

**Determinantes da variação morfológica em populações naturais de  
*Drosophila mediopunctata*.**

**Projeto de Pesquisa de Doutorado**

**Felipe Bastos Rocha**

Orientador: **Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko**

Departamento de Genética e Evolução,  
Instituto de Biologia  
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP  
Caixa Postal 6109 Campinas 13083-970 SP  
fone: 019-3521-1150; e-mail: LBK@unicamp.br

**RESUMO**

Os processos evolutivos que ocorrem em populações naturais em ambientes heterogêneos estão ligados a questões importantes da biologia evolutiva, como manutenção de polimorfismos, adaptação local e evolução da plasticidade fenotípica, cujos padrões de evolução ainda são bastante discutidos. A maior parte dos estudos que abordam tais questões, entretanto, utiliza espécies cosmopolitas, com alta associação a ambientes humanos e propriedades diferentes de espécies restritas a ambientes conservados. *Drosophila mediopunctata* é uma espécie do grupo *tripunctata* que ocorre exclusivamente em matas neotropicais, e vários aspectos de sua biologia já foram estudados. Para alguns já foram detectadas evidências de ação da seleção natural, como é o caso do cline altitudinal de tamanho e a variação em contra-gradiente para a pigmentação, baseadas em populações naturais. Portanto, essa espécie é um modelo favorável para estudar a evolução em ambientes heterogêneos de matas neotropicais. O objetivo deste projeto é investigar os padrões de evolução de populações naturais de *D. mediopunctata* em localidades da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira, buscando avaliar fatores ambientais que possam contribuir na determinação da distribuição da variação genética nas populações estudadas. Para tal, serão coletadas amostras de quatro populações escolhidas para possibilitar o teste de diferentes fontes de variação: a) Serras; b) faces da Serra; c) altitudes; d) latitudes. Nas populações será caracterizada a variação genética e fenotípica para um conjunto de caracteres quantitativos e a variação para marcadores microsatélites. As normas de reação em relação à temperatura dos caracteres estudados serão descritas, caracterizando um dos determinantes ambientais da variação. A comparação entre os resultados das diferentes abordagens servirá como base para inferir padrões de evolução diante das diferentes escalas de variação ambiental testadas.

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Toda espécie se depara com condições ambientais variáveis ao longo do tempo e do espaço. É provável, portanto, que a heterogeneidade ambiental constitua um desafio adaptativo para a maioria das espécies. Levene (1953) propôs um modelo de seleção no qual alelos diferentes seriam favorecidos dependendo do ambiente, levando à manutenção de polimorfismos genéticos em populações naturais. Outro modelo, proposto por Levins (1964, 1968), sugeriu que a seleção de diferentes fenótipos em ambientes heterogêneos poderia levar ao surgimento de diferentes estratégias adaptativas. Uma estratégia consistiria na adaptação às condições de cada ambiente, que levaria à diferenciação entre populações como resultado da adaptação local, mantendo variabilidade genética. Outra estratégia, o desenvolvimento de uma capacidade de resposta aos fatores ambientais, produziria os fenótipos de maior valor adaptativo de acordo com sinais ambientais percebidos durante o desenvolvimento (Levins, 1968), o que pode ser interpretado como um tipo de plasticidade fenotípica adaptativa. O fluxo gênico entre os diferentes ambientes é uma das variáveis consideradas por este modelo. Uma das consequências dessa força evolutiva é diminuir a divergência genética entre populações, atuando como um freio para o processo de adaptação local, diminuindo o valor adaptativo médio das populações em relação ao máximo possível (Lenormand, 2002; Colson, 2002; Levins, 1964).

Os microssatélites são marcadores conhecidos desde o final da década de 80 (Litt & Luty 1989) e vêm sendo usados para o estudo da estruturação populacional (Schlötterer *et al.*, 1997). Eles têm se mostrado a ferramenta ideal para a avaliação do fluxo gênico entre populações, estimando o número efetivo de migrantes. A importância de análise de caracteres neutros ou quase neutros em paralelo à análise de caracteres adaptativos não pode ser subestimada pois podem ser muito úteis como controles (Gockel *et al.*, 2001; Collinge *et al.*, 2006). Numa visão recíproca e complementar, Stockwell *et al.* (2003) ressaltaram a importância desse tipo de estudo: “*levantamentos de variação genética neutra deveriam ser cada vez mais complementados por análise genética de traços quantitativos*”, relacionando os processos de evolução contemporânea com a biologia da conservação.

A possibilidade de manutenção de polimorfismos em ambientes heterogêneos já foi abordada por vários estudos. Boa parte desses trabalhos busca determinar ou testar as condições dessa possibilidade a partir de abordagens teóricas (Charlesworth *et al.*, 1997; Chunco *et al.*, 2007; Hedrick, 2006; Star *et al.*, 2007), ou, baseados em evidências empíricas, apresentam exemplos de adaptação a ambientes variáveis

em diferentes espécies (Weeks & Hoffmann, 1998; Schmidt *et al.*, 2005; Barker *et al.*, 1986; Van Der Linde & Sevenster, 2006; Hall *et al.*, 2007). Ainda assim, não parece haver consenso sobre a importância desse fenômeno para a manutenção de polimorfismos (Byers, 2005; Hedrick, 2006).

Por outro lado, os estudos sobre a evolução da plasticidade fenotípica como estratégia adaptativa em ambientes heterogêneos apresentam, em sua maioria, abordagens teóricas (Via & Lande, 1985; Guo *et al.*, 2007; Schlichting & Smith, 2002; Sasaki & De Jong, 1999; Zhivotovsky *et al.*, 1996; Zhang, 2005; Ernande & Dieckmann, 2004). Algumas exceções são encontradas, no entanto. Hollander (2008) utilizou dados sobre plasticidade fenotípica em invertebrados marinhos para testar o efeito do tamanho da granulação (*grain-size*) ambiental, uma das propriedades da variação ambiental propostas por Levins (1968), sobre a evolução desse caráter. Dessa forma, várias questões sobre a evolução da plasticidade fenotípica, incluindo sua função adaptativa, permanecem em aberto (Pigliucci, 2005; Via *et al.*, 1995).

Um dos exemplos mais consagrados de adaptação associada a uma variável ambiental é o cline latitudinal de tamanho em *Drosophila melanogaster*, no qual animais de latitudes maiores têm tamanho maior que animais de latitudes menores (De Jong & Bochdanovits, 2003; Gockel *et al.*, 2001; Gibert *et al.*, 2004a; Coyne & Beecham, 1987). Tal padrão é independente do continente estudado e se mantém ao longo de vários anos (Gockel *et al.*, 2001; Calboli *et al.*, 2003), sugerindo que algum fator ambiental de efeito geral esteja envolvido na pressão seletiva que causaria o cline. Esse padrão de variação de tamanho é o mesmo da regra de Bergmann, que foi proposta para endotermos. Entretanto, já foi encontrado em várias espécies de animais ectotermos, tanto do ponto de vista da variação genética como por influência ambiental (Atkinson & Sibly, 1997; Cabanita & Atkinson, 2006), reforçando a idéia de que um fator de efeito geral cause esse padrão. Diversos trabalhos apontam, para outras espécies e caracteres, tais como número de ovariolos, tempo de desenvolvimento, resistência ao frio e duração do vôo (Collinge *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 1996; Van Der Linde & Sevenster 2006; Karl *et al.*, 2008), evidências de diferenciação de acordo com variáveis ligadas à temperatura. Outro caráter que apresenta um padrão de variação em relação à temperatura é a pigmentação. Para diferentes espécies, populações de latitudes maiores tendem a ser mais escuras, e essa diferença tem base genética (Munjal *et al.* 1997; Gibert *et al.*, 2004b; Gibert *et al.*, 1999). Algumas hipóteses de mecanismos de seleção totalmente distintos já foram levantadas para explicar esse padrão (Watt, 1968; Brisson *et al.*, 2005; Dornbeck & Jaenike, 2004), sem haver, no entanto, uma hipótese que se aplique a todos os casos.

