

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**“Análise morfométrica da variação fenotípica em edeagos de populações naturais de  
*Drosophila serido* (“cluster” *Drosophila buzzatti*) ”**

**Paulo Mangano de Almeida Santos**

**Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.**

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2014**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**“Análise morfométrica da variação fenotípica em edeagos de populações naturais de  
*Drosophila serido* (“cluster” *Drosophila buzzatti*)”**

**Paulo Mangano de Almeida Santos**

**Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.**

**MSc. Taís Carmona Lavagnini - Orientadora**

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2014**

## **Agradecimentos**

- À Taís Carmona Lavagnini pela disponibilidade e pela boa vontade, cuja orientação precisa tornou possível a execução de tanto em tão pouco tempo.
- À Prof. Dra. Maura Helena Manfrin por abrir as portas do laboratório de genética evolutiva, me recebendo com prontidão e dedicação tanto frente a sucessos quanto fracassos.
- À Cíntia Graziela Santos pelo inestimável auxílio com as análises estatísticas, sempre passado de maneira clara e objetiva.
- Aos meus pais Liliane Mangano de Almeida Santos e Antonio Carlos de Almeida Santos pelo apoio incondicional e irrestrito, tornando possível meu desenvolvimento pessoal e acadêmico, sempre demonstrando muito amor e uma infindável paciência.
- À todas as companheiras do laboratório de genética evolutiva, que tornaram minha recepção muito tranquila e sempre divertida, compartilhando sempre que possível os conhecimentos e técnicas que dominam com maestria.
- Ao meu namorado Gabriel José Teixeira que sempre me apoiou e apoia, pelos quatro anos de companhia e ajuda sempre que necessário, mesmo frente a situações adversas, tornando minha graduação mais bonita e com muito mais amor.
- Ao conjunto de professores do departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras sempre dedicados ao ensino e à formação de seus alunos como cidadãos concientes e críticos.
- Finalmente, à todos aqueles não citados que direta ou indiretamente contribuíram com meu avanço pela graduação, minha formação crítica e acadêmica e com a formulação da presente monografia, minha gratidão se estende além de minha falha memória.

## Resumo

*Drosophila serido* é uma espécie cactofílica e politípica, pertencente ao “cluster” *Drosophila buzzatti*, considerada como um importante modelo para pesquisas biológicas na área de evolução por sua associação ecológica obrigatória com cladódios de cactos em decomposição, onde se desenvolvem suas larvas; são conhecidas ,através de caracteres moleculares, principalmente inversões cromossômicas, placas metafásicas e sequências mitocondriais COI, duas linhagens evolutivas dentro de *Drosophila serido*, as populações da região nordeste e as populações da costa atlântica sudeste. O caráter taxonômico morfológico mais usado para identificação de espécies neste “cluster” é o edeago. Com o intuito de avaliar o isolamento reprodutivo entre as linhagens de *Drosophila serido*, e avaliar sua distribuição geográfica, este trabalho analisou morfometricamente 95 edeagos provenientes de 18 populações coletadas nas regiões nordeste, sudeste e sul do Brasil, incluindo populações usadas por Franco et al. (2008) e expandindo sua análise. As análises morfométricas baseadas em forma dos edeagos mostraram 70% de eficiência na discriminação de linhagens de *D. serido*, separando-as em três agrupamentos; o primeiro, “Norte”, contendo populações do noroeste da Bahia e sudeste do Piauí, o segundo, “Sudeste”, de Santa Catarina até a porção sul da Bahia e o terceiro, “Nordeste”, contendo populações da região nordeste do Brasil, a partir do norte da Bahia. O teste de Mantel não apontou correlação entre distância geográfica e acúmulo de variação morfológica entre as linhagens. O presente trabalho discutiu estes resultados à luz de comparações com os achados de Franco et al. (2008) e do trabalho em andamento por Lavagnini T. C. (comunicação pessoal), levantando duas hipóteses não excludentes que poderiam explicar a maior divergência do grupo “Norte” mesmo este contendo haplótipos derivados, sendo estas a hipótese ecológica, onde predomina a seleção por cacto hospedeiro, e a histórica, onde predominariam eventos históricos como eventos de fluxo gênico na linhagem. Este trabalho levantou indícios que apontam para mecanismos de pleiotropia atuando sobre a evolução do edeago em *D. serido*, embora sejam ainda insuficientes para excluir os efeitos da seleção sexual sobre a variabilidade de formas. Mais estudos na área de ocorrência do grupo “Norte” podem trazer novas evidências sobre como se deu a evolução desta linhagem e se os padrões observados realmente indicam pleiotropia.

## Sumário

<b>1 - Introdução.....</b>	<b>6</b>
1.1 - Conceitos e delimitação de espécies.....	6
1.2 - O isolamento reprodutivo .....	7
1.3 - Modelo biológico: <i>Drosophila serido</i> .....	9
1.3.1 – Populações do Nordeste .....	10
1.3.2 – Populações do Litoral.....	11
1.4 – A morfologia do edeago.....	12
<b>2 – Objetivos .....</b>	<b>12</b>
<b>3 - Materiais e métodos.....</b>	<b>13</b>
3.1 – Amostras e preparação dos edeagos.....	13
3.2 - Análise estatística .....	13
<b>4 - Resultados.....</b>	<b>17</b>
<b>5 - Discussão.....</b>	<b>23</b>
<b>6 - Conclusões .....</b>	<b>27</b>
<b>7 - Referências Bibliográficas .....</b>	<b>28</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>35</b>

## 1 - Introdução

### 1.1 - Conceitos e delimitação de espécies

A definição de espécie sofre constante controvérsia, e com muita frequência são propostos novos e alternativos conceitos para o termo. Esta diversidade de conceitos, em uma análise primária, viria a impactar a definição e a integralidade de espécie como entidade biológica e gerar dúvidas quanto à validade das análises que especulam sobre a origem e dinâmica das mesmas, uma vez que poderia gerar incongruências quanto ao significado que cada autor adota durante sua análise. No entanto, a existência destes diversos conceitos são reflexo das diferentes ênfases sobre aspectos da mesma entidade, dependendo do alvo de cada teórico, deste modo o conceito geral de espécie não é tão heterogêneo quanto a diversidade de definições pode sugerir (De Queiroz, 1998).

De modo geral, o ponto central das diferentes definições de espécie compartilhadas entre os autores que se debruçam sobre esta problemática, é que espécies são linhagens constituídas por populações, ou grupos populacionais, que evoluem independentemente, daí o conceito de “Linhagem Evolutiva”. Mesmo assim De Queiroz (1998) afirma que em diversos autores as questões sobre a dinâmica destas linhagens ainda são controversas. Foi sugerido então, baseado nessa conclusão, que o conceito de populações ou metapopulações que apresentam evolução independente deveria ser o único fator delimitante de espécie como entidade biológica, de modo a unificar os conceitos conflitantes. Desta forma De Queiroz (2007) resume propriedades como distinção fenética, monofiletismo, isolamento reprodutivo e divergência ecológica, ao papel de propriedades contingentes, ou auxiliares, e portanto não mais seriam necessárias para a definição de uma linhagem como uma espécie, embora mantenha a importância destas propriedades contingentes como indicadores de independência (De Queiroz 2007). Sendo assim, este trabalho adotou esta definição de espécie unificada.

O estudo de como fatores históricos, como barreiras ambientais, processos históricos e fluxo gênico podem afetar a dinâmica das populações é alvo de estudo da

Biologia Evolutiva, que se propõe a reconstruir o histórico destas espécies tendo em vista a complexidade intrínseca aos modelos biológicos (Kokudai 2013).

Tradicionalmente os objetos de estudo da taxonomia ao longo de muitos anos foram as características morfológicas observáveis com ou sem auxílio de aparatos ópticos, comportamentos e/ou as distribuições geográficas das espécies. Porém, com o sequenciamento de DNA, informações extras podem ser incluídas na análise dos dados. Dados moleculares associados a modelos estatísticos derivados da filogeografia são muitas vezes eficientes para a delimitação de espécies, mas em muitos casos pode ser necessária a análise morfológica como forma de apoio e/ou elucidação de hipóteses levantadas a partir de sequências de DNA (Cook et al., 2010; Avise 2000 apud Franco et al.; Franco et al. 2008; Hey 2001 apud Kokudai; Kokudai 2013). Estes marcadores morfológicos podem elucidar questões sobre a variação e a distribuição genética das entidades populacionais, uma vez que traços morfológicos estão muitas vezes sob controle poligênico, ou seja, vários genes são responsáveis pela regulação destes marcadores. Por este motivo podem muitas vezes denotar padrões de diferenciação que não são visíveis ao se analisar apenas marcadores moleculares únicos, assim como podem ser característica alvo de seleção quando ela se aplica. Desta forma, a análise que inclui marcadores morfológicos é geralmente mais profunda, e levanta dados quanto à variação em diversos níveis, bem como a origem desta variação (Garnier et al., 2005).

## 1.2 - O isolamento reprodutivo

Uma vez que o conceito de espécie adotado pressupõe a independência evolutiva das linhagens, compreender o processo de especiação requer que se identifiquem, além de outros eventos já citados como auxiliares à definição de uma espécie, as barreiras que impedem ou reduzem o fluxo gênico entre as linhagens.

A eficiência das barreiras, sejam elas de caráter físico ou de caráter fisiológico, pode ser usada, de modo geral, para inferir o status de linhagens evolutivas divergentes, sendo que essas linhagens podem apresentar diversos graus de isolamento reprodutivo, desde linhagens pouco isoladas, até plenamente diferenciadas, com algum ou nenhum fluxo gênico entre elas (Noor et al., 2001).

Para não causar incerteza quanto às definições, o termo isolamento reprodutivo deve ser considerado como um conceito composto, uma vez que a limitação do fluxo gênico pode decorrer de diferentes razões, podendo elas, de modo geral, serem divididas em pré ou pós zigóticas. Nas denominadas pré zigóticas, o isolamento reprodutivo ocorre anterior à formação do zigoto, e muito comumente anterior à cópula em si, como exemplos podem ser citados a seleção natural contra imigrantes dentre nichos ecológicos (Nosil, P. et al. 2005), o aumento da tendência de ocorrerem cruzamentos preferenciais via seleção sexual ou barreiras geográficas vicariantes que impeçam o encontro dos indivíduos, separando efetivamente as populações. Já no isolamento reprodutivo pós zigótico (pós formação de zigoto) podem ser incluídas: seleção disruptiva, seleção estabilizadora, ou ainda queda do sucesso reprodutivo atrelada a zigotos inviáveis ou inférteis em linhagens híbridas (Mallet 2005; Mallet 2006).

