo III, encontrada em Arraial do Cabo – RJ; a placa metafásica tipo IV, encontrada em Perúíbe – SP (Baimai *et al.*, 1983); e um terceiro tipo de placa metafásica que foi diagnosticado em Florianópolis-SC (Biffi *et al.*, 2001) (Figura 1).

O arranjo cromossômico  $2x^7y^9$  foi encontrado nas populações de Osório – RS, Tramandaí – RS, Arroio Teixeira – RS, Capão da Canoa – RS e Araranguá – SC, e o arranjo

cromossômico  $2x^7y^9x^8w^8$  foi encontrado nas populações de Florianópolis – SC e Guaratuba – SP (Ruiz *et al.*, 2000).



**Figura 1:** Posição aproximada das regiões onde *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* foram amostradas por Ruiz *et al.* (2000), Baimai *et al.* (1983) e Biffi *et al.* (2001). As elipses pontilhadas abrangem as localidades analisadas por Baimai *et al.* (1983) e Biffi *et al.* (2001) onde foram descritas as placas metafásicas referentes a *Drosophila serido* (I- Região Nordeste; III- Arraial do Cabo-RJ; IV- Peruíbe-SP; e placa metafásica descrita na localidade de Florianópolis-SC) e *Drosophila antonietae* (V- Região Sudeste-Sul).

Com base em sua distribuição geográfica foram propostas duas hipóteses para a ocorrência dessa espécie no nordeste e ao longo da costa atlântica brasileira (De Brito *et al.*, 2002a): a primeira infere que as populações teriam expandido suas áreas de ocorrência do

nordeste em direção ao sul pelo litoral e, devido a eventos vicariantes, teriam se tornado populações isoladas e diferenciadas; uma segunda hipótese considera a possibilidade de eventos independentes de colonização da costa atlântica brasileira, a partir de populações localizadas no interior do continente, por um corredor de dispersão formado pelos vales dos rios que conectam o interior do continente à costa litorânea (Manfrin e Sene, 2006).

As populações do nordeste de *Drosophila serido* são homogêneas para a maioria dos marcadores utilizados até o momento (Baimai *et al.*, 1983; Ruiz *et al.*, 2000; Morales, 2005; Silva e Sene, 1991). Porém, as populações dessa espécie ao longo da costa atlântica brasileira apresentam uma complexidade evolutiva sugerida pela não congruência e politipia observada em diversos marcadores analisados (Baimai *et al.*, 1983; Esguícero e Manfrin, 2005; Ruiz *et al.*, 2000; Morales, 2005).

A análise da variabilidade haplotípica mitocondrial, que permite a inferência de eventos históricos e recorrentes ocorridos em uma espécie, dividiu as populações de *Drosophila serido* da costa atlântica brasileira em dois grupos (Manfrin e Sene, 2006; Morales, 2005). O primeiro abrange as populações do estado de São Paulo até o Nordeste, sendo sugerido fluxo gênico entre as populações do estado de São Paulo e Rio de Janeiro, mas não entre essas populações e as populações de Mucuri – BA. O segundo é formado pelas populações de *Drosophila serido* da caatinga do interior da Bahia e pelas populações do litoral de Santa Catarina, que compartilham haplótipos com a população de Milagres - BA. Neste trabalho, os principais fatores apontados para explicar a dinâmica evolutiva nesta espécie foram as expansões de área das populações do interior da Bahia em direção ao litoral e entre as populações do grupo do litoral, seguidas de fluxo gênico restrito, devido a isolamento por distância. As divisões populacionais coincidem com a divisão da costa em macrocompartimentos geológicos, sugerindo eventos de isolamento geográfico na diferenciação de suas populações.

### **- *Drosophila antonietae*.**

Em 2001, as populações antes classificadas como “*Drosophila serido* morfotipo D” (Silva e Sene, 1991) foram descritas como *Drosophila antonietae*, uma reverência a drosophilista Maria Antonieta Milani de Moraes (Tidon-Sklorz e Sene, 2001).

As populações de *Drosophila antonietae* ocorrem em ambientes situados na bacia do rio Paraná, no sudeste da América do Sul, e na costa da região sul do Brasil (Manfrin e Sene,

2006). Representantes desta espécie foram coletados nas regiões sul e sudeste do Brasil e na região norte da borda leste do Chaco Argentino. Suas populações estão associadas principalmente ao cacto *Cereus hildmaniannus*, e ocasionalmente ao cacto *Opuntia monacantha* (Monteiro e Sene, 1995). As informações de marcadores independentes sugerem a existência de fluxo gênico entre as populações desta espécie (Machado, 2003; Mateus e Sene, 2003; Monteiro e Sene, 1995), segundo esses autores, o fato dessas populações estarem associadas ao cacto *Cereus hildmaniannus*, que está distribuído principalmente ao longo do curso dos rios, possibilitaria a existência de fluxo gênico entre as populações de *Drosophila antonietae*, e tornaria difícil um processo de diferenciação entre elas (Machado, 2003; Mateus e Sene, 2003; Monteiro e Sene, 1995; Tidon-Sklorz e Sene, 2001).

Assim como as populações de *Drosophila serido*, as populações de *Drosophila antonietae* apresentam a inversão cromossômica fixa  $2x^7$  (Ruiz et al., 2000; Tidon-Sklorz e Sene, 2001). Elas apresentam também as inversões cromossômicas polimórficas  $2y^8$ ,  $2z^8$ , e  $5e$  (Figura1). O arranjo cromossômico  $2x^7y^8$  foi encontrado nas populações de Sertãozinho – SP, Campinas – SP, Rio Ligeiro – PR, Santiago – RS e Guaritas – RS, sendo que nessas duas últimas localidades também foi observada a ocorrência da inversão  $5e$ , e o arranjo cromossômico  $2x^7z^8$  foi encontrado nas populações de Campinas – SP, Santiago – RS, Guaritas – RS, Osório – RS, Tramandaí – RS, Arroio Teixeira – RS e Capão da Canoa – RS (Ruiz et al., 2000). Todas as populações analisadas até o momento apresentam placa metafásica Tipo V (Figura1) (Tidon-Sklorz e Sene, 2001; Baimai, 1983).

A análise da diversidade haplotípica mitocondrial do gene Citocromo Oxidase I (De Brito et al., 2002a) sugeriu a divisão das populações da espécie *Drosophila antonietae* em dois grupos: um formado por populações da área norte de distribuição da espécie e outro formado por populações da área sul, que incluiria o interior e a costa do estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Além disso, essa análise sugeriu uma expansão de área de ocorrência das populações do interior do estado do Rio Grande do Sul em direção à costa Atlântica brasileira, e colonizando o litoral do estado do Rio Grande do Sul, expandindo a área de ocorrência em direção ao norte, no litoral do estado de Santa Catarina (de Brito et al., 2002a), seguindo as populações de cactos pelas dunas desses dois estados brasileiros.

### **- Áreas de Contato entre *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*:**

Análises de inversões cromossômicas polimórficas (Figura 1) (Ruiz et al., 2000), de haplótipos mitocondriais e aloenzimas (Morales et al., 2004), e da morfologia do edeago

(Monteiro *et al.*, 1996), realizadas em populações presentes na região litorânea sul do Brasil, caracterizaram as localidades de Florianópolis – SC, Arroio Teixeira – RS, Capão da Canoa – RS, Osório – RS e Tramandaí – RS como pertencentes a uma zona de contato entre as populações das espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, entretanto não foram encontrados indivíduos híbridos em nenhuma das análises.

Nas populações das localidades que formam essa zona de contato não existe uma concordância total entre as informações obtidas pelos marcadores utilizados, por exemplo, a ocorrência conjunta dos arranjos cromossômicos  $2x^7y^9$  (*Drosophila serido*) e  $2x^7z^8$  (*Drosophila antonietae*) (Ruiz *et al.*, 2000), caracterizou as localidades de Arroio Teixeira – RS, Capão da Canoa – RS, Osório – RS e Tramandaí – RS como uma zona de simpatria entre essas espécies. A análise do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I compôs a zona de contato pelas localidades de Governador Celso Ramos-SC, Praia da Joaquina-SC, Garopaba-SC, e Arroio Teixeira-RS (Morales, 2005). Já a análise aloenzimática restringiu essa zona de simpatria à localidade de Florianópolis – SC (Morales *et al.*, 2004), sendo que só foram observados indivíduos homozigotos para os alelos que caracterizam cada espécie.

A complexidade envolvida na dinâmica evolutiva das populações destas duas espécies do “cluster” *buzzatii* ao longo da costa litorânea brasileira é evidente. As informações disponíveis até o momento mostram expansão de área de ocorrência, isolamento geográfico com diferenciação genética, e simpatria (Manfrin e Sene, 2006). Entretanto, ainda são necessários vários estudos para a determinação e elucidação dos processos envolvidos na história evolutiva das populações destas duas espécies de *Drosophila*.

### **- Morfologia da Asa.**

A morfologia da asa tem tido grande importância para entomologistas interessados em sistemática, sendo que a análise da morfologia da asa de insetos pode revelar informações importantes sobre a história evolutiva da espécie em estudo (Wootton, 1990, 1992). A classificação dos insetos, especialmente dípteros, se baseia muitas vezes nas diferenças morfológicas da asa, incluindo os padrões formados por veias longitudinais e transversais. Como alguns entomologistas acreditam que os padrões observados nas veias das asas dos insetos podem ter derivado de um único ancestral comum (Ross, 1965; Snodgrass, 1993), as comparações dos padrões das veias alares são importantes em estudos sistemáticos e de biologia evolutiva.

A análise de caracteres morfológicos de insetos tem sido muito útil na distinção e classificação de espécies proximamente relacionadas (Moraes et al., 2004b; Miller e Sanger, 1969; Mather e Dobzhansky, 1939; Tidon-Sklorz e Sene, 1995; Ayala, 1965; Vilela, 1983), sendo a morfologia da asa um dos marcadores utilizados nesses estudos.

Em geral, as asas dos insetos são estruturas bidimensionais caracterizadas pela presença de pontos de referência bem definidos, os quais permitem uma abordagem morfométrica eficiente. Devido a essas características, a análise morfométrica desses caracteres tem sido muito utilizada na distinção entre táxons proximamente relacionados (Ansorge, 1994; Diniz-Filho e Malaspina, 1995), discriminação de espécies crípticas (Moraes et al., 2004a, 2004b) e diferenciação entre grupos geográficos, detectando diferenças em uma única espécie por toda a sua distribuição intercontinental (Hass e Tolley, 1998; Moraes e Sene, 2004). Além disso, vários estudos têm demonstrado que a morfologia da asa de *Drosophila* é um alvo da seleção natural, e que pode ser considerada um material apropriado para estudos de evolução morfológica (Coyne e Beecham, 1987; David et al., 1977; Hoffmann e Shirriffs, 2002; Prevosti, 1955; Weber et al., 1999, 2001).

O estudo da morfologia da asa no “cluster” *buzzatii* (Moraes et al., 2004b) demonstrou que existe divergência morfológica entre as espécies que compõem esse táxon, sugerindo que a morfologia da asa pode ser utilizada como um marcador taxonômico para estas espécies. As relações fenéticas obtidas neste estudo são semelhantes a relações filogenéticas, baseadas em marcadores genéticos, obtidas em estudos anteriores, demonstrando o valor da análise da morfologia da asa no estudo das relações existentes entre as espécies e entre as populações das espécies desse “cluster”. Neste taxon, a morfologia da asa não se mostrou eficiente somente quanto à discriminação interespecífica, mas também quanto a discriminação interpopulacional, usando como modelo a espécie *Drosophila gouveai* (Moraes e Sene, 2004).



## II - Objetivos

### - Objetivos Gerais.

O presente projeto tem por objetivo caracterizar populações das espécies *Drosophila antonietae* e *Drosophila serido* através da morfologia da asa, para acrescentar informações sobre a história evolutiva destas espécies e das populações da zona de contato descrita para elas nas regiões litorâneas dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

### - Objetivos Específicos.

1 - caracterizar populações de *Drosophila antonietae* e *Drosophila serido*, através da morfologia da asa, verificando a variação interespecífica dessa estrutura;

2 - determinar as relações interpopulacionais nestas espécies com base na variação morfológica;

3 - caracterizar as populações do litoral sul do Brasil, pertencentes a uma zona de contato entre as espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*.