Boa parte dessas características apresenta plasticidade fenotípica em relação à temperatura. Alguns exemplos são encontrados em *Drosophila* e outros grupos de insetos para: número de cerdas abdominais; tempo de desenvolvimento; viabilidade; tamanho (asa e tórax); número de cerdas esternopleurais; pigmentação (Coyne & Beecham, 1987; Gibert *et al.*, 2004b; David *et al.*, 2006; Pétavy *et al.*, 2002; Moreteau *et al.*, 2003; Davis *et al.* 2005; Bernardo *et al.* 2007; Karl *et al.*, 2008). Para poucos caracteres, entretanto, existem estudos que busquem testar a função adaptativa dessa plasticidade. Uma exceção interessante é encontrada em Frazier *et al.* (2008), que mostrou, para *D. melanogaster*, que moscas da mesma estirpe, quando criadas sob baixas temperaturas, tiveram melhor desempenho de vôo num ambiente frio que as moscas criadas em ambientes quentes.

*Drosophila mediopunctata* pertence ao grupo *tripunctata*, o segundo maior grupo neotropical de *Drosophila*, com 79 espécies descritas (Bächli, 2008), e é exclusiva de áreas florestais (Tidon, 2006), ocorrendo de El Salvador ao sul do Brasil. Diferentes aspectos de sua biologia já foram estudados, fornecendo uma base de conhecimento sobre a espécie que favorecem estudos que busquem testar modelos complexos de determinação da variação fenotípica no campo. *D. mediopunctata* possui cinco pares de cromossomos, sendo o cromossomo II o mais polimórfico. As mais freqüentes inversões proximais desse cromossomo, *PB0*, *PA0* e *PC0*, apresentam desequilíbrio de ligação com conjuntos diferentes de inversões distais: *PB0* está associada à inversão distal *DI*; *PA0* está associada a *DA*; enquanto *PC0* está associada às inversões distais *DS*, *DP* e *DV* (Peixoto & Klaczko, 1991). Já foi demonstrado que as freqüências das inversões do cromossomo II variam temporal e espacialmente em populações naturais desta espécie: a freqüência de *PA0* aumenta nos meses e altitudes mais frias, e *PC0* é mais freqüente em meses e altitudes mais quentes, sugerindo que *PA0* deve estar mais adaptada a ambientes mais frios e *PC0* a ambientes mais quentes (Ananina *et al.*, 2004; Klaczko, 2006).

Em *D. mediopunctata*, o padrão de pigmentação típico do grupo, formado por três pintas mediais no abdômen, é variável: há indivíduos sem pinta, com uma, duas ou três pintas, nos tergitos VI, V e IV, e os machos em geral têm fenótipos com mais pintas que as fêmeas (Frota-Pessoa, 1954; Klaczko, 2006). Foi verificado que a inversão *PA0* está associada a fenótipos com menor número de pintas, enquanto a inversão *PC0* está associada a fenótipos com maior número de pintas (Hatadani *et al.*, 2004). Considerando esse padrão de associação, em conjunto com a variação das freqüências das inversões envolvidas, deduz-se que haveria uma maior freqüência de indivíduos com mais pintas em temperaturas

mais altas, e o contrário para temperaturas mais baixas. Um padrão semelhante a este parece ocorrer para a variação genética desse caráter, ao longo do tempo, em populações naturais dessa espécie. As proles, criadas sob temperatura padronizada no laboratório, de animais coletados no campo em meses mais frios apresentam indivíduos de fenótipo com menos pintas que as proles de animais coletados em meses mais quentes (Hatadani, 2002). Porém, o mesmo não se repete na variação fenotípica do campo para esse caráter, que apresenta alta plasticidade fenotípica em relação à temperatura, com indivíduos que se desenvolvem em temperaturas mais baixas apresentando fenótipo com mais pintas que em temperaturas mais altas (Hatadani *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2008). Assim, a variação fenotípica e a variação genética parecem seguir padrões de variação contrários no campo, formando um contra-gradiente (Hatadani, 2002) geralmente associado à ação de seleção natural (Conover & Schultz 1995). Para a pigmentação abdominal, também, fizemos um conjunto de estimativas de herdabilidade “natural”, obtendo valores altos e significativos ( $\approx 50\%$ ) (Rocha, 2007). Utilizamos esse caráter para testar a idéia de independência entre a base genética da plasticidade e do valor médio e descrevemos sua norma de reação em relação à temperatura. Pudemos, assim, demonstrar que a forma da norma de reação desse caráter – o coeficiente quadrático da equação de segundo grau de melhor ajuste – está correlacionada com seu valor médio. Estendemos essa observação a trabalhos anteriores, fornecendo forte evidência de que as bases genéticas da plasticidade e do valor médio nesse e noutros caracteres estão relacionadas (Rocha *et al.*, 2008).

As inversões *PA0* e *PC0* também apresentam associação com o tamanho das asas de *D. mediopunctata*: indivíduos homocariotípicos para *PA0* têm asas maiores que indivíduos homocariotípicos para *PC0* quando criados em condições padronizadas. Em contraste com a pigmentação, a temperatura parece influenciar esse caráter no mesmo sentido da variação genética derivada da associação com as inversões, ou seja, indivíduos criados em temperaturas mais baixas têm asas maiores que aqueles criados em temperaturas mais altas (Hatadani & Klaczko, 2008). Em concordância com esse padrão, numa população natural do Parque Nacional do Itatiaia foi observado um cline genético altitudinal para o tamanho corporal, no qual indivíduos geneticamente maiores vieram de altitudes mais elevadas (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999a). Curiosamente, porém, as estimativas de herdabilidade no campo para tamanho corporal nessa espécie em geral são baixas (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999a; Bitner-Mathé & Klaczko, 1999b; Rocha, 2007). Em contraste com esses dois caracteres, o número de ramos da arista não apresenta padrão de variação em relação à estação ou à altitude de

coleta (Bitner-Mathé & Klaczko, 1998), indicando que é possível que este caráter não esteja envolvido em processos de adaptação altitudinal ou sazonal.