Sobre este aspecto, o levantamento bibliográfico de Coyne e Orr (1989) levanta cinco observações importantes a se considerar quando trata-se do conceito de isolamento reprodutivo, são elas:

- Os isolamentos reprodutivos pré e pós zigóticos aumentam quanto maior o tempo de divergência entre táxons, dado que já exista comprometimento do fluxo gênico entre linhagens que permita mudanças genéticas graduais, de modo que a força de ambos os tipos de isolamento é progressiva e, por conseguinte, distâncias genéticas muito grandes refletem linhagens evolutivas fortemente isoladas.
- A rapidez com que o isolamento pré zigótico se estabelece em linhagens simpátricas é maior do que a do isolamento pós zigótico, enquanto que em linhagens alopátricas a taxa de ambos é constante, indicando que em linhagens de baixas distâncias genéticas geograficamente isoladas ambos os efeitos são igualmente fortes, enquanto que em linhagens com contato geográfico o isolamento pré zigótico exerce maior força.
- Inviabilidade e esterilidade dos híbridos evoluem a taxas similares, e ambas seguem a regra de Haldane, que dita de modo geral que se nos híbridos F1

(primeira geração) entre duas espécies um gênero é ausente, raro ou estéril, este gênero é sempre o heterogamético (Haldane, 1922).

- O caminho pelo qual se desenvolve o isolamento pós zigótico se dá primeiro pela aparição de inviabilidade ou esterilidade no gênero heterozigoto, e posteriormente no gênero homozigoto, esta conclusão também está de acordo com a regra de Haldane.
- Existe um distanciamento genético significativo entre espécies que apresentam híbridos inviáveis apenas em gênero heterozigoto, e espécies que apresentam híbridos inviáveis em ambos os gêneros; isso significa que a divergência entre linhagens que apresentam ambos os gêneros inviáveis ou estéreis é muito mais antiga.

Uma vez que o isolamento reprodutivo pós zigótico completo esteja estabelecido entre duas linhagens, pode-se considerar com segurança de que se trata de duas linhagens evolutivas independentes (Sobel et al., 2009, Kokudai 2013), e é por esta razão que a definição de espécie como entidade biológica proposta por De Queiroz (2007) considera este como um fator auxiliar de grande importância em sua delimitação, embora não seja intrinsecamente necessário.

Tendo em vista o conceito de espécie como linhagem evolutiva independente (De Queiroz 2007), e o conceito de isolamento reprodutivo como sinalizador da independência destas linhagens (Coyne e Orr 1989) pode-se concluir que pela análise do isolamento entre populações de uma espécie, no sentido taxonômico clássico, é possível inferir quão distantes evolutivamente estas populações são entre si, ou seja, do quão independentes são estas linhagens, e seguindo o primeiro preceito de Coyne e Orr (1989), também comparar o tempo de divergência entre estas populações, de modo a reconstruir seu histórico evolutivo.

### 1.3 - Modelo biológico: *Drosophila serido*

*D. serido* é uma espécie endêmica do Brasil, e parte integrante do “cluster” *D. buzzatii* e foi descrita em 1977 a partir de coletas na localidade de Milagres, estado da Bahia (Vilela e Sene, 1977), sendo considerada atualmente como um importante modelo para pesquisas biológicas na área de evolução (Manfrin & Sene 2006). A

validade desta espécie como modelo vem da associação ecológica obrigatória com cladódios de cactos em decomposição, sendo este o único ambiente conhecido em que se desenvolvem as larvas de *D. serido* (Pereira et al. 1983). Devido ao fato das cactáceas terem baixa tolerância a solos úmidos, estas podem ser consideradas como boas indicadoras de regiões secas, e uma vez que a distribuição das cactáceas segue a das Florestas Tropicais Sazonalmente Secas, e esta pode ter sido alterada pelas flutuações paleoclimáticas do Quaternário, a das *Drosophilas* cactofílicas, por sua especificidade ecológica, tende a seguir a mesma distribuição (Ab' Sáber, 1977; Franco & Manfrin 2013).

A espécie *D. serido* tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo no domínio da Caatinga, estados de Goiás e Minas Gerais, e costa atlântica. As populações desta espécie são caracterizadas pela presença da inversão fixa  $2x^7$  (Wasserman & Richardson, 1987) e edeago morfotipo “A” (Silva & Sene, 1991), embora exista variação morfológica ao longo de sua distribuição geográfica (Franco et al., 2008). Populações desta espécie estão associadas a várias espécies de cactos, como: *Cephalocereus piauhyensis*, *Cereus hildmaniannus*, *Cereus fernambucensis*, *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia monacantha* (Pereira et al., 1983; Manfrin & Sene, 2006). Análises de hidrocarbonetos da cutícula (Oliveira et al., 2011), inversões cromossômicas polimórficas (Tosi & Sene, 1989; Ruiz et al., 2000), diversidade haplotípica mitocondrial (Manfrin et al., 2001; Morales, 2005; Franco & Manfrin 2013) e análises cariotípicas (Baimai et al., 1983) sugerem a existência de dois grupos populacionais em *D. serido*: as populações do nordeste e do litoral.

### 1.3.1 – Populações do Nordeste

As populações do nordeste de *D. serido* apresentam as inversões cromossômicas polimórficas  $2a^8$ ,  $2b^8$ ,  $2c^8$  e  $2d^8$  (Tosi & Sene, 1989) e são homogêneas para a maioria dos marcadores utilizados até o momento (Baimai et al., 1983; Silva e Sene, 1991; Ruiz et al., 2000; Franco et al., 2008; Franco & Manfrin, 2013). Análises filogeográficas para estas populações, usando sequências parciais do gene mitocondrial COI (De Brito et al., 2002; Franco & Manfrin, 2013), sugerem que o centro de dispersão desta espécie é o interior do Estado da Bahia, em localidades próximas à

Chapada Diamantina e que os eventos de expansão se iniciaram há aproximadamente 40 mil anos. A partir desta região, expansão de área em direção ao norte explica a colonização de localidades na Chapada da Borborema-PB, e em direção ao litoral (Franco & Manfrin 2013).

### 1.3.2 – Populações do Litoral

As populações ao longo da costa atlântica apresentam certa complexidade evolutiva, sugerida pela não congruência e politipia observada em diversos marcadores utilizados. As populações dos estados de São Paulo e Santa Catarina apresentam, sobre a inversão  $2x^7$ , a inversão cromossômica fixa  $2y^9$  e, sobre esta, as inversões  $2x^8$  e  $2w^8$  (Ruiz *et al.*, 2000). Com relação às placas metafásicas, foram descritos: cromossomos metafásicos tipo III em Arraial do Cabo-RJ, tipo IV em Peruíbe-SP, e um outro tipo em Florianópolis-SC (Baimai *et al.*, 1983; Biffi *et al.*, 2001). A análise da variação morfológica dos edeagos em populações de *D. serido* também evidenciou a presença de dois grupos distintos na costa atlântica: um grupo com as populações de Bertioga-SP e Penha-SC e o outro grupo com as populações de São Sebastião-SP e Arraial do Cabo-RJ (Franco *et al.*, 2008).

Análises filogeográficas para estas populações, com base em sequências parciais do gene mitocondrial COI (Morales, 2005), sugeriram que as populações do litoral formam um grupo isolado das populações do Nordeste, agrupando as populações do estado de São Paulo até o litoral sul do estado da Bahia, e que as populações do litoral do estado de Santa Catarina e de *D. serido* da Caatinga formam um grupo (Morales, 2005; Kokudai *et al.*, 2011).

Resultados preliminares obtidos por Lavagnini T. C. (comunicação pessoal), por meio de análises filogeográficas utilizando os genes nuclear *period* e mitocondrial COI, concordam com a homogeneidade populacional observada pelos outros marcadores utilizados. Contudo, quanto à estruturação das populações ao longo do litoral atlântico, há divergência entre os marcadores. O gene nuclear *period* sugere que todas as populações desde o sul da Bahia até Santa Catarina formam um único grupamento, denominado “Sudeste”, enquanto que para o gene mitocondrial COI elas estariam divididas em dois grupamentos, sendo que as populações de Santa Catarina estariam

geneticamente isoladas das demais, formando o grupamento “Sul”. Neste trabalho, foram analisadas também populações da região noroeste da Bahia e sul do Piauí, sendo que os resultados preliminares sugerem que elas constituem uma terceira linhagem evolutiva de *D. serido*.

#### 1.4 – A morfologia do edeago

Em *Drosophila*, o principal caráter taxonômico morfológico é a genitália masculina (edeago). A evolução rápida e divergente destas estruturas é um dos padrões mais observados de diversificação morfológica (Arnqvist, 1997; Eberhard, 1993; 2001; Garnier et al. 2005, Soto et al. 2007). Refletindo o padrão da regra de Haldane de aparecimento inicial de divergências no gênero heterozigoto.

1. Para explicar a evolução da genitália masculina foram propostas algumas hipóteses: Pleiotropia, definida como o efeito que um locus pode ter sobre mais de um traço fenotípico (Stearns, 2010), supõe que a variabilidade do edeago seria a princípio neutra, e que a seleção sobre outros fenótipos, poderia afetar por pleiotropia a morfologia do edeago;
2. Chave-fechadura, pressupõe seleção estabilizadora para forma da genitália, uma vez que a divergência morfológica levaria a queda da taxa de cruzamentos,
3. Seleção sexual, que diferentemente do modelo chave-fechadura pressupõe que a forma do edeago esteja sob seleção por sucesso de fertilização.

## 2 – Objetivos

Este trabalho teve como objetivos primários:

- Avaliar a variação morfológica existente no edeago de *D. serido*.
- Reavaliar os resultados/hipóteses de Franco et al. (2008) quanto à viabilidade da morfologia do edeago como marcador na separação de linhagens de *D. serido*, em virtude da inclusão de novas populações amostradas.
- Formular hipóteses de agrupamentos populacionais prováveis baseadas em morfometria do edeago, caso este se mostre viável como indicador na separação das linhagens, e comparar com resultados prévios de dados morfológicos (Franco et al., 2008) e moleculares (Manfrin et al., 2001; De Brito

et al., 2002; Morales, 2005; Franco & Manfrin 2013; Lavagnini, T. C. comunicação pessoal).

- Reavaliar as hipóteses de estruturação genética, sugeridas por Lavagnini & Manfrin (em preparação), com sequências do gene mitocondrial *COI* e nuclear *period*.