### III - Material e Métodos

#### - Material Biológico.

Foram analisadas as asas direitas de 270 indivíduos machos, provenientes de dez localidades caracterizadas pela ocorrência da espécie *Drosophila serido*, cinco localidades caracterizadas pela ocorrência da espécie *Drosophila antonietae* e quatro localidades pertencentes a zona de contato secundária descrita para essas duas espécies (Tabela 1) (Figura 2). Todo o material biológico foi coletado na natureza, e encontrava-se armazenado no Laboratório de Genética Evolutiva da Universidade de São Paulo Campus Ribeirão Preto.

**Tabela 1:** Localidade de procedência e número de indivíduos analisados de populações das espécies *Drosophila serido*, *Drosophila antonietae*, e de populações presentes na zona de contato.

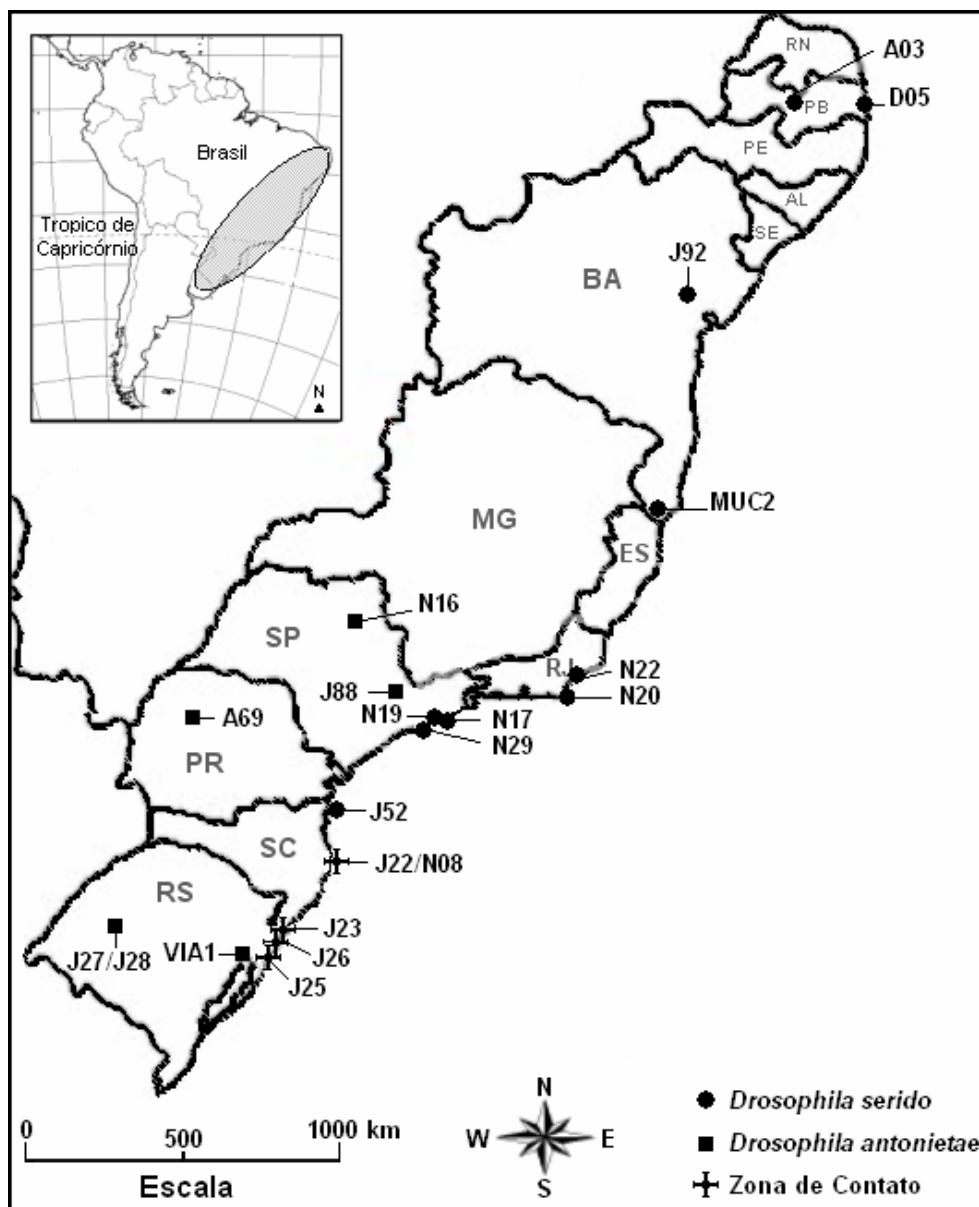
Espécie	Código*	Localidade	Coordenadas Geográficas	Data da Coleta	Nº de Indivíduos
<i>Drosophila serido</i>	A03	Junco do Seridó-PB	( 07° 00' S, 36° 46' W )	23 . IV . 1976	10
	D05	Cabedelo-PB	( 07° 00' S, 37° 50' W )	27 . IIX . 1983	10
	J92	Milagres-BA	( 12° 51' S, 39° 53' W )	23 . III . 2002	10
	MUC2	Mucuri-BA	( 18° 05' S, 39° 32' W )	--- VII . 2003	10
	N22	Macaé-RJ	( 22° 26' S, 41° 50' W )	24 . III . 2004	10
	N20	Arraial do Cabo-RJ	( 22° 58' S, 42° 00' W )	24 . III . 2004	10
	N17	São Sebastião-SP (CEBIMAR-USP)	( 23° 49' S, 45° 25' W )	09 . X . 2003	10
	N19	São Sebastião-SP (Praia de Paúba)	( 23° 48' S, 45° 33' W )	09 . X . 2003	10
	N29	São Sebastião-SP (Praia da Juréia)	( 23° 45' S, 45° 47' W )	29 . V . 2005	10
	J52	Penha-SC	( 26° 15' S, 48° 31' W )	27 . III . 2002	10
<i>Drosophila antonietae</i>	N16	Sertãozinho-SP	( 21° 09' S, 47° 58' W )	01 . IX . 2003	10
	J88	Itatiba-SP	( 22° 58' S, 46° 50' W )	28 . II . 2002	10
	A69	Cianorte-PR	( 23° 37' S, 52° 31' W )	26 . XII . 1977	10
	J27 / J28	Santiago-RS	( 29° 11' S, 54° 50' W )	22 . III . 1998	10
	VIA1	Viamão-RS	( 30° 06' S, 51° 01' W )	--- IV . 2002	10
<b>Zona de Contato</b>	J22/N08	Florianópolis-SC	( 27° 36' S, 48° 26' W )	31 . III . 2003	30
	J23	Arroio Teixeira-RS	( 29° 38' S, 49° 56' W )	22 . III . 1998	30
	J26	Osório-RS	( 29° 53' S, 50° 10' W )	22 . III . 1998	30
	J25	Tramandaí-RS	( 29° 55' S, 50° 13' W )	22 . III . 1998	30

\* Código do registro das coletas realizadas pelo Laboratório de Genética Evolutiva de *Drosophila* – USP – Ribeirão Preto – SP – Brasil.

#### - Preparação das Asas.

Para a análise, foram utilizadas asas direitas de indivíduos machos. As asas foram retiradas e submersas em uma gota d'água em uma lâmina e seladas com esmalte sob uma lamínula. As asas montadas em lâminas foram fotografadas com uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio. As imagens em formato TIFF foram capturadas e salvas no

computador com auxílio do programa AxioVision 4.3 ([http://www.zeiss.de/C12567BE00472A5C/EmbedTitelIntern/ReadMeHotfix4d\\_e/\\$File/AxioVision\\_Rel4\\_3Hotfix4ReadMe.txt](http://www.zeiss.de/C12567BE00472A5C/EmbedTitelIntern/ReadMeHotfix4d_e/$File/AxioVision_Rel4_3Hotfix4ReadMe.txt)).



**Figura 2:** Posição aproximada dos locais de origem das amostras de populações (Tabela 1) das espécies *Drosophila serido*, *Drosophila antonietae*, e populações pertencentes à zona de contato entre essas duas espécies, analisadas neste trabalho. .

## - Análises Morfométricas.

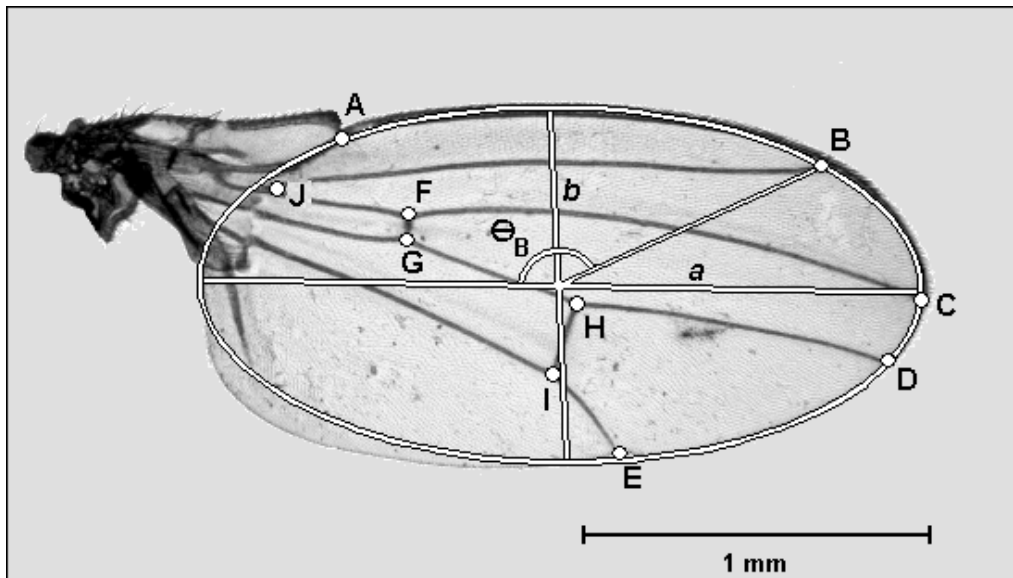
A morfologia da asa foi estudada com auxílio do método da elipse (Klaczko e Bitner-Mathé, 1990; Bitner-Mathé e Klaczko 1999a). A precisão do método foi testada, em trabalhos anteriores (Moraes *et al.*, 2004a; Matta e Bitner-Mathé, 2004), quanto a repetitividade dos parâmetros da asa, sendo que foram observados altos valores de repetitividade média, ou seja, em todos os testes realizados, os erros de medição foram praticamente insignificantes.

O método da elipse usa as propriedades geométricas de uma elipse, ajustada ao contorno da asa, para fornecer a descrição de tamanho e de forma, além das posições de dez intersecções, formadas pela junção das veias longitudinais com a borda da asa e com as veias transversais. Essas intersecções foram nomeadas como pontos de referência A, B, C, D, E, F, G, H, I e J (Figura 3). Desta forma são obtidas 17 medidas, sendo:

- Medida geral do tamanho ( $W_{SI}$ ) calculada a partir da média geométrica dos raios  $a$  e  $b$  (Figura 3) da elipse ( $W_{SI} = \sqrt{a.b}$ ). Essa medida representa também o raio de um círculo com a mesma área da elipse. Essa medida é considerada livre de forma, pois alterações na forma da elipse não interferem em seu valor;
- Medida geral de forma ( $W_{SH}$ ) calculada pela razão entre os eixos da elipse ( $b/a$ ; Figura 3). Esta medida indica se a elipse ajustada ao contorno da asa toma uma forma mais alongada ou mais circular. Quanto mais próximo do valor 1 for o valor  $W_{SH}$ , mais próxima da forma circular será a elipse;
- Dez medidas em radianos ( $\theta_A, \theta_B, \theta_C, \theta_D, \theta_E, \theta_F, \theta_G, \theta_H, \theta_I$  e  $\theta_J$ ), as quais indicam os ângulos formados entre as retas que unem os pontos de referência (de A a J; Figura 3) ao centro da elipse e o raio  $a$ ;
- Cinco medidas fornecidas pelas distâncias ( $D$ ) dos pontos de referência F a J ( $D_F, D_G, D_H, D_I$  e  $D_J$ ; Figura 3) ao centro da elipse. Essas medidas foram incluídas na análise pelo fato dos pontos de referência F a J estarem situados no interior da asa, podendo assim alterar as suas posições ao longo das retas que os unem ao centro da elipse, sem que as medidas  $\theta_F$  a  $\theta_J$  sejam alteradas. Essas distâncias foram ajustadas para o tamanho usando a relação  $D / W_{SI}$ .