A Mata Atlântica é um dos *hotspots* de biodiversidade mais ameaçados do mundo, uma vez que, de sua cobertura vegetal original, restam apenas 7,5% (Myers *et al.*, 2000). Entre seus remanescentes, as maiores áreas preservadas encontram-se nas unidades de conservação localizadas na Serra do Mar e na Serra da Mantiqueira, na região sudeste do Brasil. Entre essas duas serras, encontra-se o vale do rio Paraíba, uma região por onde passa uma das principais estradas do país, e que deve representar uma barreira de áreas mais ou menos urbanizadas entre as duas serras. Além disso, devido às diferenças na posição em relação ao mar, altitude e latitude, é esperado que sejam observadas diferenças climáticas dentro de cada serra e entre serras (Oliveira-Filho & Fontes, 2000). Apesar de sua formação geológica comum, elas se desenvolveram em dois sistemas distintos que oferecem oportunidade ímpar para a pesquisa pelas características ecológicas, logísticas e paisagísticas (Almeida & Carneiro, 1998).

Resultados de trabalhos anteriores do laboratório apontam que as populações de *D. mediopunctata* de Juiz de Fora (MG), Itatiaia (RJ) e Serra do Japi (SP), localizadas na Serra da Mantiqueira, apresentam sinais de variação nas frequências das inversões do cromossomo II, com *DI-PB0* diminuindo e *DA-PA0* aumentando de frequência em direção ao sul (Ananina *et al.*, 2002; dados de Juiz de Fora não publicados). Assim, é possível que a heterogeneidade ambiental causada pela variação latitudinal nessa serra exerça alguma pressão seletiva sobre as populações dessa espécie. Além disso, o cline altitudinal para tamanho em Itatiaia (Bitner-Mathé & Klacko, 1999a) indica que essa escala de variação ambiental também pode ser importante para a espécie. Em relação à variação entre serras, a configuração em paralelo da Serra da Mantiqueira e da Serra do Mar levanta a questão sobre a possibilidade de os processos de adaptação local seguirem também algum tipo de paralelo nas populações que habitem as duas serras. Finalmente, é provável que o processo de fragmentação de habitat, tendo como principal fator a presença de um vale urbanizado entre as duas serras, atue sobre os processos evolutivos que envolvem as populações das duas serras.

Assim, populações naturais de *D. mediopunctata* nas serras do Mar e da Mantiqueira são um bom modelo para o estudo da evolução fenotípica em ambientes heterogêneos, uma vez que a quase totalidade dos estudos sobre esse tema é baseada em espécies cosmopolitas, especialmente *D. melanogaster*, que apresentam propriedades distintas de espécies não associadas ao homem. *D. mediopunctata* é, portanto,

um dos poucos modelos de espécie não cosmopolita e exclusiva de florestas a ser usado para estudar a evolução em ambientes heterogêneos, e pode fornecer novas e importantes informações para a discussão desse tema. Assim, estender a área de estudo de populações de *D. mediopunctata* representa uma continuação natural do programa de pesquisa desenvolvido pelo laboratório (Klaczko, 2006), que visa transformar *D. mediopunctata* numa espécie modelo para estudos de genética evolutiva.

## **OBJETIVOS**

O objetivo deste projeto é investigar as estratégias adaptativas de populações naturais de *D. mediopunctata* em localidades da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira, de acordo com diferentes escalas de variação ambiental, buscando avaliar diversos fatores que contribuem na determinação da distribuição da variação genética para marcadores neutros, caracteres morfológicos e suas normas de reação nas populações estudadas. Especificamente, pretende-se:

- i. Descrever a variação fenotípica e genética nas populações estudadas, para um conjunto de caracteres morfológicos e bionômicos, buscando relacionar sua variação com as diferentes escalas de variação ambiental dentro e entre populações: variação entre faces da mesma serra, entre serras, por latitude, e por altitude.
- ii. Descrever as populações estudadas para a variação de um conjunto de marcadores microssatélites, e descrever sua distribuição entre populações para estimativas de estruturação genética, verificando que fatores ambientais podem estar relacionados a essa distribuição.
- iii. Comparar os padrões de diferenciação genética para os caracteres quantitativos estudados com os padrões de diferenciação para microssatélites, usando as estimativas de estruturação desses marcadores para testar hipóteses de adaptação local.
- iv. Descrever as normas de reação em relação à temperatura para os caracteres estudados, buscando verificar possíveis relações entre os parâmetros das normas de reação e as características ambientais de cada população.
- v. Testar, para o conjunto de caracteres estudados, as correlações entre os parâmetros das normas de reação e o valor médio de cada caráter, no laboratório e no campo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **I. LOCAIS DE COLETA, DESENHO AMOSTRAL E MÉTODO DE COLETA.**

A Serra do Mar estende-se do norte de Santa Catarina até o norte do estado do Rio de Janeiro,

enquanto a Serra da Mantiqueira encontra-se numa posição mais para o interior e paralela à Serra do Mar, em latitudes menores, indo do estado de São Paulo, na região de Jundiá, até Minas Gerais, próximo a Juiz de Fora (Fig. 1).



**Figura 1.** Localização aproximada dos pontos de coleta. **Serra da Mantiqueira:** A, Itaiaia, RJ; B, Nazaré Paulista, SP. **Serra do Mar:** C, Teresópolis, RJ; D, Angra dos Reis/Paraty, RJ.

Inicialmente, foram selecionados quatro pontos em cada serra, que apresentavam as características favoráveis ao trabalho: grande área de mata nativa conservada, variação altitudinal dentro e entre locais e variação latitudinal. Desses oito pontos, foram escolhidos quatro pontos de coleta para este projeto. A escolha dos pontos de coleta teve o objetivo de possibilitar o teste de ao menos quatro possíveis fontes de variação: entre serras; entre faces da mesma serra (voltada para o litoral ou interior); por altitude e por latitude. Dessa forma, os locais de coleta foram escolhidos obedecendo à condição de que, para cada variável geográfica que se deseja testar houvesse ao menos duas réplicas em cada classe. Para possibilitar a distinção entre os possíveis efeitos da serra e da latitude, os pontos foram escolhidos com a condição de haver para cada ponto em uma serra, um ponto correspondente em latitude na outra serra – levando a uma configuração dos locais de coleta com quatro pontos distribuídos em duas latitudes diferentes, que estão destacados na Tabela 1. Em relação à altitude, foram escolhidos locais com diferentes amplitudes altitudinais, para permitir o estudo dos efeitos da variação dentro de cada local (entre altitudes) e entre locais com diferentes variações altitudinais (Tab.1, Fig.1). Dos quatro pontos restantes, alguns poderão



ser estudados futuramente, em função dos resultados obtidos, para complementação dos dados.

Inicialmente, serão feitas coletas exploratórias nas diferentes localidades, para ter uma primeira estimativa da frequência de *D. mediopunctata* nesses locais, e possibilitar a padronização dos métodos de análise no laboratório. Depois dessas coletas exploratórias será escolhida uma estreita faixa de altitude favorável à coleta de *D. mediopunctata* (provavelmente  $\approx$  850-900m), na qual serão feitas coletas em cada um dos locais garantindo a possibilidade de comparação.

Para caracterizar a variação entre faces da mesma serra, serão usadas as localidades da Serra do Mar, onde o contraste Mar x Vale Interior é mais promissor. As coletas serão realizadas em Teresópolis e Angra dos Reis – à mesma altitude – na face voltada para o litoral e na face voltada para o interior.

Para avaliar o efeito da altitude, serão feitas coletas em pontos com altitudes diferentes (pelo menos cinco) nas duas localidades da Serra do Mar.