### 3 - Materiais e métodos

#### 3.1 – Amostras e preparação dos edeagos

Foram utilizadas na análise 95 edeagos provenientes de 18 populações coletadas em seus ambientes naturais (Figura 1, Tabela 1).

Foram preparadas lâminas de edeago segundo método de Kaneshiro (1969). As lâminas então foram observadas em microscópio óptico (Axioplan2 Zeiss) equipado com câmera fotográfica (Axiovision Zeiss), e foram capturadas imagens no aumento 100x. Os contornos foram então delineados no programa Corel Draw x6 (Corel Graphics Suite X6 - Corel corporation 2012) como desenhos vetoriais utilizando bézier com 11 âncoras, depois convertidos em formato bitmap (bmp).

#### 3.2 - Análise estatística

Os dados sobre os contornos foram extraídos a partir do pacote de *softwares* SHAPE 1.3 (Iwata; Ukai 2002) que se utiliza dos métodos descritivos baseados em elipses de Fourier (Kuhl & Giardina, 1982). Em linhas gerais se utiliza da soma de coeficientes seno-cosseno das séries de Fourier para descrever contornos complexos, cada função da série, definida como uma harmônica, é delimitada por quatro coeficientes, e quando aplicadas em elipses sobre formas complexas gera dados quantitativos que refletem diretamente a forma analisada, quanto mais harmônicas em uma elipse de Fourier maior é a precisão do contorno analisado (Liu et al., 1996).

Consequentemente maior a quantidade de coeficientes gerados, coeficientes estes que foram então analisados através de matriz variância-covariância pelo pacote SHAPE e agrupados em componentes principais (PCs). Cada componente principal é resumidamente um agrupamento estatístico de variáveis dependentes, de modo que cada um deles seja independente entre si, ou seja, cada componente principal possui

**Tabela 1:** Populações amostradas de *Drosophila serido* em trabalhos anteriores e armazenadas no laboratório, as colunas representam, da esquerda para a direita, a localidade de onde foi retirada cada amostra, o código de coleta de cada população, os nomes dos coletores, a data onde cada coleta foi realizada, as coordenadas geográficas e o N amostral de cada população usada neste estudo.

Localidade	Pop	Coletores	Data de coleta	Coordenadas	N
Milagres-BA	J92	Morales AC, Kuhn GCS, Franco FF, Brisson JA	23-III-2002	11,20°S, 39,90°W	4
Mucuri-BA	N32	Sene FM, Franco FF, Almeida JG	04 a 12-VII-2005	18,00°S, 39,42°W	5
Cabrália-BA	N35	Sene FM, Franco FF, Almeida JG	04 a 12-VII-2005	16,31°S, 39,01°W	5
Itaúnas-ES	N31	Sene FM, Franco FF, Almeida JG	04 a 12-VII-2005	18,41°S, 39,70°W	5
Arraial do Cabo-RJ	N20	Morales AC, Franco FF, Silva-Bernardi ECC	14 a 20-III-2004	23,00°S, 42,00°W	5
São Sebastião-SP	N17	Morales AC, Franco FF	05 a 09-X-2003	23,82°S, 45,42°W	5
Bertioga-SP	H49	Sene FM, Monteiro SG, Ruiz A	10 a 18-V-1995	23,90°S, 46,10°W	5
Penha-SC (Praia Grande)	J52	Dados indisponíveis	Dados indisponíveis	26,75°S, 48,66°W	5
Riacho-BA	R27	Lavagnini TC, Leal DYB, Manfrin MH, Mateus RP	15 a 22-IX-2012	09,61°S, 38,22°W	4
Penedo-AL	R30	Lavagnini TC, Leal DYB, Manfrin MH, Mateus RP	15 a 22-IX-2012	10,32°S, 36,52°W	6
Russas-CE	R36	Lavagnini TC, Leal DYB, Lavagnini AC, Lavagnini MC	23 a 30-VI-2012	04,85°S, 38,04°W	6
Lajes Pintadas-RN	R37	Lavagnini TC, Leal DYB, Lavagnini AC, Lavagnini MC	23 a 30-VI-2012	06,17°S, 36,11°W	6
Bom Jesus-RN	R38	Lavagnini TC, Leal DYB, Lavagnini AC, Lavagnini MC	23 a 30-VI-2012	06,02°S, 35,65°W	6
Maxaranguape-RN	R39	Lavagnini TC, Leal DYB, Lavagnini AC, Lavagnini MC	23 a 30-VI-2012	05,54°S, 35,27°W	6
Casa Nova-BA	R41	Lavagnini TC, Leal DYB, Lavagnini AC	20 a 29-VIII-2012	09,24°S, 41,16°W	6
Remanso-BA	R42	Lavagnini TC, Leal DYB, Lavagnini AC	20 a 29-VIII-2012	09,48°S, 42,25°W	5
Wall Ferraz-PI	R44	Lavagnini TC, Leal DYB, Lavagnini AC	20 a 29-VIII-2012	07,31°S, 41,91°W	6
Almenara-MG	R56	Lavagnini TC, Leal DYB, Lavagnini AC	19 a 28-IX-2013	16,00°S; 40,95°W	5



**Figura 1:** Localização geográfica das populações de *Drosophila* serido analisadas. Para o código de cada população ver tabela 1.

informações quantitativas sobre um agrupamento de outras variáveis, e, portanto pode reduzir em grande parte a complexidade e a dimensionalidade de uma análise multivariada, de modo que a complexidade da análise posterior seja também reduzida (Rohlf & Archie 1984).

O pacote SHAPE então ordena os PCs segundo a contribuição das variáveis que eles representam para a variação da forma. Baseando-se nas análises prévias de Franco et al. (2008) e Kokudai (2013) este trabalho considerou para a análise de

Fourier 25 harmônicas, gerando um total de 100 coeficientes. Estes foram agrupados em PCs segundo relevância, de maneira que em apenas 2 ou 3 destes componentes se demonstrasse a maior parte desta variação.

A seguir foi realizado um tratamento estatístico sobre os PCs, a fim de extrair as informações quantitativas da forma e aplicá-la na análise das populações; são componentes deste tratamento:

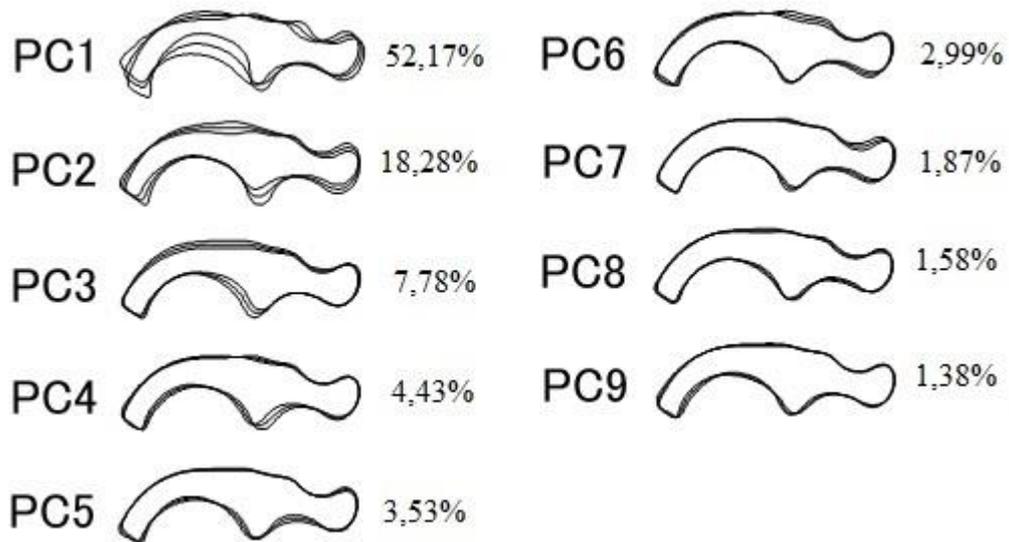
- Teste Shapiro-Wilks: através dele é possível verificar a normalidade dos componentes principais, ou seja, se estes são provenientes de uma distribuição normal. Este teste pressupõe como hipótese nula a normalidade da distribuição, portanto *p-values* maiores que 0,05 apontam normalidade. (Statsoft - Statistica 10).
- Análise discriminante: a análise da função discriminante permite testar estatisticamente as discrepâncias entre populações, tomando cada uma delas como uma variável de agrupamento e testando padrões entre seus PCs, no processo aferindo a significância de cada componente principal para a classificação. Uma vez verificada a significância dos PCs uma matriz de distâncias de Mahalanobis e uma matriz de reclassificação foram formuladas, através das quais é possível aferir respectivamente a distância estatística entre cada população, o que reflete a distância morfológica entre elas, e a eficiência da classificação de populações através da morfologia do edeago. (Statsoft - Statistica 10)
- Teste de mantel (XLSTAT - 2014): utilizando como dados de entrada as matrizes de distâncias de Mahalanobis e as distâncias geográficas entre populações, o teste de Mantel pode aferir se existe correlação entre a modificação morfológica do edeago ao longo da história evolutiva e a distância entre cada população no espaço. A matriz de distâncias geográficas foi obtida através do programa GDMG (Geographical Distance Matrix Generator) a partir dos dados de latitude e longitude apresentados na Tabela 1.
- Árvore de relações fenéticas: A partir da matriz de distâncias de Mahalanobis foi formulada no programa MEGA v6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar 2013), através do algoritmo UPGMA (*Unweighted Pairwise Group*

*Method with Arithmetic Mean*) um fenograma, de modo a identificar relações de similaridade bruta entre as populações de acordo com o caráter morfológico.

- Análise de correlação canônica (Statsoft - Statistica 10): através da análise de correlação canônica é possível quantificar a associação entre grupos de variáveis comparando-se suas combinações lineares, cada combinação linear é uma variável canônica e cada par de variáveis canônicas é uma raiz canônica, foram então obtidas as raízes canônicas para cada indivíduo de cada população, de modo que cada raiz canônica fosse reflexo das correlações de cada PC (ou seja, a primeira raiz reflete o primeiro PC), então os valores de cada indivíduo foram plotados em gráfico de dispersão e as populações foram agrupadas segundo os grupos obtidos na análise de relações fenéticas. Foram também formulados gráficos de dispersão baseados nos agrupamentos levantados por Lavagnini T. C. (comunicação pessoal) e Franco et al. (2008) de modo que as hipóteses pudessem ser visualmente comparadas. Foram escolhidas para este passo as raízes 1 e 2 que refletem em conjunto a maior parte da variação, assim como os PCs por elas refletidos uma vez que o pacote SHAPE os hierarquiza por relevância.
- ANOVA: com a intenção de adicionar robustez a análise dos agrupamentos pelas raízes canônicas, foi também realizada uma ANOVA multivariada dos PCs 1 e 2 tendo como variável preditora os mesmos agrupamentos já testados no item anterior.