### **- Obtenção das Medidas:**

As coordenadas cartesianas dos 30 pontos de referência, ao redor da borda de cada asa, utilizados para o ajuste da elipse, e dos 10 pontos de referência, indicados de A a J (Figura 3), foram geradas pelo programa TPSDig 2.04 (Rohlf, 2005). Essas coordenadas são os dados de entrada para o programa Asalk 2.0 (Bitner-Mathé e Klaczko, 1999b), o qual realiza os cálculos das medidas. O coeficiente de escala foi calculado com as coordenadas obtidas a partir da imagem de uma lâmina de escala ( $5^{+100}/_{100}$  mm), utilizando este coeficiente, todas as medidas de distância foram convertidas em milímetros.



**Figura 3:** Asa direita de um macho da espécie *Drosophila antonietae*, com uma elipse ajustada ao seu contorno, mostrando os dez pontos de referência utilizados. Para cada ponto, a posição é dada pelo ângulo formado entre a reta que une o ponto de referência ao centro da elipse e o raio  $a$ . Por exemplo, a posição do ponto de referência B é dada por  $\theta_B$ .

### - Análises Estatísticas.

Com o objetivo de identificar possíveis padrões de variação na morfologia da asa, foi realizada uma análise dos componentes principais. Esta análise produz novas variáveis não correlacionadas, ou componentes principais (PC), que reduzem a variação total em poucas dimensões e expressam os principais padrões de correlação entre variáveis. Apenas os componentes principais com “eigenvalues” maiores que um foram considerados.

A análise discriminante “stepwise” foi realizada com o objetivo de verificar o grau de divergência morfológica entre as espécies através das medidas geradas. O teste de Wilk’s lambda, um dos testes realizados pela análise discriminante “stepwise”, verifica a significância estatística da discriminação entre os grupos; trata-se de um teste geral para verificar a diferença entre o conjunto de medidas, e quanto menor o valor de Wilk’s lambda (variando entre 0 e 1) gerado pelo teste, maior será o grau de separação dos grupos.

A diferença entre cada par de populações foi quantificada através da distância de Mahalanobis, que é uma medida de distância entre dois pontos no espaço multivariado definido por duas ou mais variáveis correlacionadas. Esta medida é análoga a medida de distância Euclidiana, mas ela considera a correlação entre as variáveis, fornecendo assim uma medida não enviesada. A matriz de distância gerada pela análise de Mahalanobis foi utilizada em uma análise de agrupamento Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987), com a finalidade de se obter um fenograma. Esta análise de agrupamento não examina todas as topologias

possíveis, mas procura encontrar sequencialmente vizinhos que minimizem o comprimento total da árvore. A partir do fenograma obtido, é possível verificar as relações fenéticas intra e interespecíficas.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistica 6.0 (StatSoft, Inc, 2001).

## IV - Resultados

### - Variação interpopulacional em *Drosophila serido*.

A variação presente nas 17 medidas morfológicas da asa, dos indivíduos analisados neste trabalho, provenientes de dez localidades caracterizadas pela ocorrência da espécie *Drosophila serido* (Tabela 1), foi resumida em três componentes principais (Tabela 2), que juntos representam, aproximadamente, 79,5% da variação total. As medidas morfométricas  $\theta_A$ ,  $\theta_B$ ,  $\theta_F$ ,  $\theta_G$ ,  $D_H$ ,  $D_I$  e  $\theta_J$  estão negativamente correlacionadas com o primeiro PC, enquanto as medidas morfométricas  $\theta_E$ ,  $D_F$ ,  $D_G$ ,  $\theta_H$ ,  $\theta_I$  e  $D_J$  se mostram positivamente correlacionadas com este componente principal. As medidas morfométricas  $\theta_C$ ,  $\theta_D$ ,  $D_I$ ,  $W_{SI}$  e  $W_{SH}$  se correlacionam negativamente com o segundo PC, e as medidas morfométricas  $\theta_B$  e  $\theta_C$  se correlacionam positivamente com o terceiro PC.

**Tabela 2:** Análise dos componentes principais referentes as medidas morfológicas analisadas da asa, de populações da espécie *Drosophila serido* analisadas neste trabalho.

Medidas Morfométricas	PC 1	PC 2	PC 3
$\theta_A$	-0,863587	0,031025	-0,085173
$\theta_B$	-0,628323	-0,041899	0,627601
$\theta_C$	0,059421	-0,675183	0,634256
$\theta_D$	0,447349	-0,745053	0,176618
$\theta_E$	0,835281	-0,193567	-0,222063
$\theta_F$	-0,920784	-0,193881	-0,135917
$D_F$	0,904395	0,124012	0,008381
$\theta_G$	-0,900106	-0,040377	-0,182296
$D_G$	0,912043	0,111697	-0,010603
$\theta_H$	0,788257	-0,375223	-0,034000
$D_H$	-0,842571	-0,236526	-0,048829
$\theta_I$	0,907706	-0,070795	-0,119458
$D_I$	-0,562246	-0,548990	-0,141428
$\theta_J$	-0,823417	-0,049114	-0,303994
$D_J$	0,869759	-0,042488	-0,007950
$W_{SI}$	-0,305439	-0,766497	-0,091735
$W_{SH}$	0,369015	-0,755674	-0,418469
<b>% da Variação Total</b>	<b>55,79407</b>	<b>16,37740</b>	<b>7,35078</b>
<b>Eigenvalue</b>	<b>9,48499</b>	<b>2,78416</b>	<b>1,24963</b>

Com base nos resultados das correlações entre as medidas morfológicas das asas, obtidos para amostras de populações da espécie *Drosophila serido*, é possível reconhecer que aproximadamente 55,8% da variação morfológica da asa é caracterizada pelo posicionamento das veias longitudinais e transversais. Indivíduos que apresentam os pontos de referência A, B e E

(Figura 3) mais próximos a região proximal ( $\theta_A$  e  $\theta_B$  diminuem, e  $\theta_E$  aumenta), apresentam também os pontos de referência situados no interior da asa mais próximos desta região ( $\theta_F$ ,  $\theta_G$  e  $\theta_I$  diminuem, e  $\theta_H$  e  $\theta_1$  aumentam), além disso, os pontos de referência F, G e J (Figura 3) se posicionam mais afastados da região central ( $D_F$ ,  $D_G$  e  $D_J$  aumentam), enquanto que os pontos de referência H e I (Figura 3) se posicionam mais próximos desta região ( $D_H$  e  $D_I$  diminuem). Uma parte menor da variação total, aproximadamente 16,4 %, é caracterizada pelo fato de que quanto menor a asa ( $W_{SI}$  diminui), mais alongada é a sua forma ( $W_{SH}$  diminui), os pontos de referência C e D (Figura 3) se posicionam mais próximos da região anterior, e o ponto de referência I se posiciona mais próximo da região central da asa. A correlação positiva entre os pontos de referência B e C, caracteriza aproximadamente 7,4% da variação morfológica total.

A partir da análise da variação presente nas 17 medidas morfológicas da asa, foi possível discriminar as populações de *Drosophila serido* aqui analisadas (Wilks' lambda = 0,0066919;  $P < 0,0000$ ), sendo que as seis medidas que mais colaboraram para esta discriminação foram  $W_{SI}$ ,  $\theta_B$ ,  $\theta_D$ ,  $D_I$ ,  $D_J$ , e  $\theta_F$ .

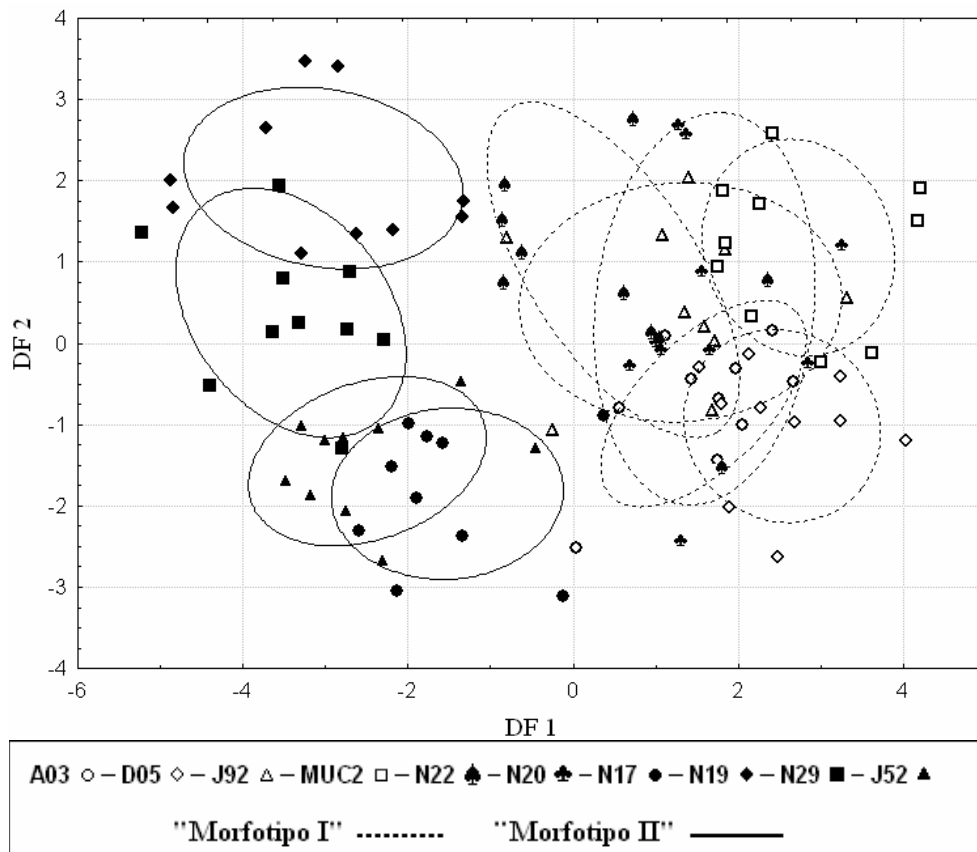
O teste de Wilks' lambda, aplicado em pares de populações, mostrou uma discriminação significativa (Wilks' lambda  $\leq 0,1377758$ ;  $P < 0,0000$ ) entre dois grupos de populações (Tabela 3), o primeiro, que será denominado “morfotipo I”, é formado pelas localidades de Arraial do Cabo-RJ (N20), Macaé-RJ (N22), Junco do Seridó-PB (A03), Cabedelo-PB (D05), Milagres-BA (J92), e Mucuri-BA (MUC2); e o segundo, que será denominado “morfotipo II”, é formado pelas localidades de Penha-SC (J52), São Sebastião (CEBIMAR-USP; N17), São Sebastião (Praia de Paúba; N19) e São Sebastião (Praia da Juréia; N29). Além disso, este teste mostrou que todas as discriminações entre as populações do grupo denominado “morfotipo II” foram mais significantes (Wilks' lambda  $\leq 0,2006381$ ;  $P < 0,0000$ ), do que as encontradas entre as populações do grupo denominado “morfotipo I” (Wilks' lambda  $\leq 0,7644542$ ;  $P < 0,0000$ ). Essa mesma separação das populações desta espécie em dois grupos bem definidos, e a maior discriminação entre as populações do grupo denominado “morfotipo II”, são também observadas na distribuição espacial que combina os valores individuais referentes as duas primeiras funções discriminantes (DF1 e DF2), geradas pela análise discriminante, sobre as medidas morfométricas da asa das populações da espécie *Drosophila serido* (Figura 4). Essas duas funções discriminantes representam juntas aproximadamente 75% da variação total.