Nas localidades de Itatiaia e Nazaré Paulista serão feitas coletas (somente na face da serra voltada para o litoral, na altitude pré-selecionada) para avaliar o contraste entre a Serra da Mantiqueira e a Serra do Mar. A Mata do Ribeirão Cachoeira, localizada na parte do interior do Planalto Atlântico, será utilizada para dar um parâmetro da diferenciação das populações da Serra da Mantiqueira em relação à sua face voltada para o interior, em contraste com a face voltada para o litoral.

Finalmente as quatro localidades permitem, também, a análise em dois pares a duas latitudes.

**Tabela 1.** Dados geográficos dos locais de coleta na Serra da Mantiqueira e na Serra do Mar (**em negrito**), e pontos de coletas complementares futuras, com as respectivas unidades de conservação.

	Local	Área	Altitude			Latitude	Longitude
			mín.	máx.	máx - mín		
S. da Mantiqueira	Lima Duarte – MG (Parque Estadual do Ibitipoca)	1488ha	800m	1784m	984m	21° 50' S	43° 47' O
	<b>Itatiaia – RJ</b> <b>(Parque Nacional do Itatiaia)</b>	<b>30.000ha</b>	<b>600m</b>	<b>2791m</b>	<b>2191m</b>	<b>22°19' – 22°45' S</b>	<b>44° 15' – 44° 50' O</b>
	Campos do Jordão – SP (Parque Estadual de Campos do Jordão)	8.341ha	1030m	2007m	977m	22° 44' S	45° 35' O
	<b>Nazaré Paulista –SP</b> <b>(APA)</b> <b>Mata do Ribeirão Cachoeira</b> <b>Campinas, SP</b>	<b>Frag. Peq.</b>	<b>800m</b>	<b>1200m</b>	<b>400m</b>	<b>23° 10' S</b>	<b>46° 23' O</b>
S. do Mar	<b>Teresópolis – RJ</b> <b>(Parque Nacional da Serra dos Órgãos)</b>	<b>10.600ha</b>	<b>300m</b>	<b>2263m</b>	<b>1963m</b>	<b>22° 24' – 22° 30' S</b>	<b>42° 57' – 43° 10' O</b>
	<b>Angra dos Reis/Paraty – RJ</b> <b>(Parque Nacional da Serra da Bocaina)</b>	<b>134.000ha.</b>	<b>200m</b>	<b>1600m</b>	<b>1400m</b>	<b>23° 13' S</b>	<b>44° 42' O</b>
	São Sebastião –SP (Parque Estadual da Serra do Mar)	40.100ha	200m	600m	400m	23° 45' S	45° 24' O
	Peruíbe – SP (Estação ecológica Juréia-Itatins)	79.830ha	0m	1369m	1369m	24° 19' S	46° 59' O

Em cada local, as coletas serão feitas sempre dentro da mata, onde serão colocadas iscas de banana

com fermento em pratos descobertos. As iscas serão posicionadas perto de cursos de água, onde a abundância de *D. mediopunctata* é maior (Medeiros, 2006). Em cada local, cerca de 20 iscas serão colocadas, com distância mínima de 5m entre elas. A coleta dos animais será feita passando uma rede entomológica sobre as iscas, durante até sete dias consecutivos em cada população, no mesmo horário a cada dia.

Os animais coletados serão levados para o laboratório e triados, com base na morfologia externa. As fêmeas de *D. mediopunctata* serão colocadas individualmente em tubos com meio de cultura para oviposição. Cada fêmea será transferida para um tubo novo por cinco vezes. Para minimizar a densidade de larvas em cada tubo e maximizar a chance de estabelecimento das linhagens isofêmeas, as fêmeas poderão ovipor por três dias em dois e por um dia em três tubos. Destes últimos, onde as fêmeas permanecerão apenas um dia, será possível estimar o tempo de desenvolvimento em cada progênie; bem como serão retirados os animais para análises morfométricas, garantindo que tenham crescido em condições quase ideais de baixa densidade. Os tubos com os ovos das fêmeas do campo serão mantidos sob mesmas condições ambientais, descritas a seguir. A confirmação da identificação das fêmeas do campo será feita quer a partir da análise do edeago dos machos da F1, quer pela análise de cromossomos politênicos (por outro colega do Laboratório).

## **II. ANÁLISE DE CARACTERES MORFOLÓGICOS**

### **i. Animais do campo**

Os machos de *D. mediopunctata* coletados serão analisados para o padrão de pigmentação e depois guardados individualmente em álcool absoluto, para análise posterior dos outros caracteres morfológicos. O mesmo será feito com as fêmeas de *D. mediopunctata* do campo, após o último dia de oviposição.

### **ii. Linhagens isofêmeas no laboratório**

Os tubos com as progênies (F1) das fêmeas do campo serão mantidos em câmara de germinação a 18°C com fotoperíodo de 12:12h até a emergência dos adultos, que serão mantidos na mesma câmara por no mínimo quatro dias para amadurecimento.

De cada tubo onde cada fêmea do campo ovipôs por um dia, três machos e três fêmeas serão analisados para o padrão de pigmentação abdominal. Um casal será guardado em tubo com álcool absoluto com identificação de estirpe e réplica para análise posterior dos demais caracteres morfológicos. O uso de um ambiente controlado no laboratório para a criação das progênies das fêmeas coletadas

permite que se interprete a variação entre as médias das progênes como variação genética (Prout & Barker, 1989; David *et al.*, 2005). Além disso, o uso de animais da F1 provenientes de diferentes tubos busca evitar o efeito de ambiente comum sobre o fenótipo dos indivíduos analisados (David *et al.*, 2005).

Dos tubos de três dias de oviposição serão guardados em álcool absoluto animais para as análises dos locos de microssatélites, bem como fundadas estirpes isofêmeas.

### iii. Caracteres a serem analisados

#### a. Tamanho e forma das asas

Para análise da variação do tamanho e forma das asas, será utilizado o método da elipse, proposto por Klaczko & Bitner-Mathé (1990). Para caracterizar cada indivíduo em relação a esse caráter, uma das asas será dissecada e montada em uma lâmina. A seguir, sua imagem será capturada utilizando uma câmera digital acoplada a uma lupa. Sobre o contorno da asa, serão marcados 30 pontos, utilizando o programa *tpsDIG* vol.20 (Rohlf, 1998). As coordenadas cartesianas desses pontos serão então usadas para estimar os parâmetros da equação da elipse ajustada ao contorno da asa pelo método dos mínimos quadrados. A partir dos parâmetros da elipse, serão calculados os raios dos dois círculos diretores da elipse ( $a$  e  $b$ ), que podem ser usados para descrever a variação de tamanho ( $W_{SI} = \sqrt{ab}$ ) e forma ( $b/a$ ) independentemente um do outro. A posição da inserção das veias das asas será descrita por meio das coordenadas radiais angulares de cada ponto (Klaczko & Bitner-Mathé 1990; Klaczko 2006). O programa ASALK v2.0 será usado para as estimativas desses parâmetros.