#### **4 - Resultados**

A variação presente nos 100 coeficientes das 25 harmônicas foi reduzida a nove PCs, que em conjunto são responsáveis por explicar 94% da variação de forma nos edeagos (Figura 2), e foram então considerados como variáveis quantitativas válidas da forma nas análises posteriores.



**Figura 2:** Representação gráfica dos componentes principais obtidos a partir do contorno de edeagos de *Drosophila serido*. Ao lado de cada representação se encontra o percentual de variação explicado por cada PC.

Todos os componentes principais apresentaram W de Shapiro-Wilks superior à 0,97 e *p-value* superior à 0,05. Desta forma todos os PCs puderam ser pressupostos como provenientes de distribuições normais, logo para análises subsequentes os dados foram considerados como paramétricos (Tabela 2).

Na análise discriminante foi detectada diferenciação significativa entre as populações, (Lambda-Wilks= 0,00370; *p-value*<0,0001), e apontou como significativos oito dos nove PCs, sendo que o PC8 foi considerado não significativo, portanto não foi incluso na análise de classificação. (Tabela 2)

A tabela de reclassificação (Anexo 1) apontou aproximadamente 70% de identificações corretas, e o teste de Mantel que se utilizou da matriz de distâncias de Mahalanobis (Anexo 2) e a de distâncias geográficas (Anexo 3) retornou negativo, ou seja, não é possível afirmar que existe correlação entre distâncias geográficas e a variação morfológica. (Anexo 4)

A análise de fenograma mostrou separação entre três grupos distintos (Figura 3), um grupo contendo as populações de Casa Nova-BA (R41), Remanso-BA (R42) e Wall Ferraz-PI (R44), tratado como grupamento “Norte”; um grupo contendo as populações de Penha-SC (J52), Cabrália-BA (N35), Bertioga-SP (H49), Itaúnas-ES (N31) e

Tabela 2: Valores dos coeficientes W de Shapiro-Wilk e Lambda de Wilks bem como seus p-values associados, com base no contorno de edeagos de *Drosophila serido*.

	Shapiro-Wilk		Análise Discriminante	
	W	p-value	$\lambda$ Wilks	p-value
PC1	0,97748	0,10063	0,016016	0,000000
PC2	0,98722	0,49032	0,011282	0,000000
PC3	0,97724	0,09664	0,006225	0,001797
PC4	0,98976	0,67945	0,005596	0,019865
PC5	0,98441	0,32118	0,006594	0,000437
PC6	0,99037	0,72645	0,008780	0,000000
PC7	0,98851	0,58326	0,005491	0,029337
PC8	0,97563	0,07325	0,005260	0,067666
PC9	0,98636	0,43303	0,005712	0,012840

Mucuri-BA (N32), tratado como grupamento “Sudeste”; e um terceiro grupo contendo as populações de Riacho-BA (R27), São Sebastião-SP (N17), Lajes Pintadas-RN (R37), Milagres-BA (J92), Russas-CE (R36), Bom Jesus-RN (R38), Penedo-AL (R30), Maxaranguape-RN (R39) e Almenara-MG (R56), tratado como grupamento “Nordeste”, sendo que a população de Arraial do cabo-RJ (N20) não se agrupou com nenhuma outra população.

Não foram levantadas evidências morfológicas concordando com a hipótese levantada pelo gene mitocondrial COI do trabalho de Lavagnini T. C. (comunicação pessoal), de que os grupamentos “Sul” e “Sudeste” sejam de fato dois grupos separados (Figura 4); de modo semelhante a ANOVA, realizada apenas com as populações da região sudeste usadas por Franco et al. (2008), não retornou significância ( $p= 0,06529$ ) na separação entre os grupos por ele nomeados “Norte” e “Sul”, bem como não concordou com as populações de Arraial do Cabo e São Sebastião não estarem agrupadas. (Figura 5)

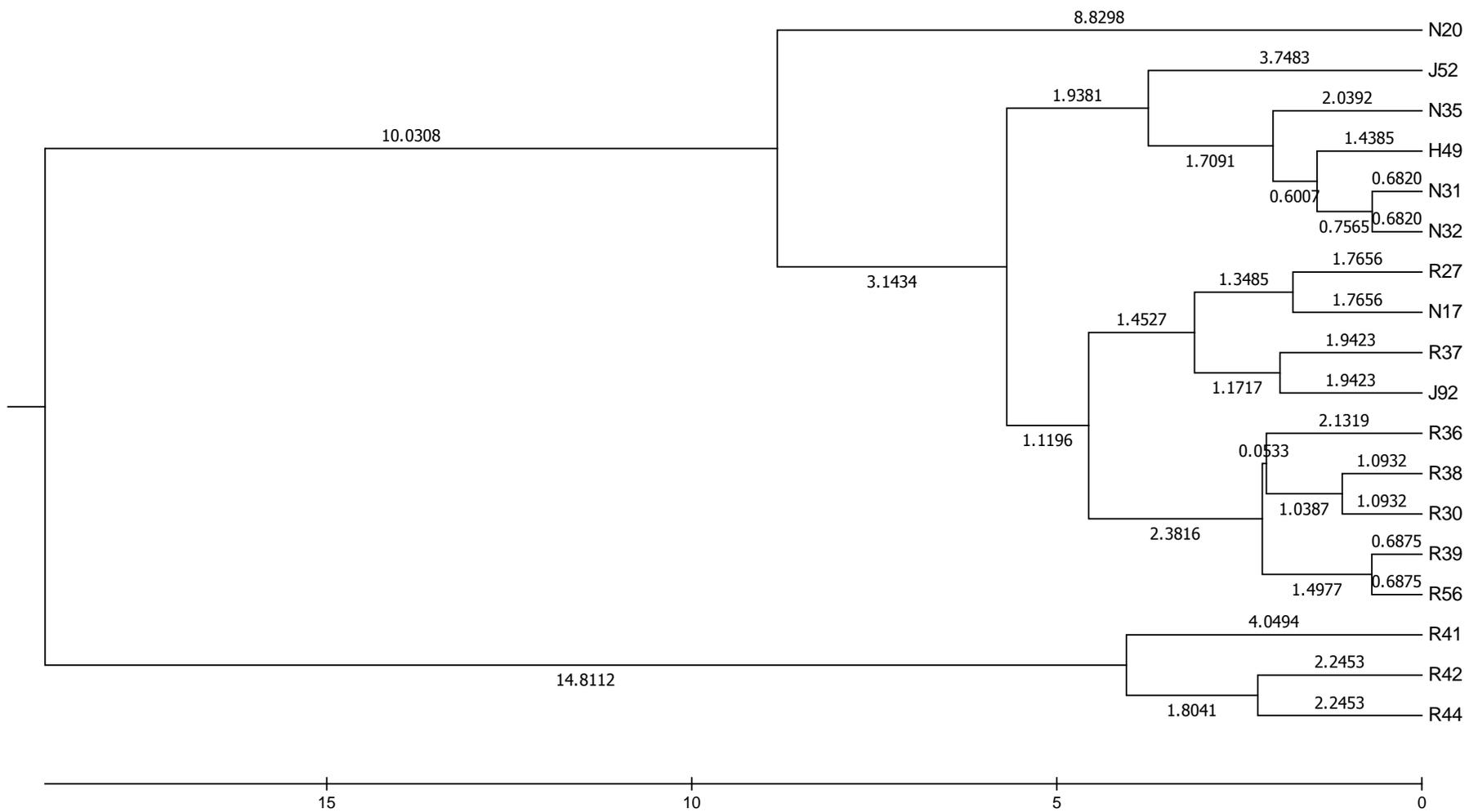


Figura 3: Árvore UPGMA de relações fenéticas entre populações de *Drosophila serido*. Valores referem se a distância de Mahalanobis.