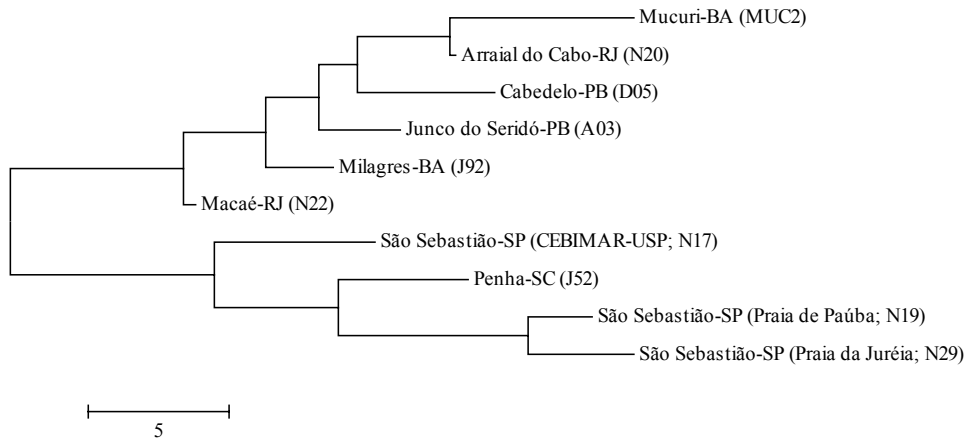
No fenograma (Figura 5), baseado na distância de Mahalanobis (Tabela 3), é possível observar a formação de dois agrupamentos principais, sendo o primeiro agrupamento composto pelas populações do grupo denominado “morfotipo I” e o segundo pelas populações do grupo denominado “morfotipo II”.

**Tabela 3:** Matriz de Distância de Mahalanobis (diagonal inferior) e matriz com os valores obtidos com Wilks’ lambda para pares de populações de *Drosophila serido* (diagonal superior).

Código	A03	D05	J92	Muc2	N22	N20	N17	N19	N29	J52	Código
A03	-	0,1367903	0,7644542	0,1268481	0,3670678	0,3022438	0,0173310	0,0433730	0,0515076	0,0001947	A03
D05	8,17245	-	0,1196561	0,2027733	0,3816151	0,1340127	0,0694765	0,0402698	0,0368760	0,0028188	D05
J92	8,32754	10,27454	-	0,0661745	0,0727929	0,0196265	0,0489371	0,0641262	0,0743159	0,0007539	J92
Muc2	15,48197	12,48492	14,49969	-	0,1367646	0,4062398	0,0000325	0,0117884	0,0215336	0,0285241	Muc2
N22	9,58567	13,56446	7,54162	12,94760	-	0,1681342	0,0008123	0,0958493	0,0704923	0,0511341	N22
N20	8,33705	10,60867	8,36297	6,75211	7,22519	-	0,1377758	0,0113025	0,0178936	0,0732119	N20
N17	23,18319	30,25029	22,92833	39,08707	23,65380	24,76821	-	0,0649791	0,0318131	0,2006381	N17
N19	34,58773	45,30352	28,61957	51,59355	21,66614	35,56607	16,23349	-	0,1889446	0,0350328	N19
N29	34,93596	48,07760	26,57941	45,77074	21,41239	32,74193	26,11488	6,02787	-	0,1097557	N29
J52	23,02312	34,65690	28,99477	46,42760	21,12588	30,86326	13,44776	9,44303	19,31605	-	J52



**Figura 4:** Diagrama com a distribuição espacial dos valores individuais das duas primeiras funções discriminantes (DF1 e DF2) geradas pela análise discriminante sobre as medidas morfométricas da asa de populações da espécie *Drosophila serido*. Elipses de 95% de confiança foram ajustadas sobre os dados referentes a cada população analisada.



**Figura 5:** Análise de Agrupamento Neighbor-Joining das amostras de populações da espécie *Drosophila serido*, baseada na distância de Mahalanobis (Tabela 3).

### - Variação interpopulacional em *Drosophila antonietae*.

A variação presente nas 17 medidas morfológicas da asa, dos indivíduos das amostras das cinco localidades caracterizadas pela ocorrência da espécie *Drosophila antonietae* (Tabela 1), foi resumida em três componentes principais (Tabela 4), que juntos representam, aproximadamente, 82,8% da variação total. As medidas morfométricas  $\theta_A$ ,  $\theta_B$ ,  $\theta_F$ ,  $\theta_G$ ,  $D_H$ ,  $D_I$ ,  $\theta_J$  e  $W_{SI}$  estão negativamente correlacionadas com o primeiro PC, enquanto as medidas morfométricas  $\theta_E$ ,  $D_F$ ,  $D_G$ ,  $\theta_H$ ,  $\theta_I$ ,  $D_J$  e  $W_{SH}$  se mostram positivamente correlacionadas com este componente principal. As medidas morfométricas  $\theta_C$  e  $\theta_D$  se correlacionam positivamente com o segundo PC. O terceiro PC, que representa aproximadamente 8,9 % da variação total, expôs apenas correlações com valores inferiores a 0,5 entre as medidas morfológicas analisadas.

Os resultados das correlações entre as medidas morfológicas das asas, obtidos para as amostras de populações da espécie *Drosophila antonietae*, nos permitem observar que aproximadamente 62,7 % da variação morfológica da asa é caracterizada pelo fato de que quanto menor a asa ( $W_{SI}$  diminui), menos alongada é a sua forma ( $W_{SH}$  aumenta). Em indivíduos que apresentam as asas mais arredondadas, os pontos de referência A, B e E (Figura 3) se mostram mais próximos da região proximal ( $\theta_A$  e  $\theta_B$  diminuem, e  $\theta_E$  aumenta), os pontos de referência situados no interior também se apresentam mais próximos desta região ( $\theta_F$ ,  $\theta_G$  e  $\theta_J$  diminuem, e  $\theta_H$  e  $\theta_I$  aumentam), além disso, os pontos de referência F, G e J (Figura 3) se posicionam mais afastados da região central ( $D_F$ ,  $D_G$  e  $D_J$  aumentam), enquanto que os pontos de referência H e I

(Figura 3) se posicionam mais próximos desta região ( $D_H$  e  $D_I$  diminuem). Aproximadamente 11,2 % da variação total é caracterizada pela correlação positiva entre os pontos de referência C e D (Figura 3).

**Tabela 4:** Análise dos componentes principais referentes as medidas morfológicas analisadas da asa, de populações da espécie *Drosophila antonietae* analisadas neste trabalho.

Medidas Morfométricas	PC 1	PC 2	PC 3
$\theta_A$	-0,851722	0,113910	0,447561
$\theta_B$	-0,688130	0,243223	-0,429152
$\theta_C$	-0,068458	0,872564	-0,296751
$\theta_D$	0,377972	0,837471	-0,033479
$\theta_E$	0,838095	0,331184	0,211438
$\theta_F$	-0,936863	0,175521	0,247534
$D_F$	0,900029	-0,091125	-0,068138
$\theta_G$	-0,890792	0,121968	0,329771
$D_G$	0,915069	-0,102446	-0,059239
$\theta_H$	0,866312	0,134248	0,014746
$D_H$	-0,859045	-0,016418	-0,326797
$\theta_I$	0,921922	0,148473	0,258593
$D_I$	-0,711724	0,065500	-0,472814
$\theta_J$	-0,792732	0,146986	0,490128
$D_J$	0,910276	-0,003260	-0,242103
$W_{SI}$	-0,744729	0,174479	-0,088817
$W_{SH}$	0,663000	0,313161	0,326650
<b>% da Variação Total</b>	<b>62,72763</b>	<b>11,19869</b>	<b>8,86712</b>
<b>Eigenvalue</b>	<b>10,66370</b>	<b>1,90378</b>	<b>1,50741</b>

As populações de *Drosophila antonietae*, aqui analisadas, foram discriminadas a partir da variação presente nas 17 medidas morfológicas da asa (Wilks' lambda = 0,0434154;  $P < 0,0000$ ), sendo que as três medidas que mais colaboraram para esta discriminação foram  $\theta_A$ ,  $\theta_H$  e  $\theta_J$ .

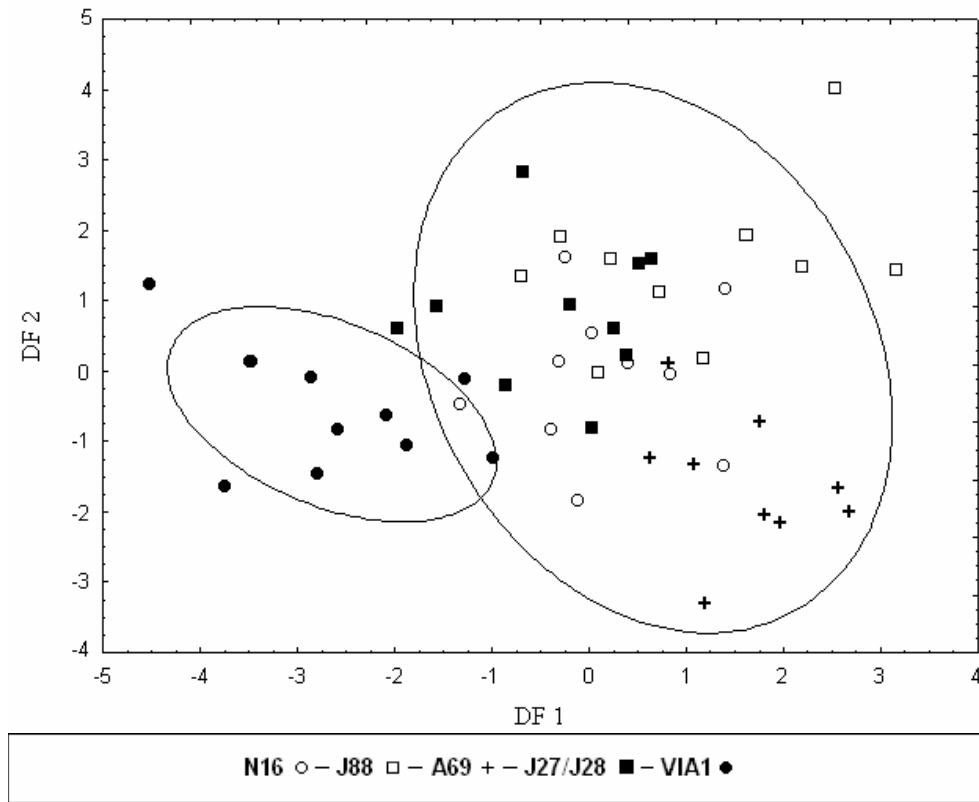
O teste de Wilks' lambda, aplicado em pares de populações (Tabela 5), confirma a discriminação significativa (Wilks' lambda  $\leq 0,322027$ ;  $P < 0,0000$ ) entre as populações desta espécie, e nos permite observar que a população da localidade VIA1 é a mais diferenciada (Wilks' lambda  $\leq 0,220202$ ;  $P < 0,0000$ ) dentre as demais. Essa maior diferenciação da população da localidade VIA1 é facilmente observada na distribuição espacial que combina os valores individuais referentes as duas primeiras funções discriminantes (DF1 e DF2), geradas pela análise discriminante, sobre as medidas morfométricas da asa das populações analisadas (Figura 6). Essas duas funções discriminantes representam juntas aproximadamente 72% da variação total.

No fenograma (Figura 7) baseado na distância de Mahalanobis (Tabela 5) observa-se a formação de dois agrupamentos, o primeiro formado pelas amostras de populações das

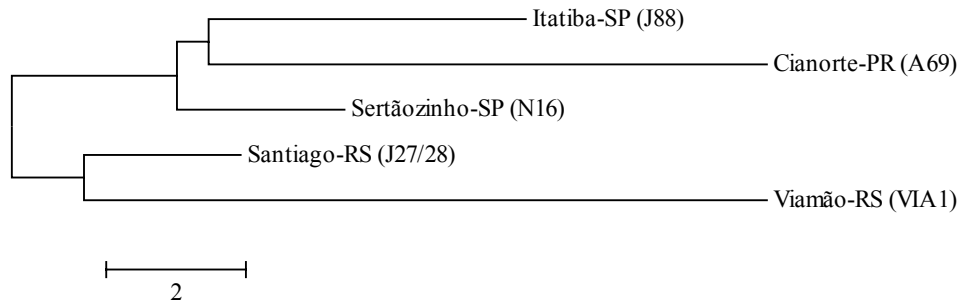
localidades de Itatiba-SP (J88), Sertãozinho-SP (N16) e Cianorte-PR (A69), e o segundo formado pelas amostras de populações das localidades de Santiago-RS (J27/J28) e Viamão-RS (VIA1).