#### b. Tamanho do tórax

A medição do tórax de todos os indivíduos será realizada antes da dissecação das asas, para evitar deformações causadas pela manipulação para extração das mesmas. As medidas serão tomadas utilizando uma lupa com ocular milimetrada, medindo a distância da inserção da cabeça até a ponta do escutelo. Esse método de medida fornece uma boa estimativa do tamanho corporal, sendo simples e rápido (Thomas & Barker, 1993; Thomas 1993; Bitner-Mathé *et al.*, 1995). Além disso, pode-se usar essa medida para estimar a razão *asa/tórax*, que pode ser usada para avaliar a temperatura de desenvolvimento no campo dos animais coletados (Thomas, 1993).

#### c. Pigmentação abdominal

A pigmentação abdominal de *D. mediopunctata* é constituída por dois padrões: um formado por bandas escuras na região posterior dos primeiros tergitos e outro por um número variável de pintas na

região mediana dos últimos tergitos. Assim, quatro fenótipos podem ser observados nesta espécie: indivíduos sem pintas; com uma pinta (no tergito VI); duas pintas (uma no tergito V e outra no VI) ou três pintas (nos tergitos IV, V e VI). A variação deste caráter também ocorre no tamanho, forma e intensidade destas pintas, e provavelmente é reflexo de uma variação quantitativa subjacente, que segue um gradiente pósterio-anterior, de acordo com a variação na pigmentação abdominal encontrada em outras espécies de *Drosophila*.

Assim, para caracterizar a variação no número de pintas nos animais do campo e do laboratório, serão contadas as pintas de indivíduos adultos, no mínimo três dias após a emergência dos mesmos.

#### **d. Número de cerdas abdominais e número de ramos da arista**

Para cada animal analisado para os caracteres anteriores, o número de cerdas abdominais dos esternitos 2 a 5 e o número de ramos de uma das aristas será contado.

#### **iv. Análise dos dados de caracteres quantitativos**

Os dados de machos e fêmeas do campo serão analisados separadamente dos dados das progênes do laboratório. Em ambos os casos, serão testadas as correlações entre os caracteres quantitativos estudados, buscando evidências de correlações fenotípicas e genéticas entre caracteres.

Para cada caráter, serão testados por análise de variância (ANOVA) aninhada, os efeitos da coleta e da população aninhados dentro do efeito da serra. Da mesma forma cada localidade será testada aninhada dentro de latitude.

Para o efeito da face será testado numa ANOVA, que também testará o efeito das localidades (na Serra do Mar), e a interação destas duas variáveis. Para altitude, será feita uma ANCOVA onde a variável categórica será a localidade e a altitude a covariável.

Para estimar os componentes da variância fenotípica dos caracteres estudados, serão estimadas a média e a variância fenotípicas para os animais do campo e do laboratório. Com esses valores, pode-se estimar o valor da herdabilidade ( $h^2$ ) “natural” (Coyne & Beecham, 1987), que representa a proporção da variância fenotípica ( $V_P$ ) do campo devida à variância genética aditiva ( $V_A$ ), a partir do da regressão linear dos valores médios dos filhos pelos valores das mães coletadas no campo, para cada população. Dessa forma, o valor de  $h^2$  é estimado como o dobro do coeficiente angular ( $b$ ) da regressão linear. Estimativas de herdabilidade permitem quantificar a capacidade de um dado caráter responder à ação da seleção natural em uma determinada população, e por isso são de interesse para construção de hipóteses

de adaptação para um determinado caráter (Prout & Barker, 1989; Bitner-Mathé & Klaczko, 1999).

### III. MICROSSATÉLITES

Um conjunto de locos de microssatélites será usado para descrever a variação genética para marcadores neutros entre e dentro das populações estudadas. Para chegar a um conjunto de loci de microssatélites adequado à caracterização das populações, serão utilizados os *primers* provenientes do banco de microssatélites de *D. mediopunctata*, que se encontra em fase final de desenvolvimento num projeto de doutorado desenvolvido em parte em nosso laboratório.

Para cada fêmea do campo, uma fêmea da F1 criada no laboratório será usada para a extração do DNA genômico, utilizando um protocolo de extração com alta concentração de sal modificado a partir de Miller *et al.* (1988). A partir do DNA extraído, a amplificação do DNA por PCR (*polymerase chain reaction*) será feita usando um volume de reação de 20µl. Cada ciclo de amplificação consistirá de 32 ciclos de: 94°C por 40s, temperatura de anelamento (específica para cada par de *primers*) por 40s, e extensão a 72°C por 50s. Todos os PCR serão feitos com uma etapa inicial de 3min de desnaturação a 94°C. Os produtos das reações de PCR serão separados em gel de poliacrilamida 6%, e a tipagem será feita com o auxílio de DNA marcador, para definir os tamanhos dos fragmentos amplificados. Para melhor resolução das bandas no gel, as amostras serão tratadas previamente com formaldeído para desnaturação das fitas de DNA.

A análise dos dados de microssatélites será feita através do cálculo dos índices de diferenciação genética entre as populações, tais como  $F_{ST}$  (Whright, 1951; Weir & Cockerham, 1984), heterozigidade observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ) (Nei, 1978), número de alelos por loco, variância do número de repetições ( $V_r$ ) (Moran, 1975) e distância genética de Nei ( $D$ ) utilizando o programa MICROSATELLITE ANALYSER (MSA 4.05) (Dieringer & Schlötterer, 2003). Além disso, o programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995) será usado para testar se as populações encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg e testar a correlação entre a distância genética e a distância geográfica no conjunto de populações (teste de Mantel).

### IV. NORMAS DE REAÇÃO

#### a) Desenho experimental

A partir de cada população, serão fundadas até 15 linhagens isofêmeas que serão mantidas sob mesma temperatura no laboratório. Para cada população, uma ou mais amostras serão tiradas para

descrever as normas de reação dos caracteres analisados nos animais do campo. Para descrever as normas de reação das amostras de cada população, será estabelecido um gradiente térmico, variando de 14° a 24°C, com escala de 1°C, utilizando um aparelho modificado a partir de Fogleman (1978).

Para investigar o possível efeito de diferenças ambientais, como a amplitude de variação altitudinal, sobre a plasticidade fenotípica, a partir das linhagens das populações coletadas será usada uma amostra estratificada das estirpes de tal forma a cobrir todo o espectro de variação do caráter. Para cada população, 12 estirpes aleatórias serão ordenadas pelo tamanho médio do tórax. Uma das duas primeiras será escolhida por sorteio; outra estirpe será sorteada entre as duas seguintes; do próximo par uma será tomada ao acaso e assim por diante até completar 6 estirpes. Esse procedimento visa evitar que uma amostra aleatória gere, para cada população, um grupo restrito de normas de reação. Assim, cada população poderá ser caracterizada para o espectro possível de variação de normas de reação, possibilitando que, se houver diferenças nesse espectro entre as populações, estas sejam detectadas.