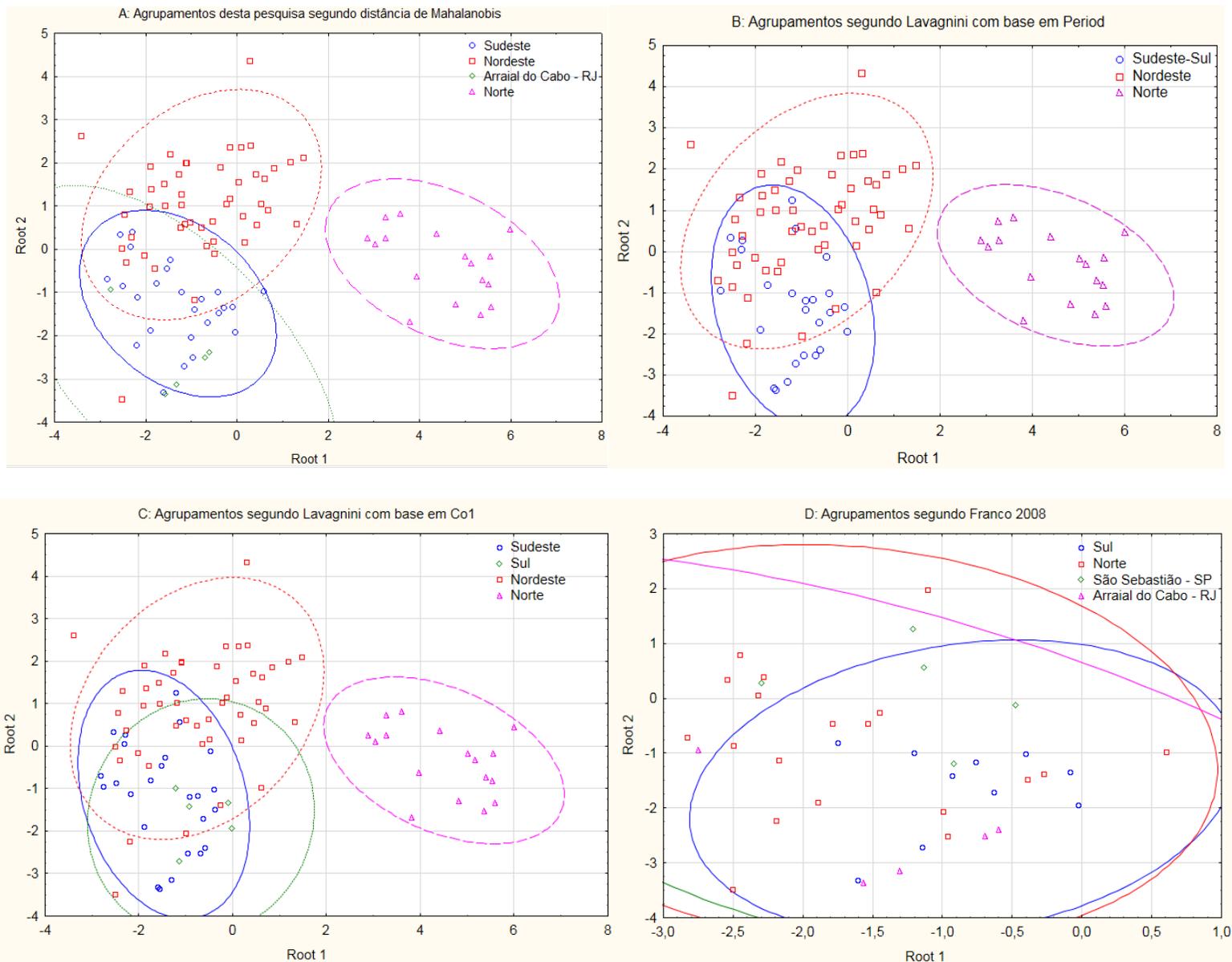


Figura 4: Representação gráfica do tipo dispersão de valores individuais das raízes canônicas 1 e 2, agrupados segundo distâncias de Mahalanobis (A), agrupados segundo Lavagnini T. C. (comunicação pessoal) com base em seqüências dos genes nuclear period e COI (B e C respectivamente) e agrupados segundo Franco et al. (2008) baseado em análises morfométricas (D), as elipses representam o intervalo de confiança de 95% para cada agrupamento.

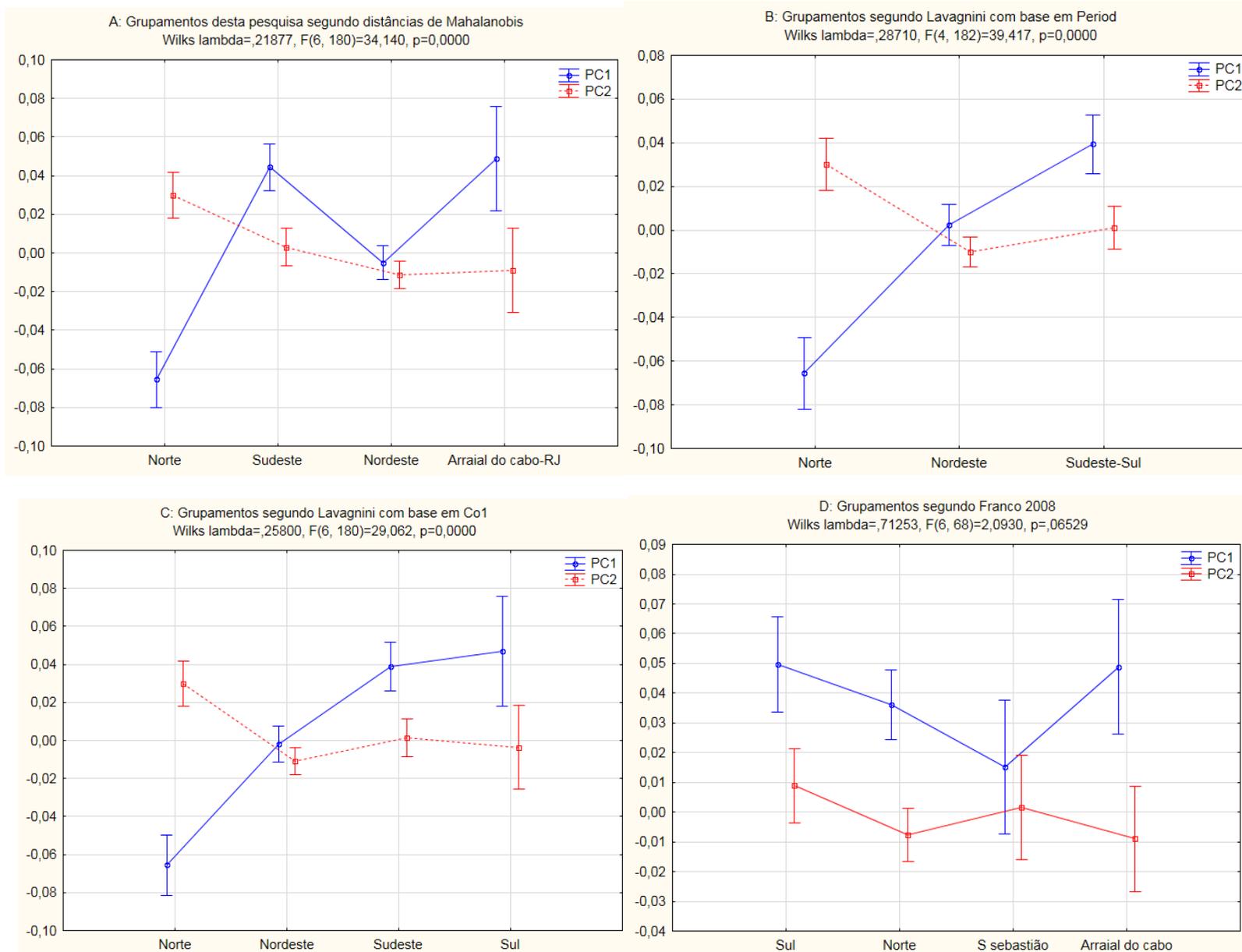


Figura 5: Resultados da análise de variância-ANOVA para os PCs 1 e 2, tendo como variáveis de agrupamento os grupos levantados segundo distâncias de Mahalanobis (A), agrupados segundo Lavagnini, T. C. (comunicação pessoal) com base em sequências dos genes period e COI (B e C respectivamente) e agrupados segundo Franco et al. (2008) baseado em análises morfométricas (D), as barras representam intervalo de confiança de 95%.

## 5 - Discussão

Dentre os nove PCs analisados, oito apresentam variação morfológica significativa capaz de reclassificar os indivíduos dentro das populações amostradas (Anexo 1, Tabela 2). Desta forma, os resultados concordam que a análise morfométrica da genitália masculina é um bom carácter taxonômico para *Drosophila*, concordando com trabalhos anteriores (Silva & Sene 1991, Franco et al. 2008, Kokudai 2013).

Tanto a análise das raízes canônicas quanto o resultado das ANOVAs para os componentes principais 1 e 2 apontaram separação efetiva do grupo “Norte”, composto por populações do noroeste da Bahia e interior do Piauí, em concordância com ambas as hipóteses moleculares de Lavagnini, T. C. (comunicação pessoal). Já os grupamentos Sudeste e Nordeste mostraram através da ANOVA separação efetiva apenas pelo componente principal 1, o de maior variação, e não pelo componente 2, assim como a análise canônica apontou zonas de sobreposição das distribuições. Ambas as análises então apontam para uma maior proximidade evolutiva entre estes dois grupos quando comparado com o grupamento “Norte”.

Há dois conjuntos de fatores possíveis, não mutuamente exclusivos, que podem explicar as diferenças morfológicas observadas nos agrupamentos; são eles: ecológicos e históricos. Com relação aos fatores ecológicos, as populações que constituem o grupamento Norte encontram-se no limite noroeste da distribuição geográfica do bioma Caatinga, que caracteriza-se como área mais seca, mas com igual diversidade de cactáceas, quando comparado ao limite Nordeste (Lavagnini T. C. comunicação pessoal). Além disso, a questão dos compostos secundários, existentes nos cactos em decomposição, pode influenciar diretamente a questão do uso do cacto hospedeiro (Matzkin 2006; Matzkin 2008; Matzkin 2012). Este aspecto tem se mostrado fundamental inclusive para explicar processos de diversificação entre espécies do grupo *D. repleta* (Oliveira et al 2011).

Do ponto de vista dos aspectos históricos, análises prévias com os genes nuclear *period* e mitocondrial *COI* obtidos com o trabalho de Lavagnini T. C. (comunicação pessoal), sugerem que os haplótipos encontrados nesta região sejam

mais derivados com relação àqueles observados na região Nordeste, considerados mais antigos. Sendo assim, eventos históricos de expansão populacional e fluxo gênico estariam envolvidos nesta questão.

Os dados de variação morfológica concordam com a divisão nordeste e litoral proposta em trabalhos prévios (Baimai et al., 1983, Tosi e Sene, 1989, Manfrin et al., 2001, Morales 2005, Kokudai 2013 ). Tal divisão entre norte e sul, especialmente com relação à costa atlântica, tem sido bem documentada para diferentes grupos taxonômicos (Cabanne *et al.*, 2007; Grazziotin *et al.*, 2006; Pellegrino *et al.*, 2005; Carnaval et al., 2009; Thomé et al., 2010; Ribeiro *et al.*, 2011). Esta concordância evidencia que provavelmente esta divisão foi resultado de eventos históricos, uma vez que influenciou aspectos populacionais em diferentes grupos taxonômicos.

Além disso, a diversidade de cactos é consideravelmente maior na região nordeste do Brasil com relação ao litoral atlântico sul (Taylor & Zappi 2004), onde predomina distribuição de cactos da espécie *Cereus fernambucensis*. Esta restrição ecológica nos hospedeiros disponíveis pode ter contribuído para diferenciação populacional em *Drosophila serido*.

Contudo, o grupamento “Sul” sugerido pelo trabalho de Lavagnini T. C. (comunicação pessoal), por análises moleculares com sequências do gene mitocondrial *COI*, não teve apoio dos dados de variação morfológica, estas populações foram consideradas como pertencentes ao grupamento “Sudeste”, concordando com os resultados preliminares para o gene nuclear *period*.

Com relação à inferência de eventos históricos, o gene *period* é capaz de sugerir eventos mais antigos que o gene *COI*, devido à diferença nos tempos de coalescência destes marcadores moleculares. Tal fato é interessante, considerando que, de forma geral, a morfologia da genitália masculina evolui rapidamente (Arnqvist, 1997), pelos menos em informações de variação morfológica interespecífica (Arnqvist, 1997; Soto et al., 2013), uma vez que a avaliação da variação morfológica intraespecífica em genitália masculina tem sido pouco discutida (Wojcieszek & Simmons, 2012; Soto et al., 2013).