**Tabela 5:** Matriz de Distância de Mahalanobis (diagonal inferior) e matriz com os valores obtidos com Wilks' lambda para pares de populações de *Drosophila antonietae* (diagonal superior).

Código	N16	J88	A69	J27/28	Via1	Código
N16	-	0,007534	0,262443	0,075485	0,018765	N16
J88	7,47933	-	0,202718	0,322027	0,084677	J88
A69	10,76963	12,54230	-	0,123294	0,220202	A69
J27/28	10,96902	8,58109	13,23243	-	0,047559	J27/28
Via1	12,65619	20,08151	22,66205	12,02900	-	Via1



**Figura 6:** Diagrama com a distribuição espacial dos valores individuais das duas primeiras funções discriminantes (DF1 e DF2), geradas pela análise discriminante sobre as medidas morfométricas da asa de populações da espécie *Drosophila antonietae*. Elipses de 95% de confiança foram ajustadas sobre dois grupos de valores bem definidos e separados pela primeira função discriminante.

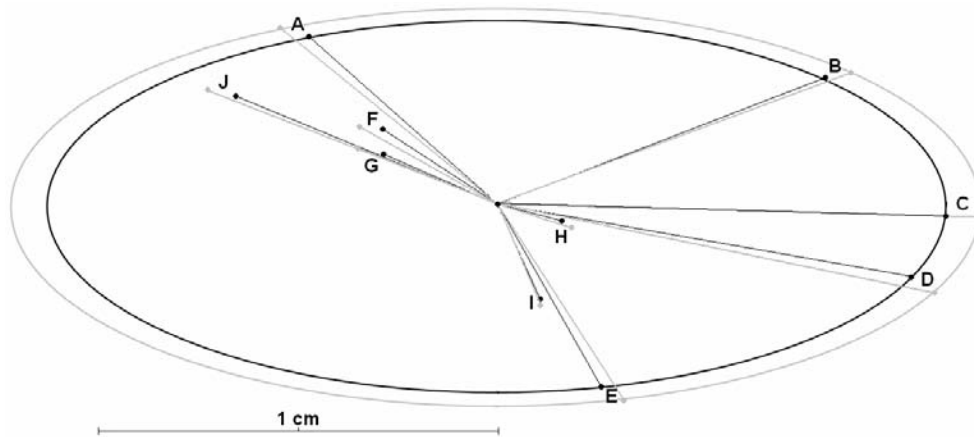


**Figura 5:** Análise de Agrupamento Neighbor-Joining das amostras de populações da espécie *Drosophila antonietae*, baseada na distância de Mahalanobis (Tabela 5).

**- Variação morfológica entre as espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*.**

A variação interespecífica na morfologia da asa foi verificada utilizando indivíduos de populações das localidades de Milagres-BA e Itatiba-SP, caracterizadas pela ocorrência das espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, respectivamente.

A discriminação entre essas duas espécies foi significativa (Wilks' lambda<sup>2</sup> = 0,0624516;  $P < 0,0003$ ), sendo que as seis medidas que mais colaboraram para esta discriminação foram  $W_{SI}$ ,  $\theta_A$ ,  $\theta_D$ ,  $W_{SH}$  e  $\theta_F$  (Figura 6).

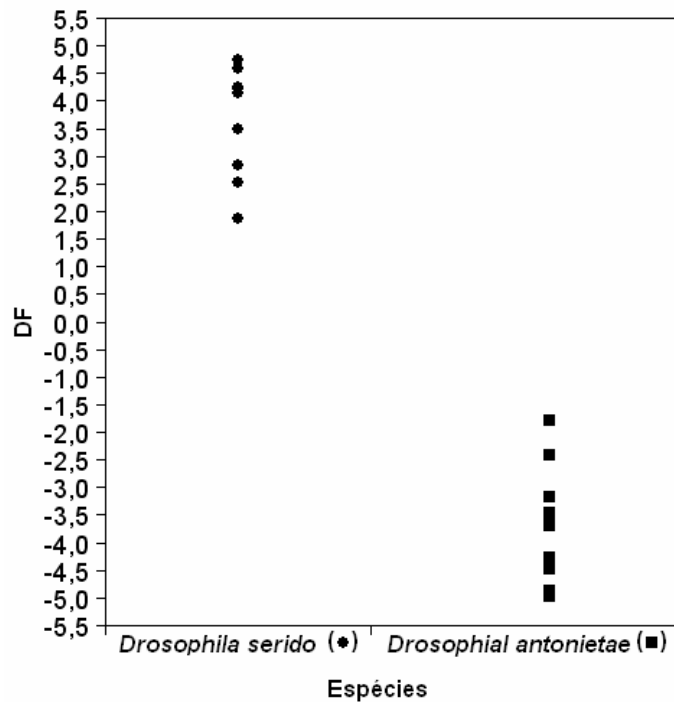


**Figura 6:** Elipses médias para *Drosophila antonietae* (elipse externa de cor cinza) e *Drosophila serido* (elipse interna e de cor preta). As elipses foram sobrepostas pelos seus pontos zero no eixo cartesiano. Os pontos A-J são os pontos de referência usados neste trabalho (Figura 3).

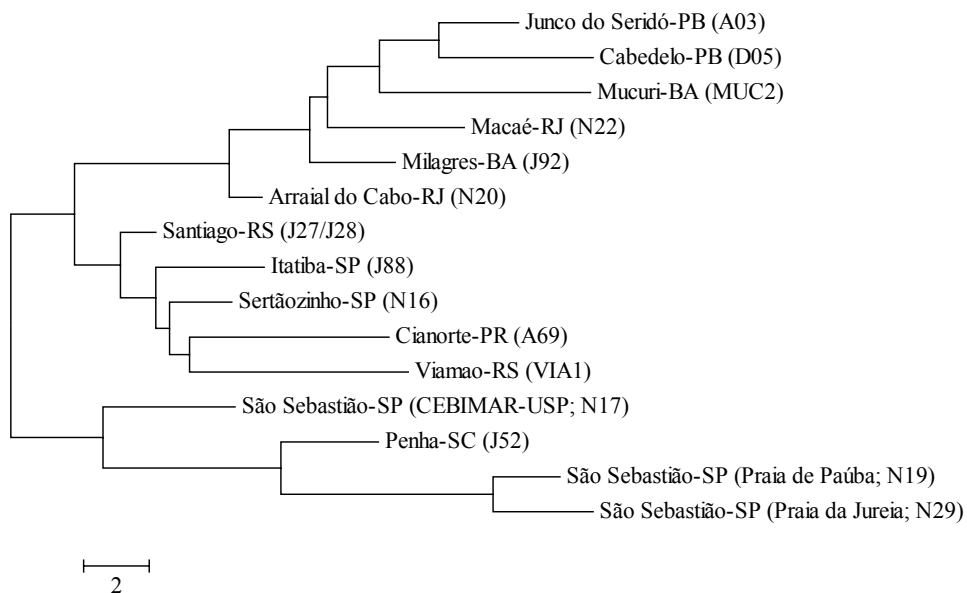
O valor da distância de Mahalanobis ( $D^2$ ), entre os centróides das duas populações dessas espécies, é alto ( $D^2 = 60,0496$ ; p-level = 0,0002928458), este resultado também pode ser observado na distribuição espacial da função discriminante (Figura 7), gerada pela análise

discriminante, em que os valores referentes a cada população de cada espécie estão bem separados.

Observando o fenograma de similaridade morfológica (Figura 8), obtido a partir da matriz de Distância de Mahalanobis para todas as amostras utilizadas neste trabalho, nota - se a formação de três agrupamentos: um agrupamento formado pelas populações do grupo denominado “morfortipo I” da espécie *Drosophila serido*, um segundo agrupamento formado pelas populações da espécie *Drosophila antonietae*, e um terceiro agrupamento, situado em um ramo externo aos dois anteriores, formado somente pelas populações do grupo denominado “morfortipo II” da espécie *Drosophila serido*.



**Figura 7:** Diagrama com a distribuição espacial dos valores individuais da função discriminante (DF), gerada pela análise discriminante, obtida a partir das medidas morfológicas da asa de indivíduos das populações das localidades de Itatiba-SP (*Drosophila antonietae*; J88) e Milagres-BA (*Drosophila serido*; J92).



**Figura 8:** Análise de Agrupamento Neighbor-Joining da amostra total de populações utilizadas neste trabalho, baseada na distância de Mahalanobis obtida a partir das 17 medidas morfométricas da asa.

### - Variação morfológica interpopulacional na zona de contato.

A variação interpopulacional dentro da zona de contato, descrita para as espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* no litoral dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, foi verificada utilizando as amostras das populações das localidades de Florianópolis-SC (N08/J22), Tramandaí-RS (J25), Osório-RS (J26) e Arroio Teixeira-RS (J23). Além das amostras de populações pertencentes a essa zona de contato, as amostras de populações pertencentes as localidades de Milagres-BA (J92) e Itatiba-SP (N16) foram utilizadas para representar as espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, respectivamente. As amostras das populações das localidades de Viamão-RS (*Drosophila antonietae*; VIA1) e Penha-SC (*Drosophila serido*; J52), foram incluídas na análise por estarem localizadas geograficamente mais próximas da zona de contato (Figura 1).

A discriminação entre as populações pertencentes à zona de contato foi significativa (Wilk's  $\lambda = 0,1351680$ ;  $P < 0,0000$ ), sendo que todas as medidas morfológicas das asas analisadas neste trabalho foram utilizadas nesta discriminação. Todavia, os resultados obtidos pelo teste de Wilk's lambda (Tabela 6), aplicado a pares de populações mostrou que praticamente não existe discriminação entre as populações das localidades de Arroio Teixeira-RS (J23), Tramandaí-RS (J25) e Osório-RS (J26) (Wilk's  $\lambda \geq 0,5664076$ ;  $P < 0,0000$ ), mas existe discriminação significativa (Wilk's  $\lambda \leq 0,2064262$ ;  $P < 0,0000$ ) entre essas três populações e a

população da localidade de Florianópolis-SC (N08/J22), também pertencente a essa zona de contato. Quando comparadas com as populações de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, utilizadas nesta análise, as populações da zona de contato analisadas, podem ser consideradas como populações distintas (Tabela 6).

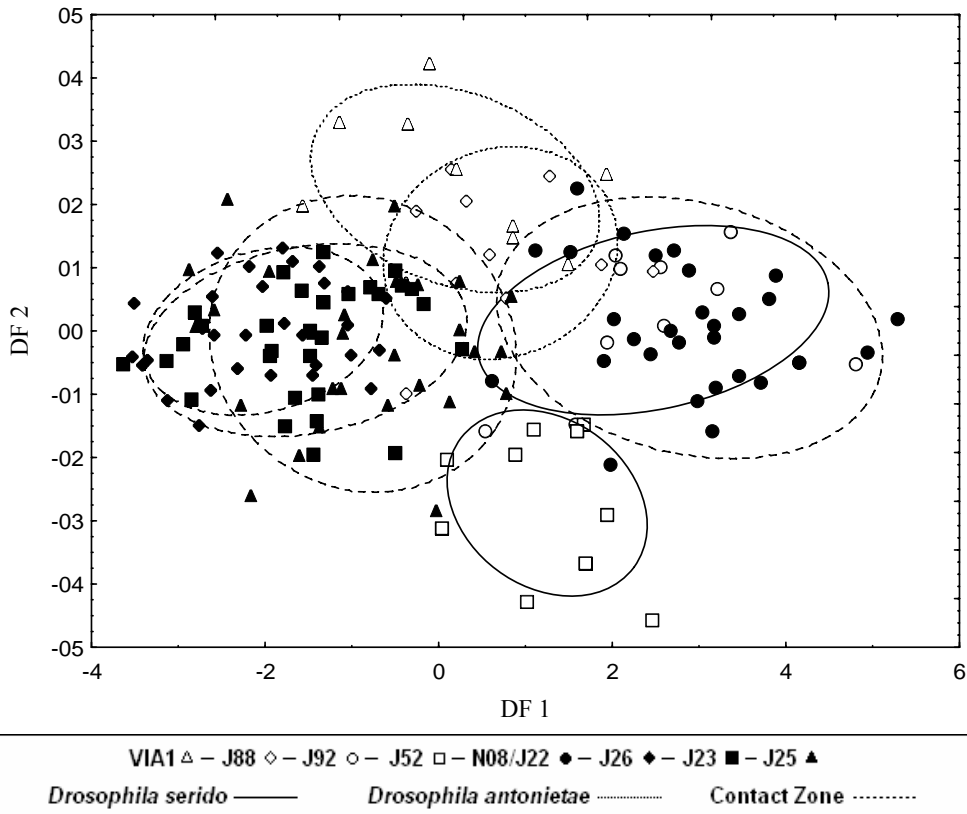
**Tabela 6:** Matriz de Distância de Mahalanobis (diagonal inferior) e matriz com os valores obtidos com Wilks' lambda para pares de populações das espécies *Drosophila antonietae*, *Drosophila serido* e populações da zona de contato entre estas duas espécies (diagonal superior).