A montagem do gradiente seguirá um esquema semelhante ao usado por Rocha *et al.* (2008). Para coleta de larvas, serão colocadas lâminas com gel de ágar (1,2%) pinceladas com solução contendo fermento biológico, em garrafas com os adultos. No dia seguinte à colocação das lâminas, as larvas de 1° instar serão transferidas para tubos contendo 10ml de meio de cultura, com densidade de 20 larvas por tubo. Cada tubo será colocado em um grau de variação no gradiente térmico, de 14°C a 24°C. Para cada linhagem, duas réplicas serão analisadas em diferentes ocasiões. Será feita a observação diária das temperaturas e fases de desenvolvimento, e os adultos serão retirados diariamente dos tubos a cada dia após a primeira emergência. A análise de todos os caracteres será feita no mínimo cinco dias após a retirada dos indivíduos do gradiente.

As estirpes das seis populações (duas localidades de duas faces da Serra da Mantiqueira, e duas localidades de uma face da Mantiqueira) serão testadas sempre em grupos contendo uma de cada localidade e uma estirpe padrão do laboratório como controle. Cada estirpe será testada duas vezes aleatorizando-se as estirpes a cada rodada de testes.

#### **b) Caracterização das normas de reação**

Para cada caráter, será feita uma análise de covariância (ANCOVA) testando os efeitos da temperatura (co-variável), das linhagens aninhadas por população, do sexo, da população e interações entre fatores. Finalmente, para descrever as normas de reação de cada linhagem de cada população, será

feita a análise da curva de resposta, por um procedimento de seleção progressiva da ordem da regressão do caráter pela temperatura, que permite estabelecer o polinômio ajustado aos valores que melhor descreve a variação encontrada, mantendo a significância do parâmetro que determina a ordem do polinômio (Zar, 1999). Para cada caráter, serão testadas as correlações entre o valor fenotípico médio e o coeficiente quadrático da equação de segundo grau com melhor ajuste à norma de reação em cada caso.

## **V. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL E FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS**

Para investigar as estratégias adaptativas das populações de *D. mediopunctata* escolhidas, usaremos uma dupla abordagem do problema. Por um lado, em busca de evidências de adaptação local, iremos caracterizar a variação genética para caracteres morfológicos e marcadores neutros, em várias escalas de variação ambiental: entre serras; entre latitudes; entre altitudes e entre faces da serra dentro da Serra do Mar. Por outro lado, iremos caracterizar a plasticidade fenotípica dos caracteres estudados, verificando se há padrões que indiquem uma função adaptativa da plasticidade nas populações estudadas, utilizando um método de descrição detalhada das normas de reação desses caracteres, possibilitando uma interpretação mais clara e direta em relação à variação do campo.

Os caracteres foram escolhidos de acordo com seu suposto envolvimento em processos adaptativos relativos às diferentes escalas de variação ambiental, de modo a possibilitar que diferentes padrões evolutivos sejam revelados pelos dados. Assim, um grupo de caracteres provavelmente mais ligados ao valor adaptativo (tempo de desenvolvimento, tamanho do corpo, tamanho da asa) e outro grupo de caracteres provavelmente menos associados ao valor adaptativo (pigmentação, número de cerdas abdominais e número de ramos da arista) foram escolhidos para análise. Com isso, esperamos otimizar os esforços de coleta e análises em busca de evidências de adaptação morfológica local.

Para testar se as possíveis diferenças entre populações para os caracteres morfológicos analisados podem estar envolvidas em processos de adaptação local, dois tipos de análises serão feitos:

Para a variação altitudinal (dentro da população), será usado o método proposto por Gockel *et al.* (2001), que consiste em inserir, na comparação entre a diferenciação para caracteres quantitativos e o esperado para evolução neutra, uma variável explicativa ambiental. Assim, para determinar a proporção da variação quantitativa que pode ser explicada pela variação ambiental, serão feitas regressões das médias das linhagens isofêmeas das diferentes populações, criadas sob mesmas condições, pela altitude de cada ponto de coleta. O mesmo será feito para os locos de microsatélites analisados, fazendo a

regressão linear da frequência dos alelos mais comuns de cada loco como variável dependente da altitude de cada ponto. Essas regressões servirão como um parâmetro para o padrão de variação esperado por evolução neutra, e sua comparação com as regressões para caracteres quantitativos permite determinar a partir de que ponto se pode rejeitar a hipótese de evolução neutra para os caracteres quantitativos analisados (Gockel et al., 2001).

Numa outra abordagem, sem a inclusão *a priori* de uma variável ambiental explicativa, a diferenciação genética entre populações para os caracteres quantitativos estudados será estimada pelo índice  $Q_{ST}$ , que será estimado a partir da variância genética média dentro das populações ( $V_{GW}$ ) e a variância genética entre populações ( $V_{GB}$ ), para cada caráter. As estimativas desses componentes da variância genética podem ser facilmente feitas a partir das médias dentro e entre populações para cada caráter (Prout & Barker, 1989), derivadas das análises dos animais do campo e das progênes do laboratório. Assim, o índice  $Q_{ST}$  será calculado segundo a equação:  $Q_{ST} = V_{GB} / (V_{GB} + 2V_{GW})$  (Prout & Barker, 1993; Spitze, 1993). Para testar a hipótese nula de que a diferenciação genética para os caracteres analisados é devida à evolução neutra, será feita a comparação dos valores de  $Q_{ST}$  para cada caráter e de  $F_{ST}$  estimado a partir da análise de microssatélites (Prout & Barker, 1993; Spitze, 1993). Esse método, ainda que não seja muito poderoso para análise de poucas populações, permite evidenciar padrões de diferenciação muito acentuados (Whitlock, 2008; Martin *et al.*, 2008), o que pode ocorrer se as pressões seletivas causadas pela heterogeneidade ambiental entre populações forem grandes. Essa metodologia, também, pode ser usada para detectar evidências sugestivas de processos adaptativos, que serviriam como hipóteses de trabalho para pesquisas futuras (ampliando o número de localidades por latitude e/ou altitude, *etc.* )

Finalmente, será verificado se a possível variação dos parâmetros das normas de reação de cada caráter pode ser explicada pela variação ambiental entre populações. Assim, é esperado que populações em ambientes sujeitos a maior variação ambiental apresentem maior plasticidade fenotípica que aquelas populações em ambientes mais homogêneos. No caso das populações escolhidas, a variação ambiental dentro de cada população pode estar associada à amplitude altitudinal, ou fatores que alterem a amplitude da variação sazonal, como face de exposição ao Mar. Além disso, os padrões de diferenciação genética para os caracteres testados e os resultados de sua comparação com os marcadores neutros serão



contrastados com a variação de normas de reação entre populações, buscando padrões de associação entre os dois conjuntos de resultados.

#### PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA

	1° semestre	2° semestre
1° ano	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coletas exploratórias em diversas localidades.</li> <li>- Padronização de métodos.</li> <li>- Estimativas de repetibilidade das medidas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coletas: Itatiaia-Teresópolis Nazaré Paulista - Angra</li> <li>- Estabelecimento de linhagens isofêmeas.</li> <li>- Análise de animais do campo e F1.</li> </ul>
2° ano	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coletas: Itatiaia-Teresópolis Nazaré Paulista- Angra</li> <li>- Estabelecimento de linhagens isofêmeas.</li> <li>- Análise de animais do campo e F1.</li> <li>- Análise de normas de reação.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coletas adicionais (se necessário)</li> <li>- Análise dos caracteres morfológicos das F1 e animais do campo.</li> <li>- Análise de normas de reação.</li> <li>- Análise de microssatélites.</li> </ul>
3° ano	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Análise de microssatélites.</li> <li>- Análise de normas de reação.</li> <li>- Finalização de análises incompletas (solução de problemas imprevistos)</li> <li>- Redação de trabalhos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Finalização de análises incompletas (solução de problemas imprevistos)</li> <li>- Análise geral de resultados e síntese.</li> <li>- Redação da tese.</li> </ul>

#### BIBLIOGRAFIA FUNDAMENTAL

- Almeida, F.F.M. & Carneiro, C.D.R. 1998. Origem e Evolução da Serra do Mar. Rev. Bras. Geoc. 28: 135-150.
- Ananina, G. Peixoto, A.A., Bitner-Mathé, B.C., Souza, W.N., da Silva, L.B., Valente, V.L.S. & Klaczko, L.B. 2004. Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: seasonal, altitudinal, and latitudinal variation. Gen. Biol. Mol. 27: 61-69.
- Atkinson, D. & Sibly, R.M. 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. Trends Ecol. Evol. 12: 235-239.
- Azevedo, R.B.R., French, V. & Partridge, L. 1996. Thermal evolution of egg size in *Drosophila melanogaster*. Evolution 50: 2338-2345.
- Bächli, G. TaxoDros – The database on Taxonomy of Drosophilidae. Database 2008/05. <http://taxodros.unizh.ch/> Acessado em 22 de agosto de 2008.
- Barker, J.S.F., East, P.D. & Weir, B.S. 1986. Temporal and microgeographic variation in allozyme frequencies in a natural population of *Drosophila buzzatii*. Genetics 112: 577-61.
- Bernardo, U., P.A. Pedata and G. Viggiani. 2007. Phenotypic plasticity of pigmentation and morphometric traits in *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). Bull. Entomol. Res. 97: 101-109.
- Bitner-Mathé, B.C. & Klaczko, L.B. 1998. Variation and heritability of arisal morphology in a natural population of *Drosophila mediopunctata*. Hereditas 128: 67-71.
- Bitner-Mathe, B.C. & L.B. Klaczko, 1999a. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal and microgeographical variation. Genetica 105: 35-42.
- Bitner-Mathe, B.C. & L.B. Klaczko, 1999b. Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. Heredity 83: 688-696.
- 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.
- Brisson, J.A., De Toni, D.C., Duncan, I. & Templeton, A.R. 2005. Abdominal pigmentation variation in *Drosophila polymorpha*: Geographic variation in the trait, and underlying phylogeography. Evolution, 59: 1046-1059.
- Byers, D.L. 2005. Evolution in heterogeneous environments and the potential of maintenance of genetic variation in traits of adaptive significance. Genetica 123: 107-124.

- Cabanita, R. & Atkinson, D. 2006. Seasonal time constraints do not explain exceptions to the temperature size rule in ectotherms. *OIKOS* 114: 431-440.
- Calboli, F.C.F., Kennington, W. J. & Partridge, L. 2003. QTL mapping reveals a striking coincidence in the positions of genomic regions associated with adaptive variation in body size in parallel clines of *Drosophila melanogaster* on different continents. *Evolution* 57: 2653–2658.
- Charlesworth, B., M. Nordborg, Charlesworth, D. 1997. The effects of local selection, balanced polymorphism and background selection on equilibrium patterns of genetic diversity in subdivided populations. *Genet. Res. Camb.* 70: 155–174.
- Chunco, A.J., McKinnon, J.S., Servedio, M.R. 2007. Microhabitat variation and sexual selection can maintain male color polymorphisms. *Evolution* 61: 2504–2515.
- Collinge, J.E., Hoffmann, A.A. & Mckechnie, S.W. 2006. Altitudinal patterns for latitudinally varying traits and polymorphic markers in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *J. Evol. Biol.* 19: 473–482.
- Colson, I. 2002. Selection and gene flow between microenvironments: the case of *Drosophila* at Lower Nahal Oren, Mount Carmel, Israel. *Molecular Ecology* 11: 1311–1316.
- Conover, D.O. & Schultz, E.T. 1995. Phenotypic similarity and the evolutionary significance of coutergradient variation. *Trends Ecol. Evol.* 10(6): 248-252.
- Coyne, J & Beecham, E. 1987. Heritability of two morphological characters within and among natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117: 727-737.
- David, J.R., Legout, H., Moreteau, B., 2006. Phenotypic plasticity of body size in a temperate population of *Drosophila melanogaster*: when the temperature-size rule does not apply. *J. Genet.*, 85: 9-23.
- David, J.R., P. Gibert, H. Legout, G. Pétavy, P. Capy and B. Moreteau. 2005. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative traits analysis in natural populations. *Heredity* 94:3–12.
- Davis, A.K., B.D. Farrey and S. Altizer. 2005. Variation in thermally induced melanism in monarch butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) from three North American populations. *J. Therm. Biol.* 30:410–421.
- De Jong, G. & Bochdanovits, Z. 2003. Latitudinal clines in *Drosophila melanogaster*: body size, allozyme frequencies, inversion frequencies, and the insulin-signalling pathway. *Journal of Genetics*. 82: 207-223.
- Dieringer, D. & Schlötterer, C. 2003. Microsatellite analyzer (MSA)—a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3: 167–169.
- Dombeck, I. & Jaenike, J. 2004. Ecological genetics of abdominal pigmentation in *Drosophila falleni*: a pleiotropic link to nematode parasitism. *Evolution* 58: 587-596.
- Ernande, B. & Dieckmann, U. 2004. The evolution of phenotypic plasticity in spatially structured environments: implications of intraspecific competition, plasticity costs and environmental characteristics. *J. Evol. Biol.* 17: 613–628
- Fogleman, J. 1978. A thermal gradient bar for the study of *Drosophila*. *Dros. Inf. Serv.* 53: 212.
- Frazier, M.R., Harrison, J.F., Kirkton, S.D. & Roberts, S.P. 2008. Cold rearing improves cold-flight performance in *Drosophila* via changes in wing morphology. *Jour. Experimental Biol.* 211: 2116-2122.
- Frota-Pessoa, O. 1954. Revision of the tripunctata group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). *Arquivos do Museu Paranaense*, n. 10, p. 253-304.
- Gibert, P., B. Moreteau and J.R.David. 2004a. Phenotypic plasticity of body pigmentation in *Drosophila melanogaster*: Genetic repeatability of quantitative parameters in two successive generations. *Heredity* 92:499-507.
- Gibert, P., Capy, P., Imasheva, A., Moreteau, B., Morin, J.P., P´etavy, G. & David, J.R. 2004b. Comparative analysis of morphological traits among *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*: genetic variability, clines and phenotypic plasticity. *Genetica*: 120-179.
- Gibert, P., Moreteau, B., Munjal, A. & David, J.R. 1999. Phenotypic plasticity of abdominal pigmentation in *Drosophila kikkawai*: multiple interactions between a major gene, sex, abdomen segment and growth temperature. *Genetica* 105: 165-176.
- Gockel, J., Kennington, W.J., Hoffmann, A.A., Goldstein, D.B. & Partridge, L. 2001. Nonclinality of molecular variation implicates selection in maintaining a morphological cline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 158: 319–323.
- Guo, W., Li, B., Zhang, X. & Wang, R. 2007. Architectural plasticity and growth responses of *Hippophae rhamnoides* and *Caragana intermedia* seedlings to simulated water stress. *Journal of Arid Environments* 69: 385–399.