Supondo-se que a hipótese da seleção natural, por fatores ecológicos associados aos cactos, seja o fator que explique o acúmulo de divergências morfológicas dos edeagos nas populações do grupo Norte, e tendo em vista que este grupo tem divergência mais recente, pode-se considerar que existe forte evidência apontando que a evolução dos edeagos em *D. serido* siga o modelo de pleiotropia, como previsto em *Franco et al.* (2008).

O modelo chave-fechadura foi desconsiderado devido à elevada quantidade de variação morfológica dos edeagos, fato não condizente com o modelo de seleção estabilizadora. Da mesma forma, o modelo de seleção sexual foi desconsiderado, não coube às análises realizadas avaliar os efeitos da seleção por sucesso de fertilização.

Não há evidências estatísticas significativas que suportem a separação da população de Arraial do Cabo-RJ do restante das populações do sudeste, diferente do que fora sugerido inicialmente pelas distâncias de Mahalanobis e por Franco et al. (2008), porém esta população exibe uma tendência de separação na análise discriminante em ambos os trabalhos. As razões por trás desta tendência são desconhecidas. Esta população de Arraial do Cabo-RJ está inserida em uma região considerada como uma exceção ao tipo de vegetação predominante no litoral deste estado, pois na faixa costeira de Cabo Frio-RJ até Macaé-RJ há um reduto de Caatinga. Possivelmente a presença desta vegetação seca na região litorânea do Rio de Janeiro foi resultado das alterações na área de distribuição geográfica das Florestas Tropicais Sazonalmente Secas em decorrência das flutuações climáticas do Quaternário, e conseqüentemente de mudanças no nível do mar durante esta época (Ab'Saber, 2003). Por estes motivos, as incongruências observadas com relação à classificação desta população e sua relação com as demais seja tão confusa.

Morales (2005), aponta as populações de Santa Catarina como intimamente relacionadas às populações do interior da Bahia, os resultados do presente trabalho não apontam dados morfológicos que sustentem esta hipótese, tendo a população testada de Santa Catarina sido posicionada com o grupamento "sudeste", mas é importante notar que a população de Penha-SC (J52) no fenograma (Figura 3) apresenta maior diferenciação morfológica com relação às demais populações agrupadas no ramo.

Por conta da redução na confiabilidade dos dados do fenograma a cada passo da análise, devido principalmente à redução de variabilidade nos componentes principais (Figura 2), seguida de retirada do componente oito por não significância (Tabela 1), e ainda a confiabilidade de 70% em reclassificação de populações (Anexo 1), o dado referente ao não agrupamento da população J52 (Penha-SC), isoladamente não pode ser usado como contraponto à hipótese de unidade com o interior da Bahia, mas pode ser um indicativo de que esta hipótese deva ser revista.

Populações do interior da Bahia foram apontadas em parte como “sudeste” (Mucuri e Cabrália) e parte como “nordeste” (Milagres), isso pode estar apontando a existência de uma barreira física dividindo as linhagens da Bahia, mas também é preciso considerar que este pode ser um artefato estatístico da análise, e que estes resultados podem estar indicando que a diferenciação morfológica baseada nos edeagos das populações “nordeste” e “sudeste”, pode não ser suficiente para identificar populações muito próximas ao centro de dispersão da Chapada Diamantina, ou que a amostragem das populações das áreas de sobreposição entre os grupos deveria ser aumentada para aumentar a confiabilidade do teste.

O teste de Mantel, diferentemente dos resultados de Franco et al. (2008), não apontou correlação entre as distâncias geográficas e as distâncias de Mahalanobis. Isso não necessariamente invalida as conclusões iniciais, uma vez que é possível que esta diferença se dê pelo fato de que as populações testadas provenientes da região sudeste apresentem uma distribuição linear ao longo do litoral, e que de fato pode existir correlação entre distâncias neste agrupamento especificamente, enquanto as populações do grupamento “nordeste” não necessariamente a possuíam.

Considerando a hipótese de vicariância com posterior expansão (Morales 2005; Franco & Manfrin 2013), uma explicação válida para este fenômeno seria que, em diversos momentos da história evolutiva dessas linhagens os eventos de vicariância teriam aberto grandes áreas inocupadas durante a retração das populações de cactos, que puderam ser posteriormente recolonizadas. Ao longo de uma distribuição não linear como é a do grupo “nordeste” esta recolonização pode ter levado a reaproximação geográfica de linhagens mais distantes evolutivamente, enquanto em uma distribuição linear como na linhagem “litoral” esta possibilidade é menos

provável. Para que esta hipótese seja testada seria preciso realizar testes de Mantel independentes para populações do “litoral” e populações do “nordeste”.

## 6 - Conclusões

Com base nos resultados apresentados neste trabalho podemos concluir que:

- A análise da morfometria, aplicada a contorno de edeagos, é estatisticamente significativa na discriminação de linhagens de *D. serido*, alcançando 70% de eficiência.
- O modelo mais provável que explica a evolução da variação morfológica dos edeagos em populações de *D. serido* é de pleiotropia.
- A variação morfológica também pode ser explicada por plasticidade fenotípica.
- A variação morfológica observada nos edeagos de *D. serido* sugere que suas populações estejam estruturadas em três linhagens, denominadas no presente trabalho de: “Norte”, “Nordeste” e “Sudeste”; concordando com os resultados preliminares de Lavagnini T. C. (comunicação pessoal) com marcadores moleculares.
- As análises discriminantes dos edeagos mostram que há menor estruturação entre os grupamentos Nordeste e Litoral, evidenciando maior proximidade entre as linhagens, enquanto que estas apresentam maior estruturação com relação ao grupamento Norte.
- A ausência de correlação significativa no teste de Mantel sugere que as distâncias geográficas não explicam a variação morfológica observada, que pode ter sido gerada por outros fatores.
- A distribuição dos agrupamentos, formulada através da análise morfométrica das populações da região sudeste do Brasil, não apresentou para o grupamento “Sudeste” separação de linhagens, diferente da detectada por Franco et al. (2008) em que os dados apontavam divisão deste grupo em dois conjuntos “Sul” e “Norte”. Também discorda que as populações de Arraial do Cabo – RJ e São Sebastião – SP não façam parte do grupamento “Sudeste” como sugerido por Franco et al. (2008).

## 7 - Referências Bibliográficas

Ab'Sáber A .N. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos da América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. **Paleoclimas**, v. 3, p. 1-19, 1977.

Addinsoft Inc. (1995-2014) **XLSTAT**, version 2014.2.05 [www.xlstat.com/en/](http://www.xlstat.com/en/)

Arnqvist G. The evolution of animal genitalia: Distinguishing between hypotheses by single species studies. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 60, p. 365-379, 1997.

Andrade C. A. C; Vieira R. D.; Ananina G.; Klaczko L. B. Evolution of the male genitalia: morphological variation of the aedeagi in a natural population of *Drosophila mediopunctata*. **Genetica**, v. 135, p. 13–23, 2009

Avise, J. C. Phylogeography: History and formation of species. **Harvard University Press**, London, 447p. 2000.

Baimai V.; Sene F. M.; Pereira M. A. O. R. Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactus-breeding species of the *Drosophila repleta* species group. **Genetica**, v. 60, n. 2, p. 81-92, 1983.

Bertin A.; Fairbairn D. J. The form of sexual selection on male genitalia cannot be inferred from within-population variance and allometry – A case study in *Aquarius remigis*. **Evolution**, v. 61, n. 4, p. 825–837, 2006.

Biffi F.; Kuhn G.C.S.; Morales A.C.; Manfrin M.H.; Sene F.M. Padrão cariotípico de uma área de contato entre as espécies cactófilas *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Grupo repleta). In: **Congresso Brasileiro de Genética, 47., 2001, Águas de Lindóia. Anais...Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Genética, 2001.**

Cabanne G. S.; Santos F. R.; Miyaki C. Y. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 91, n. 1, p. 73-84, 2007.

Carnaval A. C.; Hickerson M. J.; Haddad, C. F. B.; Rodrigues, M. T.; Moritz, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, v. 323, p. 785-789, 2009.

Coyne, J. A.; Orr, H. A. Patterns of speciation in *Drosophila*. **Evolution**, v. 43, n. 2, p. 362-381, 1989.

Cook, L. G.; Edwards R. D.; Crisp M. D.; Hardy N. B. Need morphology always be required for new species descriptions? **Invertebrate Systematics**, v. 24, n. 3, p. 322-326, 2010.

De Brito R. A. D.; Manfrin M. H.; Sene F. M. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 161-171, 2002

De Queiroz, K. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. **In: Endless Forms: Species and Speciation**, ed. DJ Howard, SH Berlocher, p. 57-75. Oxford: Oxford Univ. Press, 1998.

De Queiroz, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.

Eberhard W. G. Evaluating models of sexual selection: Genitalia as a test case. **The American Naturalist**, v. 142, p. 564-571, 1993.

Eberhard W. G. Species specific genitalic copulatory courtship in sepsid flies (Diptera, Sepsidae, Microsepsis) and theories of genitalic evolution. **Evolution**, v. 55, n. 1, p. 93-102, 2001.

Ersts P. J.; Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). **American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation**. Available from [http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg). Accessed on 2014-5-14.

Fernandez P. I.; Hasson E. The role of the use of different host plants in the maintenance of the inversion polymorphism in the cactophilic *Drosophila buzzatii*. **Evolution**, v. 54, n. 4, p. 1295–1302, 2000

Fernandez P. I.; Rodríguez C.; Hasson E. Inversion and allozyme polymorphism show contrasting patterns of microgeographical population structure in a natural population of *Drosophila buzzatii* from Argentina. **J. Evol. Biol.**, v. 15, p. 226–234, 2002.

Franco F. F.; Soto I. M.; Sene F. M.; Manfrin M. H. Phenotypic variation of the aedeagus of *Drosophila serido* Vilela & Sene (Diptera: Drosophilidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 558-563, 2008.

Franco F. F.; Manfrin M. H. Recent demographic history of cactophilic *Drosophila* species can be related to Quaternary palaeoclimatic changes in South America. **Journal of Biogeography**, v. 40, p. 142-154. 2013

Garnier, S.; Magniez-Jannin F.; Rasplus J. Y.; Alibert P. When morphometry meets genetics: Inferring the phylogeography of *Carabus solieri* using Fourier analyses of pronotum and male genitalia. **J. Evol. Biol.**, v. 18: 269-80. 2005.

Grazziotin F. G.; Monzel M.; Echeverrigaray S.; Bonatto S. L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 13, p. 3969-3982, 2006.

Haldane J. B. S., Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. **Journal of Genetics** v. 12, n. 2, p. 101-109, 1922.

Hey, J. Genes, categories, and species: the evolutionary and cognitive causes of the species problem. **Oxford University Press**, USA, 2001.