<b>Código</b>	<b>J92</b>	<b>J52</b>	<b>J88</b>	<b>Via1</b>	<b>J22/N08</b>	<b>J23</b>	<b>J26</b>	<b>J25</b>	<b>Código</b>
<b>J92</b>	-	0,0007539	0,0624516	0,0733957	0,1335377	0,1306516	0,1154648	0,1991329	<b>J92</b>
<b>J52</b>	21,40340	-	0,0557981	0,1524937	0,2165631	0,1704206	0,1146835	0,3069373	<b>J52</b>
<b>J88</b>	15,14793	21,44684	-	0,084677	0,3567201	0,3146298	0,1430018	0,4132377	<b>J88</b>
<b>Via1</b>	23,08803	28,29561	11,38410	-	0,2122095	0,2947983	0,1920611	0,3215760	<b>Via1</b>
<b>J22/N08</b>	10,89535	13,16007	12,94916	15,57178	-	0,1340245	0,1030330	0,2064262	<b>J22/N08</b>
<b>J23</b>	22,74735	17,19898	10,36248	13,30476	22,18565	-	0,7058133	0,7338037	<b>J23</b>
<b>J26</b>	30,46719	21,40880	16,68463	13,26838	25,71842	1,94680	-	0,5664076	<b>J26</b>
<b>J25</b>	17,47316	13,84814	9,68858	11,06520	17,04439	1,42245	3,76809	-	<b>J25</b>

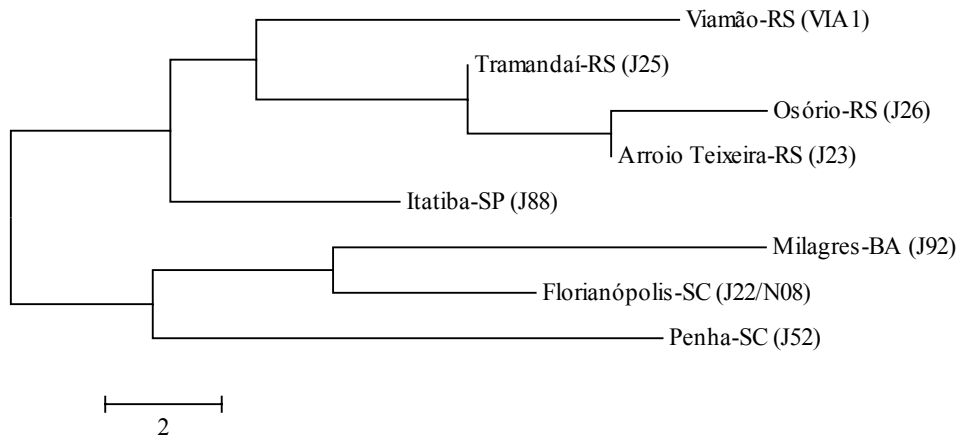
Com base na primeira função discriminante, gerada pela análise discriminante, que representa aproximadamente 61% da variação total, é possível observar que, com exceção da população da localidade de Florianópolis-SC (N08/J22), todas as outras populações da zona de contato são morfologicamente similares às populações da espécie *Drosophila antonietae* (Itatiba-SP (J88) e Viamão-RS (VIA1)) (Figura 9), e a morfologia da asa da população da localidade de Florianópolis-SC (N08/J22) se assemelha com a morfologia da asa de populações de *Drosophila serido* (Milagres-BA (J92) e Penha-SC (J52)). Com base na segunda função discriminante, que representa aproximadamente 16% da variação total, é possível observar que a população da localidade de Florianópolis-SC (N08/J22) é morfologicamente mais semelhante a população da localidade de Milagres-BA (J92), localidade tipo de *Drosophila serido*, do que à localidade de Penha-SC (J52) (Figura 9), que está geograficamente localizada mais próxima à população da localidade de Florianópolis-SC (N08/J22) (Figura 2).

No fenograma (Figura 10), baseado na distância de Mahalanobis (Tabela 6), observa-se a formação de dois agrupamentos: o primeiro formado pelas populações das localidades de Arroio Teixeira-RS (J23), Tramandaí-RS (J25) e Osório-RS (J26), pertencentes a zona de contato, e as populações das localidades de Itatiba-SP (J88) e Viamão-RS (VIA1), que representam a espécie *Drosophila antonietae*; e o segundo pela população da localidade de Florianópolis-SC (N08/J22), pertencente a zona de contato, e pelas populações das localidades de Milagres-BA (J92) e Penha-SC (J52), que representam a espécie *Drosophila serido*.





**Figura 9:** Diagrama com a distribuição espacial dos valores individuais das duas primeiras funções discriminantes (DF1 e DF2), geradas pela análise discriminante sobre as medidas morfométricas da asa de populações das espécies *Drosophila antonietae*, *Drosophila serido*, e populações pertencentes a zona de contato. Sobre cada uma das distribuições, referentes a cada população, foram ajustadas elipses de 95% de confiança.



**Figura 10:** Análise de Agrupamento Neighbor-Joining das amostras de populações da espécie *Drosophila antonietae*, *Drosophila serido*, e populações da zona de contato (Tabela 1), baseada na distância de Mahalanobis obtida a partir das 17 medidas morfométricas da asa.

## V - Discussão e Conclusões

No presente trabalho, foram analisadas as asas direitas de indivíduos machos provenientes de dez localidades caracterizadas pela ocorrência da espécie *Drosophila serido*, cinco localidades caracterizadas pela ocorrência da espécie *Drosophila antonietae*, e quatro localidades pertencentes à zona de contato descrita para estas duas espécies, nas regiões litorâneas dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, totalizando uma amostra de 270 indivíduos, sendo trinta indivíduos de cada localidade pertencente à zona de contato e dez indivíduos de cada localidade caracterizada pela ocorrência das espécies *Drosophila serido* ou *Drosophila antonietae*. Com o objetivo de caracterizar populações das espécies *Drosophila antonietae* e *Drosophila serido*, através da morfologia da asa, e de acrescentar informações sobre a história evolutiva destas espécies e das populações da zona de contato descrita para elas nas regiões litorâneas dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, os dados referentes às medidas morfométricas da asa, obtidas com auxílio do método da elipse, foram analisados utilizando a análise dos componentes principais, análise discriminante “stepwise” e análise de agrupamento Neighbor-Joining.

As espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* apresentaram um padrão geral de variação na morfologia da asa muito semelhante aos observados em outras espécies de *Drosophila* (Bitner-Mathé e Klaczko, 1999a, 1999b; Matta e Bitner-Mathé, 2004). Em geral, os resultados obtidos na análise da morfologia da asa das populações de ambas as espécies, demonstraram que em indivíduos que apresentaram as asas mais alongadas, a extremidade da primeira, segunda e quinta veias longitudinais tornaram-se mais próximas umas das outras na região distal da asa. Além disso, as intersecções das veias longitudinais com as veias transversais tomaram um posicionamento mais próximo à região anterior da asa. Acredita-se que essa grande semelhança no padrão de deformação da morfologia da asa, entre diferentes espécies do gênero *Drosophila*, deva-se ao fato de que o posicionamento das veias alares é estabelecido por uma complexa hierarquia transcricional. Essas respostas celulares a morfogenes como Decapentaplegic, Wingless e Hedgehog, entre outros, formam gradientes morfogênicos que irão delimitar os locais onde se dará a formação das veias alares (Bier, 2000; Crozatier *et al.*, 2004; Strigini e Cohen, 1999).

Em ambas as espécies aqui analisadas o primeiro PC, que geralmente é interpretado como variação de tamanho, explicou a maior parte da variação morfológica, concordando com vários outros estudos, onde o tamanho é a principal parte da variação (Bookstein et al, 1985; Bitner-Mathé e Klaczko, 1999). A correlação entre as medidas C e D com o segundo PC, o qual geralmente é interpretado como variação de forma, livre de tamanho, também foi observada em outros trabalhos (Bitner-Mathé e Klaczko, 1999; Bitner-Mathé et al, 1995). A medida morfométrica C foi a que apresentou a correlação mais baixa com o primeiro PC, com valores próximos à zero nas duas espécies, correlacionando-se com o segundo ou terceiro PC, os quais representam apenas uma pequena parte da variação total. Acredita-se que a baixa variação observada nessa medida morfológica, o que também foi relatado em outros estudos (Bitner-Mathé and Klaczko, 1999, Gilchrist et al, 2000; Hoffmann and Shirriffs, 2002; Matta and Bitner-Mathé, 2004), deve-se ao fato de que quando a asa apresenta um formato mais alongado ela sofre uma contração da parte distal. Essa contração faz com que os pontos de referência, associados ao posicionamento das veias longitudinais, se apresentam mais próximos uns dos outros na parte distal da asa, com exceção da terceira veia longitudinal, que parece manter a sua posição (Matta and Bitner-Mathé, 2004). A correlação fenotípica entre as medidas morfológicas  $W_{SI}$  e  $W_{SH}$  foi diferente em cada espécie, o que pode ser explicado por não haver nenhuma evidência para uma contribuição genética na correlação entre essas medidas (Matta and Bitner-Mathé, 2004; Zimmerman *et al.*, 2000), ao contrário da correlação entre  $W_{SH}$  e o posicionamento das veias longitudinais.

A espécie *Drosophila serido* mostrou uma alta variação morfológica interpopulacional, sendo esta variação suficiente para dividir esta espécie em dois grupos de populações: o primeiro, denominado “morfotipo I”, é formado pelas localidades de Arraial do Cabo-RJ, Macaé-RJ, Junco do Seridó-PB, Cabedelo-PB, Milagres-BA, e Mucuri-BA; e o segundo, denominado “morfotipo II”, é formado pelas localidades de Penha-SC, São Sebastião (CEBIMAR-USP), São Sebastião (Praia de Paúba) e São Sebastião (Praia da Juréia), sendo que neste segundo grupo a maioria das discriminações entre as populações é mais significativa do que a discriminação interespecífica encontrada neste estudo. A divisão dessa espécie em dois grupos distintos já foi sugerida em trabalhos anteriores (Baimai *et al.*, 1983; Biffi *et al.*, 2001; de Brito *et al.*, 2002a; Manfrin *et al.*, 2001; Morales, 2005; Ruiz e Wasserman, 1993; Ruiz *et al.*, 2000). Entretanto não existe uma concordância total entre as informações obtidas pelos marcadores utilizados a respeito das populações que formam cada um desses grupos.

Os dados provenientes da análise de inversões cromossômicas (Ruiz e Wasserman, 1993; Ruiz *et al.*, 2000) divide as populações dessa espécie em dois grupos: o grupo de populações do interior do nordeste e o grupo de populações do litoral do Brasil, em que as populações de Florianópolis-SC e Guaratuba-SP compartilham um arranjo cromossômico derivado ( $2x^7y^9x^8w^8$ ) e as populações ao sul de Florianópolis-SC até o litoral do estado do Rio Grande do Sul possuem o arranjo cromossômico ancestral ( $2x^7y^9$ ). As informações obtidas no presente trabalho agrupam a amostra da localidade de Florianópolis-SC com a amostra da localidade de Milagres-BA, mas agrupam a amostra da localidade de Penha-SC com as populações das localidades do litoral do estado de São Paulo. Neste caso, com relação a localidade de Florianópolis-SC, não existe uma concordância entre os dados provenientes da análise de inversões cromossômicas e da análise da morfologia da asa.

A análise de cromossomos metafásicos (Baimai *et al.*, 1983; Biffi *et al.*, 2001) mostra que no interior do nordeste as populações possuem o mesmo tipo de placa metafásica, mas que no litoral cada população apresenta um tipo de placa metafásica. A análise da morfologia da asa também mostrou uma variação significativa entre as populações de localidades litorâneas, mas agrupou as populações das localidades do litoral dos estados do Rio de Janeiro e Bahia com as populações do interior do nordeste, sugerindo uma quebra na distribuição da variação na região entre os estados de São Paulo e Rio de Janeiro.

A comparação entre os dados obtidos a partir da análise da morfologia da asa e da variação haplotípica mitocondrial também apresenta informações concordantes e discordantes. A variação mitocondrial sugere uma proximidade entre a localidade Florianópolis-SC com as populações do interior do nordeste, o que concorda com os dados obtidos no presente trabalho, mas a variação morfológica da asa agrupa a população da localidade de Penha-SC com as populações das localidades do litoral do estado de São Paulo, enquanto que a variação haplotípica mitocondrial sugere uma proximidade entre a localidade Penha-SC com localidade de Florianópolis-SC e as localidades do interior do nordeste. Além disso, a análise da morfologia da asa agrupou as populações das localidades do litoral dos estados do Rio de Janeiro e Bahia com as populações das localidades do interior do nordeste, enquanto a análise de haplótipos mitocondriais (Manfrin *et al.*, 2001; de Brito *et al.*, 2002a; Morales, 2005) agrupou essas populações litorâneas com as populações das localidades do litoral do estado de São Paulo.

Os resultados obtidos a partir da análise de marcadores diversos (Baimai *et al.*, 1983; Biffi *et al.*, 2001; de Brito *et al.*, 2002a; Franco *et al.*, 2006; Manfrin *et al.*, 2001; Morales, 2005; Ruiz e Wasserman, 1993; Ruiz *et al.*, 2000) sugeriram, assim como os dados obtidos a partir da análise da morfologia da asa, que a espécie *Drosophila serido* possui uma forte estrutura populacional, sendo considerada politípica para todos os marcadores já utilizados. Além disso, a significativa discriminação entre as populações de *Drosophila serido* localizadas no litoral brasileiro corrobora os dados provenientes da análise da variabilidade haplotípica mitocondrial (Morales, 2005), que demonstrou que as divisões populacionais na espécie *Drosophila serido* coincidem com a divisão da costa em macrocompartimentos geológicos, sugerindo eventos de isolamento geográfico na diferenciação dessas populações.

As medidas  $W_{SI}$ ,  $\theta_B$ ,  $\theta_D$ , e  $D_I$ , as quais tiveram maior peso na discriminação intraespecífica, estão correlacionadas com o segundo e terceiro PC, indicando que as discriminações interpopulacionais foram baseadas na forma da asa, e não no tamanho. Isto é um fato importante, pois indica que essas discriminações interpopulacionais estão, em sua maior parte, relacionadas aos eventos evolutivos presentes na história das populações desta espécie, isto porque se acredita que, considerando influências ambientais na variação morfológica, a forma da asa é mais canalizada (Bitner-Mathé and Klaczko, 1999), isto é, o tamanho varia consideravelmente mais do que a forma, que é mais conservada.

Ao contrário do que foi observado na espécie *Drosophila serido*, as medidas morfométricas que tiveram maior peso na discriminação entre as populações da espécie *Drosophila antonietae* estão fortemente correlacionadas com o primeiro PC, ou seja, as discriminações interpopulacionais nesta espécie foram baseadas no tamanho, e não na forma da asa. Por tanto, a presença de uma variação interpopulacional significativa nesta espécie pode ser nada mais que um reflexo da influência de pressões ambientais locais sobre algumas características da morfologia da asa. Sendo assim, a menor influência de eventos históricos na variação morfológica interpopulacional observada nessa espécie poderia ser explicada pelo isolamento recente das suas populações (Machado, 2003; Mateus e Sene, 2003; Monteiro e Sene, 1995), ou pela existência de fluxo gênico entre as elas, tornando difícil um processo de diferenciação interpopulacional (Machado, 2003; Mateus e Sene, 2003; Monteiro e Sene, 1995; Tidon-Sklorz e Sene, 2001). Entretanto, os resultados aqui obtidos sugeriram a formação de dois grupos de populações: o primeiro composto pelas amostras de populações das localidades de

Itatiba-SP, Sertãozinho-SP e Cianorte-PR, e o segundo composto pelas amostras de populações das localidades de Santiago-RS e Viamão-RS, corroborando os dados provenientes da análise da diversidade haplotípica mitocondrial do gene Citocromo Oxidase I (De Brito *et al.*, 2002a), que sugeriu a divisão das populações da espécie *Drosophila antonietae* em dois grupos: um formado por populações da área norte de distribuição da espécie e um outro formado por populações da área sul, do interior e da costa do estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

O sucesso na utilização da morfologia da asa como marcador taxonômico foi mais uma vez comprovado quando analisados indivíduos de populações das localidades de Milagres-BA e Itatiba-SP, caracterizadas pela ocorrência das espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, respectivamente. Pois, assim como em um trabalho anterior (Moraes *et al.*, 2004b), a variação presente nesse caractere morfológico foi suficiente para encontrar uma marcante divergência quantitativa na morfologia da asa entre as espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*. Além disso, a diferenciação significativa na morfologia da asa entre essas duas espécies do “cluster” *buzzatii* se manteve mesmo quando analisadas várias amostras de populações caracterizadas pela ocorrência da espécie *Drosophila serido* ou *Drosophila antonietae*, reforçando a qualidade desse caractere morfológico como marcador taxonômico. A discriminação entre essas espécies foi baseada tanto na forma quanto no tamanho da asa, e as diferenças na morfologia da asa foram atribuídas principalmente ao fato de que a asa de *Drosophila antonietae* é maior e mais alongada do que a de *Drosophila serido* (Figura 6). Além disso, com exceção da terceira veia longitudinal, todas as outras veias alares aqui analisadas apresentam diferenças interespecíficas em seus posicionamentos, principalmente a primeira e a quarta veias longitudinais.

Os resultados obtidos neste trabalho não confirmaram a existência de uma zona de contato entre as espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* nas regiões litorâneas dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, mas caracterizaram as populações analisadas dessa zona de contato, como populações distintas e separadas das populações das espécies *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*. Todas as discriminações realizadas foram baseadas tanto na forma quanto no tamanho da asa, evidenciando tanto aspectos históricos quanto ambientais entre essas populações.

Entre as populações da zona de contato situadas no estado do Rio Grande do Sul (Arroio Teixeira, Tramandaí e Osório) não foi observada divergência alguma na morfologia da asa.

Entretanto, entre essas três populações e a população da localidade de Florianópolis-SC, foi observada uma divergência interpopulacional significativa, o que corrobora os dados obtidos na análise das inversões cromossômicas polimórficas (Ruiz *et al.*, 2000), em que as populações da zona de contato, situadas no estado do Rio Grande do Sul apresentaram os arranjos cromossômicos  $2x^7y^9$  (*Drosophila serido*) e  $2x^7z^8$  (*Drosophila antonietae*), e a população da localidade de Florianópolis-SC, caracterizada como pertencente à zona de contato pela análise de haplótipos mitocondriais e aloenzimas (Morales *et al.*, 2004), apresentou o arranjo cromossômico  $2x^7y^9x^8w^8$ , característico da espécie *Drosophila serido*. Nas populações da zona de contato, situadas no estado do Rio Grande do Sul, foi observada uma maior semelhança morfológica com as populações de *Drosophila antonietae*, e a população de Florianópolis – SC apresentou maior semelhança morfológica com a população de Milagres – BA, localidade tipo para *Drosophila serido*. As semelhanças morfológicas entre essas populações da zona de contato e as respectivas espécies podem ser explicadas pela frequência de representantes da espécie *Drosophila serido* ou *Drosophila antonietae* que compõem essas populações. Algumas hipóteses consideram o interior da Bahia como região de origem da linhagem ancestral da espécie *Drosophila serido* (De Brito *et al.*, 2002a), e que esta espécie tenha colonizado o litoral brasileiro no sentido norte – sul, enquanto que a espécie *Drosophila antonietae* teria colonizado a região da Bacia do Paraná no sentido norte-sul, chegando ao litoral brasileiro pela depressão Rio Grandense e colonizando o litoral no sentido sul-norte. Com base nesses “sentidos de colonização”, além da influência de aspectos ecológicos locais, torna-se mais claro o porquê das diferentes frequências de representantes da espécie *Drosophila serido* ou *Drosophila antonietae* que compõem essas populações da zona de contato.

Todos esses resultados nos mostram o quão complexa é a história evolutiva da espécie *Drosophila serido* e da formação da zona de contato entre ela e a espécie *Drosophila antonietae*. A provável especiação alopátrica dessas duas espécies, as possíveis subseqüentes expansões de área de ocorrência das populações destas espécies, a formação de uma zona de contato secundária entre elas, aliadas a eventos de isolamento geográfico com diferenciação genética, os quais podem ter culminado na grande divergência interpopulacional observada na espécie *Drosophila serido*, nos mostra o quão importante é o entendimento dos processos envolvidos na dinâmica evolutiva das populações destas duas espécies do “cluster” *buzzatii*.

Por fim, tendo em vista todos os resultados obtidos no presente trabalho, assim como os obtidos em outros trabalhos já realizados (Moraes et al., 2004b), e considerando os níveis e a distribuição da variação observada, a morfologia da asa pode ser considerada um marcador apropriado para acessar a variação interespecífica e interpopulacional existente no “cluster” *buzzatii*, apresentando, além de um alto valor taxonômico, uma grande importância na compreensão dos aspectos históricos que permearam a distribuição e diversificação das espécies desse “cluster”.



## VI - Bibliografia

- Ab'Saber, A.N. 1977. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. **Geomorfol.** **52**:1-23.
- Adams, D.C., Funk, D.J. 1996: Morphometric inferences on sibling species and sexual dimorphism in *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles: multivariate applications of the thin-plate spline. **Syst. Biol.** **46**: 180–194.
- Allen, G.E. 1975. The introduction of *Drosophila* into the study of heredity and evolution: 1900-1910. **Isis.** **66 (3)**: 322-333.
- Ansorge, J. 1994. Tanyderidae and Psychodidae (Insecta: *Díptera*) from the lower Jurassic of the northeastern Germany. **Paläont. Z.** **68**: 199-209.
- Ayala, F.J. 1965. Sibling species of the *Drosophila serrata* group. **Evolution** **19**: 538-545.
- Baimai, V., Sene, F.M., Pereira, M.A.Q.R. 1983. Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactus-breedind species of the *Drosophila repleta* species group. **Genética** **60**: 81-92.
- Barton, N.H. 2001. Speciation. **Trends. Ecol. Evol.** **16**: 325
- Barker J.S.F., Sene F.M., East P.P., Pereira M.A.Q.R. 1985. Allozyme and chromossomal polymorphism of *Drosophila buzzatii* in Brazil and Argentina. **Genética** **67**: 161-170.
- Bier, E. 2000. Drawing lines in the *Drosophila* wing: initiation of wing vein development. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 10(4):393-398.
- Biffi, F., Kuhn, G.C.S., Morales, A.C., Manfrin, M.H., Sene, F.M. 2001. Padrão cariotipico de uma area de contato entre as espécies cactófilas *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Grupo Repleta). Resumos do 49º Congresso Brasileiro de Genética.
- Bitner-Mathé, B.C., Peixoto, A.A., 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., Klaczko, L.B. 1999a. Plastitcity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. **Genética** **105**: 203-210.
- Bitner-Mathé, B.C., Klaczko, L.B. 1999b. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal and microgeographical variation. **Genetica** **105**:35-42.
- Bizzo, N.M.V. 1983. Estudo sobre a biologia e isolamento em *Drosophila serido*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Univ. de São Paulo.