House C. M.; Lewis Z. Genital Evolution: Blurring the Battle Lines between the Sexes. **Current Biology**, v. 17, n. 23, p. R1013-R1014, 2007.

Iwata H.; Ukai Y. SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. **Journal of Heredity**, v. 93, p. 384-385, 2002

Kaneshiro K. Y. A study of the relationships of Hawaiian *Drosophila* species based on the external male genitalia. **The University of Texas Publication**, v. 6918, p. 55-69, 1969.

Kokudai, C. B. S. Isolamento reprodutivo e o status taxonômico de linhagens evolutivas de *Drosophila meridionalis* (Diptera, Drosophilidae). 2013 Tese (Doutorado em Ciências) - **Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2013.

Kuhl F. P.; Giardina C. R. Elliptic Fourier features of a closed contour. **Computer Graphics and Image Processing**, v. 18, n. 3, p. 236–258, 1982.

Liu J.; Mercer J.M.; Stam L. F.; Gibson G. C.; Zeng Z. B.; Laurie C.C. Genetic analysis of a morphological shape difference in the male genitalia of *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. **Genetics**, v. 142, n. 4, p. 1129-1145, 1996.

Mallet J. A species definition for the Modern Synthesis. **Tree** vol. 10, no. 7, p. 294-299, 1995.

Mallet J. What does *Drosophila* genetics tell us about speciation? **Trends in Ecology and Evolution**, Vol. 21, No. 7, p. 386-393, 2006.

Manfrin M. H.; De Brito R. O. A.; Sene F. M. Systematics and evolution of the *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae) cluster using mtDNA. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 94, n. 3, p. 333-346, 2001.

Manfrin M. H.; Sene F. M. Cactophilic *Drosophila* in South America: A model for evolutionary studies. **Genetica**, v. 126, n. 1, p. 57-75, 2006.

Matzkin L. M. Population transcriptomics of cactus host shifts in *Drosophila mojavensis*. **Molecular ecology**, v. 21, n. 10, p. 2428-39, 2012.

Matzkin L. M. The molecular basis of host adaptation in cactophilic *Drosophila*: molecular evolution of a Glutathione S-Transferase gene (*GstD1*) in *Drosophila mojavensis*. **Genetics**, v. 178, n. 2, p. 1073-1083, 2008.

Matzkin L. M.; Watts T. D.; Bitler B. G.; Machado C. A.; Markow T. A. Functional genomics of cactus host shifts in *Drosophila mojavensis*. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 14, p. 4635-4643, 2006.

Morales, A. C. Análise histórico-evolutiva de populações das espécies cactofílicas *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera, Drosophilidae). 2005. 110 f. Tese

(Doutorado em Ciências) - **Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2005.

Noor, M. A. F.; Grams K. L.; Bertucci L. A.; Almendarez Y.; Reiland J.; Smith K. R. The genetics of reproductive isolation and the potential for gene exchange between *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis* via backcross hybrid males. **Evolution**, n. 55, p. 512-521, 2001.

Nosil P.; Vines T. H.; Funk D. J Perspective: reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. **Evolution** n. 59, p. 705–719, 2005.

Oliveira C. C.; Manfrin M. H.; Sene F. M.; Jackson L. L.; Etges W. J. Variations on a theme: diversification of cuticular hydrocarbons in a clade of cactophilic *Drosophila*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 179, 2011.

Pellegrino K. C. M.; Rodrigues M. T.; Waite, A. N.; Morando M.; Yassuda Y. Y.; Sites, J. W. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 1, p. 13-26, 2005.

Pereira M. A. Q. R.; Vilela C.R.; Sene F. M. Notes on breeding and feeding site of some species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Ciência e Cultura (São Paulo)**, v. 35, p. 1313-1319, 1983.

Ribeiro R. A.; Lemos-Filho J. P.; Ramos A. C. S.; Lovato M. B. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* ( Fabaceae ): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, v. 106, n. 1, p. 46-57, 2011.

Rohlf F. J.; Archie J. W. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitos (Diptera, Culicidae). **Society of Systematic Zoology**, v. 33, p. 302-317, 1984.

Ruiz A.; Cansian A.; Kuhn G.; Alves M.; Sene F. M. The *Drosophila serido* speciation puzzle: putting new pieces together. **Genetica**, v. 108, n. 3, p. 217-227, 2000.

Santos C. G.; Manfrin M. H. Morphological variation of the aedeagus in *Drosophila buzzatii* (Diptera, Drosophilidae). **Drosophila Information Service**, v. 93, p 85-88, 2010.

Silva A. F. G.; Sene F. M. Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 35, n. 2, p.455-468, 1991.

Sobel J. M.; Chen G. F.; Watt L. R.; Schemske D. W. The biology of speciation. **Evolution**, v. 64, n. 2, p. 295-315, 2009.

Song H.; Wenzel J. W. Mosaic pattern of genital divergence in three populations of *Schistocerca lineata* Scudder, 1899 (Orthoptera: Acrididae: Cyrtacanthacridinae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 94, p. 289-301, 2008.

Soto I. M.; Carreira V. P.; Fanara J. J.; Hasson E. Evolution of male genitalia: environmental and genetic factors affect genital morphology in two *Drosophila* sibling species and their hybrids. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 77, 2007.

Soto I. M.; Carreira V. P.; Soto E. M.; Márquez F.; Lipko P.; Hasson E. Rapid Divergent Evolution of Male Genitalia Among Populations of *Drosophila buzzatii*. **Evolutionary Biology**, v. 40, n. 3, p. 395-407, 2013.

Stearns F. W. One hundred years of pleiotropy: a retrospective. **Genetics**, v. 186, p. 767–773, 2010.

Statsoft Inc. (2002). **STATISTICA (Data Analysis Software System)**, version 10. [www.STATSOFT.com](http://www.STATSOFT.com).

Tamura K.; Stecher G.; Peterson D.; Filipski A.; Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

Tosi D.; Sene F. M. Further studies on chromosomal variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 1, p. 729-746, 1989.

Thomé M. T. C.; Zamudio K. R.; Giovanelli J. G. R.; Haddad C. F. B.; Baldissera Jr F. A.; Alexandrino, J. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 3, p. 1018-1031, 2010.

Vilela C. R.; Sene F. M. Two new neotropical species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 30, p. 295-299, 1977

Wasserman M.; Richardson R. H. Evolution of Brazilian *Drosophila mulleri* complex species. **The Journal of Heredity**, v. 78, p. 282-286, 1987.

# Anexos

Classificações Observadas	Classificações Preditas																		Acerto (%)
	H49	J52	J92	N17	N20	N31	N32	N35	R27	R30	R36	R37	R38	R39	R41	R42	R44	R56	
H49	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0000
J52	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0000
J92	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	50,0000
N17	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80,0000
N20	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0000
N31	2	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40,0000
N32	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80,0000
N35	0	2	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20,0000
R27	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75,0000
R30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	1	0	0	0	0	1	66,6667
R36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	1	1	0	0	0	0	50,0000
R37	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	50,0000
R38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	5	0	0	0	0	0	83,3333
R39	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	66,6667
R41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	1	0	83,3333
R42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	80,0000
R44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	5	0	83,3333
R56	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	40,0000
<b>Total</b>	7	7	4	7	6	5	5	1	4	6	4	4	8	7	6	4	7	3	69,4737

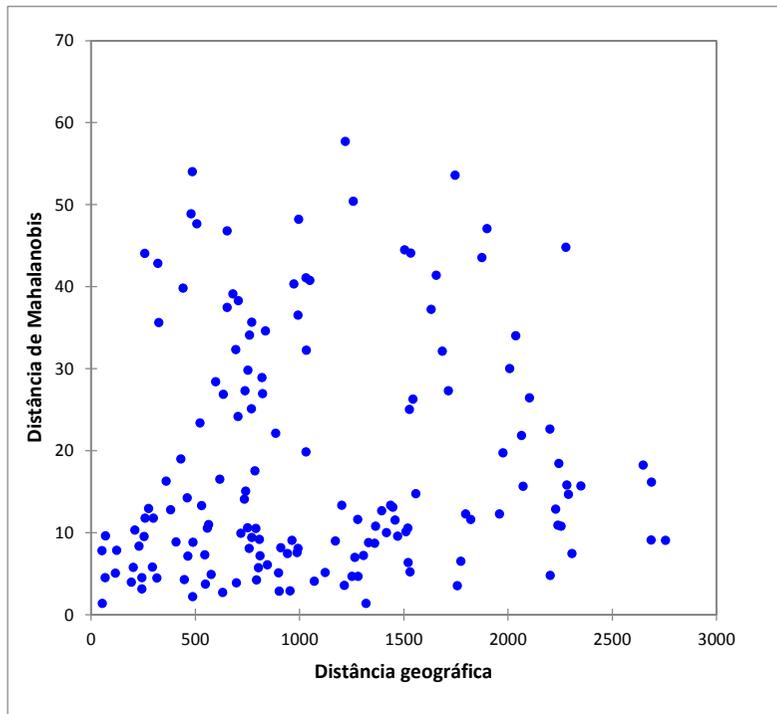
**Anexo 1:** Matriz de reclassificação de populações de *Drosophila serido* com base em análises morfométricas utilizando o contorno dos edeagos.

	H49	J52	J92	N17	N20	N31	N32	N35	R27	R30	R36	R37	R38	R39	R41	R42	R44	R56
H49	0,000	8,861	14,728	9,602	18,979	2,859	2,895	5,138	12,282	11,584	14,660	18,429	15,809	15,695	27,290	41,400	47,057	19,857
J52	8,861	0,000	12,272	14,217	10,487	7,206	8,710	5,210	22,647	12,852	9,107	18,216	16,169	9,042	26,451	34,018	44,793	13,337
J92	14,728	12,272	0,000	6,346	8,759	5,726	8,058	4,903	9,531	12,773	14,071	3,885	15,075	7,175	44,056	42,845	54,004	7,304
N17	9,602	14,217	6,346	0,000	16,289	6,071	5,090	4,061	3,531	6,495	10,766	4,776	10,882	7,428	32,111	37,222	43,555	7,557
N20	18,979	10,487	8,759	16,289	0,000	10,992	16,519	9,151	26,286	25,025	21,838	19,731	29,997	15,637	44,070	44,467	53,567	17,544
N31	2,859	7,206	5,726	6,071	10,992	0,000	1,364	3,137	8,064	9,071	10,561	9,993	13,077	10,114	32,222	41,067	50,408	11,759
N32	2,895	8,710	8,058	5,090	16,519	1,364	0,000	3,960	7,440	8,155	9,551	10,784	12,653	11,516	36,535	48,219	57,718	12,928
N35	5,138	5,210	4,903	4,061	9,151	3,137	3,960	0,000	10,582	9,928	11,603	8,961	13,336	6,964	28,910	34,590	40,742	10,323
R27	12,282	22,647	9,531	3,531	26,286	8,064	7,440	10,582	0,000	5,744	13,300	4,259	8,821	10,557	35,626	39,803	48,886	9,391
R30	11,584	12,852	12,773	6,495	25,025	9,071	8,155	9,928	5,744	0,000	2,716	7,137	2,186	3,727	23,393	26,879	39,112	4,209
R36	14,660	9,107	14,071	10,766	21,838	10,561	9,551	11,603	13,300	2,716	0,000	11,770	5,812	4,473	28,400	32,335	47,672	4,666
R37	18,429	18,216	3,885	4,776	19,731	9,993	10,784	8,961	4,259	7,137	11,770	0,000	7,801	5,060	37,465	35,667	46,795	3,564
R38	15,809	16,169	15,075	10,882	29,997	13,077	12,653	13,336	8,821	2,186	5,812	7,801	0,000	4,506	24,163	26,939	38,292	4,640
R39	15,695	9,042	7,175	7,428	15,637	10,114	11,516	6,964	10,557	3,727	4,473	5,060	4,506	0,000	25,082	22,113	34,079	1,375
R41	27,290	26,451	44,056	32,111	44,070	32,222	36,535	28,910	35,626	23,393	28,400	37,465	24,163	25,082	0,000	7,854	8,344	29,811
R42	41,400	34,018	42,845	37,222	44,467	41,067	48,219	34,590	39,803	26,879	32,335	35,667	26,939	22,113	7,854	0,000	4,491	27,315
R44	47,057	44,793	54,004	43,555	53,567	50,408	57,718	40,742	48,886	39,112	47,672	46,795	38,292	34,079	8,344	4,491	0,000	40,311
R56	19,857	13,337	7,304	7,557	17,544	11,759	12,928	10,323	9,391	4,209	4,666	3,564	4,640	1,375	29,811	27,315	40,311	0,000

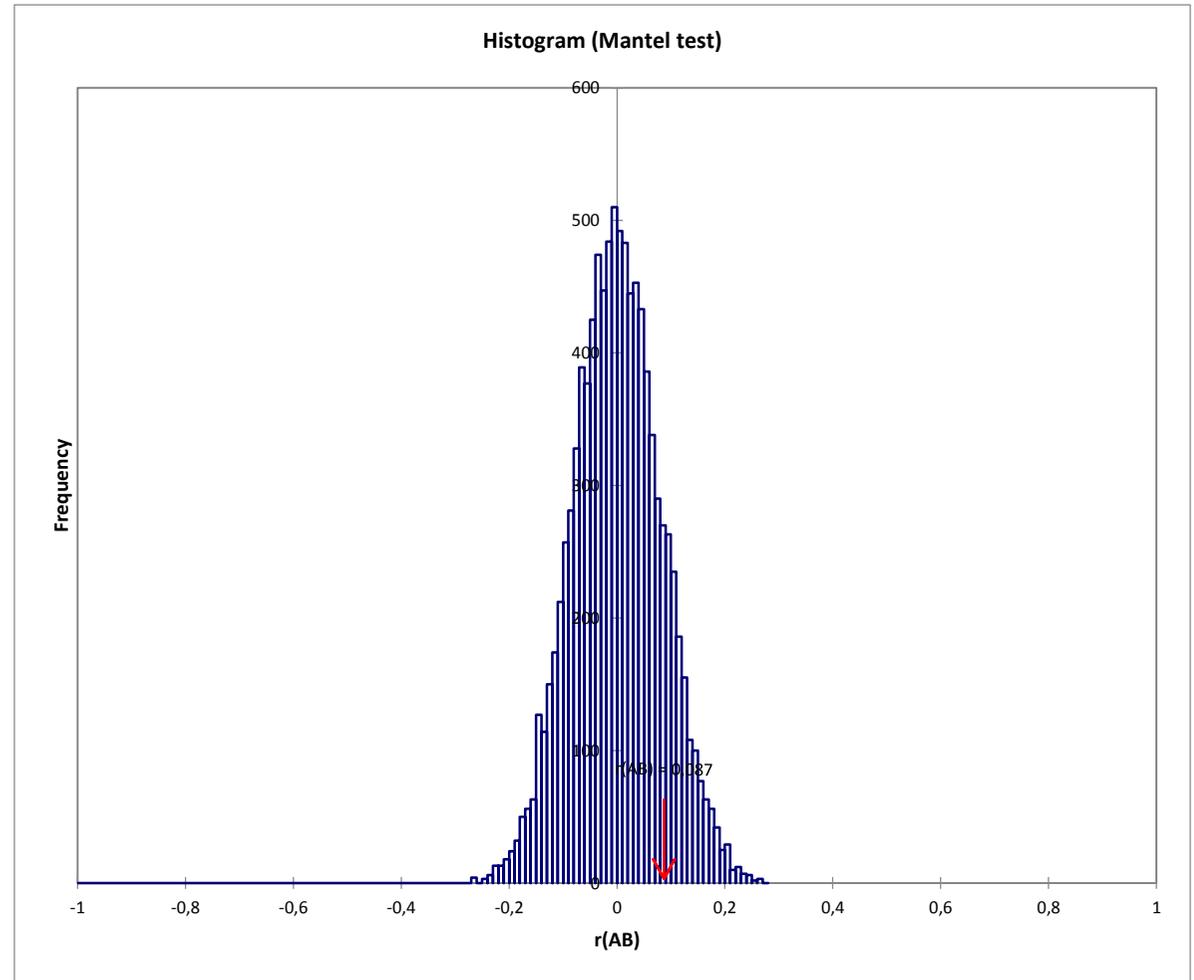
**Anexo 2:** Distâncias de Mahalanobis entre populações de *Drosophila serido* usadas neste trabalho, obtidas com base em análises morfométricas utilizando o contorno dos edeagos.

	H49	J52	J92	N17	N20	N31	N32	N35	R27	R30	R36	R37	R38	R39	R41	R42	R44	R56
H49	0	408,63	1558,65	69,8	430,51	902,45	955,49	1123,38	1797,58	1821,45	2289,99	2244,45	2282,98	2349,99	1714,39	1656,55	1900,18	1031,08
J52	408,63	0	1959,48	461,19	791,4	1306,74	1360,34	1531,28	2201,66	2229,62	2686,53	2649,24	2688,59	2755,82	2103,18	2037,46	2278,79	1438,04
J92	1558,65	1959,48	0	1521,57	1332,35	802,9	758,73	576,92	255,27	382,4	735,98	698,1	742,4	810,42	258,18	320,76	486,07	546,27
N17	69,8	461,19	1521,57	0	361,09	845,64	899,17	1071,07	1757,16	1774,81	2255,21	2202,9	2240,48	2307,19	1685,09	1631,5	1875,71	988,03
N20	430,51	791,4	1332,35	361,09	0	564,26	618,15	807,91	1544,01	1527,15	2064,82	1977,16	2009,24	2073,64	1534,37	1505,28	1746,63	786,97
N31	902,45	1306,74	802,9	845,64	564,26	0	54,4	245	992,54	963,53	1520,25	1417,16	1447,63	1511,35	1032,9	1031,46	1258,63	299,4
N32	955,49	1360,34	758,73	899,17	618,15	54,4	0	193,12	942,92	910,34	1471,54	1365,12	1395,1	1458,6	993,12	996,49	1220,25	275,85
N35	1123,38	1531,28	576,92	1071,07	807,91	245	193,12	0	750,74	719,24	1280,11	1172,22	1202,65	1266,47	820,86	837,56	1050,42	210,28
R27	1797,58	2201,66	255,27	1757,16	1544,01	992,54	942,92	750,74	0	202,45	530,25	448,06	489,91	557,85	325,48	442,64	480,22	770,52
R30	1821,45	2229,62	382,4	1774,81	1527,15	963,53	910,34	719,24	202,45	0	631,58	464,18	488,17	549,65	523,01	635,27	680,98	793,82
R36	2289,99	2686,53	735,98	2255,21	2064,82	1520,25	1471,54	1280,11	530,25	631,58	0	259,47	295,14	316,55	597,97	694,08	508,4	1281,31
R37	2244,45	2649,24	698,1	2202,9	1977,16	1417,16	1365,12	1172,22	448,06	464,18	259,47	0	53,59	116,5	653,5	770,8	653,61	1215
R38	2282,98	2688,59	742,4	2240,48	2009,24	1447,63	1395,1	1202,65	489,91	488,17	295,14	53,59	0	68,02	705,67	823,5	706,87	1252,47
R39	2349,99	2755,82	810,42	2307,19	2073,64	1511,35	1458,6	1266,47	557,85	549,65	316,55	116,5	68,02	0	769,6	886,31	760,45	1319,27
R41	1714,39	2103,18	258,18	1685,09	1534,37	1032,9	993,12	820,86	325,48	523,01	597,97	653,5	705,67	769,6	0	122,67	230,18	752,86
R42	1656,55	2037,46	320,76	1631,5	1505,28	1031,46	996,49	837,56	442,64	635,27	694,08	770,8	823,5	886,31	122,67	0	244,45	739,38
R44	1900,18	2278,79	486,07	1875,71	1746,63	1258,63	1220,25	1050,42	480,22	680,98	508,4	653,61	706,87	760,45	230,18	244,45	0	973
R56	1031,08	1438,04	546,27	988,03	786,97	299,4	275,85	210,28	770,52	793,82	1281,31	1215	1252,47	1319,27	752,86	739,38	973	0

**Anexo 3:** Distâncias geográficas (em quilômetros) entre populações de *Drosophila serido* utilizadas neste trabalho.



H0: As matrizes não são correlacionadas	
Ha: As matrizes são correlacionadas	
r(AB)	0,087
p-value (Two-tailed)	0,293
alpha	0,05
O risco em rejeitar H0 e ela estar correta é de 29,33%.	



**Anexo 4:** Resultados do teste de mantel, gráfico de dispersão das Distâncias de Mahalanobis (eixo Y) pelas distâncias Geográficas (eixo X); Histograma da distribuição  $r(AB)$  usada para calcular o  $p$ -value do teste de Mantel a partir de 10000 permutações (sendo  $r(AB)$  o fator de correlação entre as matrizes A e B); Quadro de hipóteses do teste de Mantel;