- Bookstein, F., Chernoff, B., Elder, R., Humphries, J., Smith, G., Strauss, R. 1985. Morphometrics in evolutionary biology. Academy of Natural Sciences. Philadelphia, PA.
- Cansian, A.M. 1997. Diferenciação e simpatria em populações de *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae) no litoral sul do Brasil. **Dissertação de Mestrado**. FFCLRP. Univ. de São Paulo.
- Cavicchi, S., Giorgi, G., Natali, V., Guerra, D. 1991. Temperature-related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. III. Fourier and centroid analysis of wing shape and relationship between shape variation and fitness. **J.Evol Biol** **4**: 141-159.
- Corrêa, I.C.S. 1996. Lês variations du niveau de la mer Durant lês deniers 17.500 ans BP:l'exemple de la plate-forme continentale du Rio Grande do Sul – Brésil. **Marine Geology** **130**: 163-178.
- Coyne, J.A., Beecham, E. 1987. Heritability of two morphological characters within and among natural populations of *Drosophila melanogaster*. **Genetics** **117**: 727-737.
- Crozatier, M., Glise, B., Vicent, A. 2004. Patterns in evolution: veins of the *Drosophila* wing.. **Trends. Genet.** **20(10)**:498-505.
- David, J., Bocquet, C., Scheemaeker-Louis, M. 1977. Genetic latitudinal adaptation of *Drosophila melanogaster*: new discriminative biometrical traits between European and equatorial African populations. **Genet. Res.** **30**: 247-255.
- De Brito, R.A., Manfrin, M.H., Sene, F.M. 2002a. Nested cladistic analysis of brasilian populations of *Drosophila serido*. **Mol. Phylogenet. Evol.** **22**: 131-143.
- De Brito, R.A., Manfrin, M.H., Sene, F.M. 2002b. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. **Gen. Mol. Biol.** **25**: 161-171.
- Diniz-Filho, J.A.F., Malaspina, O. 1995. Evolution and population structure of africanized honeybees in Brazil: evidence from spatial analysis of morphometric data. **Evolution** **49**: 1172-1179.
- Esguícero, A.L.H., Manfrin, M.H. 2005. Variações Morfométricas entre populações de *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae). Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética.
- Fontdevila, A., Pla, C., Hasson, H., Wasserman, W., Sanches, A., Naveira, H., Ruiz, A., 1988. *Drosophila kopferae*: a new member of *Drosophila serido* (Diptera: Drosophilidae) superspecie taxon. **Ann Entomol Soc. Am** **81**:380-385
- Franco, F.F., Prado, P.R.R., Sene, F.M., Costa, L.F., Manfrin, M.H. 2006. Aedeagus morphology as a discriminant marker in two closely related Cactophilic species of *Drosophila* (Diptera; Drosophilidae) in South America. **An. Acad. Bras. Ciênc.** **78**: 203-212.
- Gilchrist, A.S., Azevedo, R.B.R., Partridge, L., O'Higgins, P. 2000. Adaptation and constraint in the evolution of *Drosophila melanogaster* wing shape. *Evol Dev* **2**: 114-124.

- Hass, H.L., Tolley, K.A. 1998. Geographic variation of wing morphology in three Eurasian populations of the fruit fly, *Drosophila lummei*. **J. Zool.** **245**: 197-203.
- Hoffmann, AA., Shirriffs, J. 2002. Geographical variation for wing shape in *Drosophila serrata*. **Evolution** **56**: 1068-1073.
- Imasheva, A.G., Bubli, O.A., Lazenby, O.E., Zhivotovsky, L.A. 1995. Geographic differentiation in wing shape in *Drosophila melanogaster*. **Genetica** **96**: 303-306.
- Klaczko, L.B., Bitner-Mathé, B.C., 1990. On the edge of a wing. **Nature** **346**: 321.
- Long, A.D., Singh, RS. 1995. Molecules versus morphology: the detection of selection acting on morphological characters along a cline in *Drosophila melanogaster*. **Heredity** **74**: 569-581.
- Machado, L.P.B., 2003. Descrição e análise de loci de microssatélite em populações naturais da espécie cactofílica *Drosophila antonietae* (DIPTERA; DROSOPHILIDAE). **Tese de Doutorado**. FMRP. Universidade de São Paulo.
- Machado, L.P.B., Manfrin, M.H., Silva-Junior, W.A., Sene, F.M., 2003. Microsatellite loci in the cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae). **Mol. Ecol. Not.** **3**: 159-161.
- Madi-Ravazzi, L., Bicudo, H.E.M.C., Manzato, J.A. 1996. Reproductive compatibility and chromosome pairing in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios** **89**: 21-30.
- Manfrin, M.H., Brito, R.O.A., Sene, F.M. 2001. Systematics and evolution of the *Drosophila buzzatii* (Díptera, Drosophilidae) “cluster” using mtDNA. **Ann. Ent. Soc. Am.** **94** (3): 333-346.
- Manfrin, M.H., Sene, F.M. 2006. Cactophilic *Drosophila* in south America: a model for evolutionary studies. **Genetica** **126**: 57-75.
- Mateus, RP., Sene, FM. 2003. Temporal and Spatial Allozyme Variation in the South American Cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae).
- Mather, K., Dobzhansky, T. 1939. Morphological Differences between the “Races” of *Drosophila Pseudoobscura*. **The American Naturalist** **73**: 5-25
- Mayr, E. 1977. Populações, Espécies e Evolução. Editora Nacional, EDUSP, São Paulo.
- Miller, D.D., Sanger, W.G. 1969. A New Trait for Distinguishing *Drosophila azteca* and *D. tolteca* from Other Members of the *D. affinis* subgroup. **American Midland Naturalist** **82**: 618-621
- Monteiro, S.G., Sene, F.M. 1995. Estudo morfométrico de populações de *Drosophila serido* das regiões central e sul do Brasil. **Rev. Bras. Genet. (Suppl)** **18**:283.
- Monteiro, S.G., Cansian, A.M., Sene, F.M. 1996. Morfometria multivariada de populações naturais de *Drosophila serido* das regiões sul e sudeste do Brasil. **Rev. Bras. Genet. (Suppl)** **19**:265.

- Moraes, EM., Manfrin, MH., Laus, AC., Rosada, RS., Bonfim., SC., Sene, FM. 2004a. Wing shape heritability and morphological divergence of the sibling species *Drosophila mercatorum* and *Drosophila paranaensis*. **Heredity** **92**: 466-473.
- Moraes, E.M., Spressola, V.L., Prado, P.R.R., Costa, L.F., Sene, F.M. 2004b. Divergence in wing morphology among sibling species of the *Drosophila buzzatii* cluster. **J. Zool. Syst. Evol. Research**. **42**: 1-5.
- Moraes, EM., Sene, FM. 2004. Heritability of wing morphology in a natural population of *Drosophila gouveai*. **Genetica** **121**: 119-123.
- Morales, AC., Manfrin, MH., Sene, FM. 2004. Entendendo as relações evolutivas de duas espécies do “cluster” *buzzatii*: *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, através da filogeografia e análise aloenzimática. **In. Anais do 50º Congresso Brasileiro de Genética**. p-400. Cd-rom.
- Morales, AC. 2005. Análise histórico evolutiva de populações das espécies cactofílicas *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Díptera, Drosophilidae). **Tese de Doutorado**. FFCLRP. Universidade de São Paulo.
- Nice, CC., Shapiro, AM. 1999. Molecular and morphological divergence in the butterfly genus *Lycaeides* (Lepoptera: Lycaenidae) in North America: evidence of recent speciation. **J. Evol Biol** **12**: 936-950.
- Patterson, J.T., Wheeler, M.R. 1942. Description of new species of the subgenera *Hirtodrosophila* and *Drosophila*. **U. Tex. Publ.** **4213**: 67-109.
- Pereira, M.A.Q.R., Vilela, C.R., Sene. 1983. Notes on breeding and feeding sites of some species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Ciência e Cultura** **35**:1313-1319.
- Prevosti, A. 1955. Geographical variability in quantitative traits in populations of *Drosophila subobscura*. **Cold Spring Harb Symb Quant Biol** **20**: 294-299.
- Roff, D.A., Bradford. M.J. 1998. The evolution of shape in the wing dimorphic cricket, *Allonemobius socius*. **Heredity** **80**:446-455.
- Rolph, FJ., Marcus, LF. 1993. A revolution in morphometrics. **Trends Ecol Evol** **8**: 129-132.
- Rohlf, FJ. 2005. TpsDig version 2.04. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York, USA.
- Ross, H.H. 1965. A text book of entomology. 3<sup>rd</sup> edn. New York: John Wiley.
- Ruiz, A., Wasserman, M. 1993. Evolutionary cytogenetics of the *D. buzzatii* species complex. **Heredity** **70**: 597-603.
- Ruiz, A., Cansian, A.M., Kuhn, G., Alves, M.R., Sene, F.M. 2000. The *Drosophila serido* speciation puzzle: putting new pieces together. **Genética** **108**: 217.

- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** **4**: 406-425.
- Sene, F.M., Pereira, M.A.Q.R., Vilela, C.R. 1982. Evolutionary aspect of cactus breeding *Drosophila* species in South América, pp. 97-106. In: J.S.F. Barker and W.T. Starmer (eds). Ecological genetics and evolution: the cactus-yeast *Drosophila* model system. Academyc, Sidney, Australia.
- Sene, F.M., Pereira, M.A.Q.R., Vilela, C.R. 1988. Contrasting patterns of differentiation inferred from traditional genetic markers in the process of speciation. **Pac. Sci.** **42**: 81-88.
- Silva, A.F.G., Sene, F.M. 1991. Morfological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). **Rev. Bras. Entomol.** **35**: 455-468.
- Snodgrass, R.E. 1993. Principles of insect morphology. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- StatSoft, Inc. 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com.
- Strigini, M., Cohen, SM. 1999. Wingless gradient formation in the *Drosophila* wing. **Curr. Biol.** **10(6)**:293-300.
- Tidon-Sklorz, R., Sene, F.M. 1995. *Drosophila seriema*: A new member of the *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae) superspecies taxon. **Ann. Ent. Soc. Am.** **88**:139-142.
- Tidon-Sklorz, R., Sene, F.M. 2001. Two new species of the *D. Serido* sibling set (Diptera, Drosophilidae). **Iheringia, Sér. Zool.** **90**: 141-146.
- Turelli, M., Barton, NH., Coyne, JA. 2001. Theory an speciation. **Trends Ecol Evol** **16**: 330-343.
- Vanzolini, PE. 1981. A quasi-historical approach to the natural history of the differentiation of reptiles in tropical geographical isolates. **Papéis Avulsos Zool** **34**: 189.
- Vilela, C.R., Sene, F.M. 1977. Two new neotropical species of the repleta group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Papéis Avulsos Zool.**, São Paulo Brasil. **30**:295-299.
- Vilela, C.R. 1983. A revision of the *Drosophila repleta* group (Diptera, Drosophilidae). **Rev. Bras. Ent.** **27**: 1-114.
- Wasserman, M. 1992. Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. In Krimbas C.B. e Powell J.R. (eds). *Drosophila* inversion polymorphism. CRC Press, Boca Ratón Fla. P. 455-552.
- Webber, KE., Eisman, R., Morey, L., Patty, A., Sparks, J., Tausek, M. 1999. An analysis of polygenes affecting wing shapeon chromossome 3 in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** **153**: 773-786.
- Webber, KE., Eisman, R., Higgins, S., Morey, L., Patty, A., Tausek, M. 2001. An analysis of polygenes affecting wing shapeon chromossome 2 in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** **159**: 1045-1057.

Wootton, R.J. 1990. The mechanical designing of insect wings. **Scient. Am.** **263**: 114-120.

Wootton, R.J. 1992. Functional morphology of insect wings. **Annu. Rev. Ent.** **37**: 113-140.

Zimmerman, E., Palsson, A., Gibson, G. 2000. Quantitative trait loci affecting components of wing shape in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** **155** (2):671-683.

### **- Fontes da Internet**

AxioVision 4.3, ([http://www.zeiss.de/C12567BE00472A5C/EmbedTitelIntern/ReadMeHotfix4d\\_e/\\$File/AxioVision\\_Rel4\\_3Hotfix4ReadMe.txt](http://www.zeiss.de/C12567BE00472A5C/EmbedTitelIntern/ReadMeHotfix4d_e/$File/AxioVision_Rel4_3Hotfix4ReadMe.txt)).