- Hall, D., Luquez, V., Garcia, V.M., St Onge, K.R., Jansson, S. & Ingvarsson, P.K. 2007. Adaptive population differentiation in phenology across a latitudinal gradient in european aspen (*Populus tremula*): a comparison of neutral markers, candidate genes and phenotypic traits. *Evolution* 61: 2849–2860.
- Hatadani, L.M. 2002. Polimorfismo de Coloração em *Drosophila mediopunctata*. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- Hatadani, L.M. and L.B. Klaczko. 2008. Shape and size variation on the wing of *Drosophila mediopunctata*: influence of chromosome inversions and genotype-environment interaction. *Genetica* 133: 335-342.
- Hatadani, L.M., Baptista, J.C.R., Souza, W.N. & Klaczko, L.B. 2004. Colour polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: genetic (chromosomal) analysis and nonrandom association with chromosome inversions. *Heredity* 93: 525-534.
- Hedrick, P.W. 2006. Genetic Polymorphism in Heterogeneous Environments: The Age of Genomics. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37:67–93.
- Hedrick, P.W., Ginevan, M.E., Ewing, E.P. 1976. Genetic Polymorphism in Heterogeneous Environments. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 7: 1-32.
- Hollander, J. 2008. Testing the grain-size model for the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 62: 1381–1389.
- Karl, I., Janowitz, S.A. & Fischer, K. 2008. Altitudinal life-history variation and thermal adaptation in the copper butterfly *Lycaena tityrus*. *Oikos* 117: 778-788.
- Klaczko, L.B. & B.C. Bitner-Mathe, 1990. On the edge of a wing. *Nature* 346: 231.
- Klaczko, L.B. 2006. Evolutionary Genetics of *Drosophila mediopunctata*. *Genetica* 126:43–55.
- Lenormand, T., 2002 Gene flow and the limits to natural selection. *Trends Ecol. Evol.* 17: 183–189.
- Levene, R. 1953. Genetic equilibrium when more than one ecological niche is available. *Am. Nat.* 87: 331–333.
- Levins, R. 1964. The theory of fitness in a heterogeneous environment. Iv. The adaptive significance of gene flow. *Evolution* 18: 635-638.
- Levins, R. 1968. *Evolution in changing environments*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.
- Litt, M. & Luty J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44:397-401.
- Martin, G., Chapuis, E. & Goudet, J. 2008. Multivariate  $Q_{ST}$  -  $F_{ST}$  comparisons: a neutrality test for the evolution of the G matrix in structured populations. *Genetics*. *no prelo*. doi: 10.1534/genetics.107.080820
- Medeiros, H.F. 2006. Relações entre características bionômicas e fisiológicas de espécies de *Drosophila* e a distribuição de suas abundâncias na natureza. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- Miller SA, Dykes DD & Polesky, HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215.
- Moran, P.A.P. 1975. Wandering distributions and the electrophoretic profile. *Theoretical Population Biology*, 8, 318–330.
- Moreteau, B., P. Gibert, J.M. Delpuech, G. Pétavy and J.R. David. 2003. Phenotypic plasticity of sternopleural bristle number in temperate and tropical populations of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res. Camb.* 81:25–32.
- Munjal, A.K., Karan, D., Gibert, P., Moreteau, B., Parkash, R. & David, J.R. 1997. Thoracic trident pigmentation in *Drosophila melanogaster*: latitudinal and altitudinal clines in Indian populations. *Genet. Sel. Evol.* 29: 601–610.
- Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 852-858.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583–590.
- Oliveira Filho, A.T. & Fontes, M.A.L. 2000 Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forest in south-eastern Brazil, and the influence of climate. *Biotropica* 32: 793-810.
- Peixoto, A.A. & Klaczko, L.B. 1991. Linkage disequilibrium of chromosomal inversion polymorphisms of *Drosophila*. *Genetics* 129: 773-777.
- Pétavy, G., Moreteau, B., Gibert, P., David, J.R. 2002. Phenotypic plasticity of body pigmentation in *Drosophila*: influence of a developmental thermoperiodic regime in two sibling species. *Physiol. Entomol.* 27: 124-135.

- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now?. *Trends Ecol. Evol.* 20:481–486.
- Prout, T. & Barker, J.S.F. 1989. Ecological Aspects of the Heritability of Body Size in *Drosophila buzzatii*. *Genetics* 123: 803-813.
- Prout, T., and J. S. Barker, 1993 F statistics in *Drosophila buzzatii*: selection, population size and inbreeding. *Genetics* 134: 369–375.
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. GENEPOP version 1.2.: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.
- Rocha, F. B. 2007. Pigmentação em *Drosophila mediopunctata*: plasticidade fenotípica e herdabilidade. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- Rocha, F.B. Medeiros, H.F. & Klaczko, L.B. 2008. The reaction norm for abdominal pigmentation and its curve in *Drosophila mediopunctata* depend on the mean phenotypic value. *Evolution, no prelo.*
- Rohlf, F.J., 1998. TpsDig, version 1.20. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, Available from <http://life.bio.sunysb.edu/morph>.
- Sasaki, A. & de Jong, G. 1999. Density Dependence and Unpredictable Selection in a heterogeneous Environment: Compromise and Polymorphism in the ESS Reaction Norm. *Evolution* 53: 1329-1342.
- Scheiner, S.M. & Lyman, R.F. 1991. The genetics of phenotypic plasticity. II. Response to selection. *J. Evol. Biol.* 4: 23-50.
- Schlichting, C.D. & Smith, H. 2002. Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. *Evolutionary Ecology* 16: 189–211.
- Schlötterer C., Vogl C., Tautz D. 1997. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. *Genetics* 146: 309–320.
- Schmidt, P.S., Matzkin, L., Ippolito, M. & Eanes, W.F. 2005. Geographic variation in diapause incidence, life-history traits, and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 59:1721–1732.
- Spitze, K. 1993. Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics*: 135: 367–374.
- Star, B., Stoffels, R.J. & Spencer, H.G. 2007. Single-Locus Polymorphism in a Heterogeneous Two-Deme Model. *Genetics* 176: 1625–1633.
- Stockwell, C.A., Hendry, A.P. & Kinnison, M.T. 2003. Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends Ecol. Evol.* 18: 94-101.
- Thomas, R.H. & Barker, J.S.E. 1993. Quantitative genetic analysis of the body size and shape of *Drosophila buzzatii*. *Theor. Appl. Genet.* 85: 598-608.
- Thomas, R.H. 1993. Ecology of body size in *Drosophila buzzatii*: untangling the effects of temperature and nutrition. *Ecological Entomology* 18: 84-90.
- Tidon, R. 2006. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. *Biol. Jour. Lin. Soc.* 87: 233–247.
- Van Der Linde, K. & Sevenster, J.G. 2006. Local adaptation of developmental time and starvation resistance in eight *Drosophila* species of the Philippines. *Biol. Jour. Linn. Soc.* 87: 115–125.
- Via, S. and R. Lande. 1985. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39:505–522.
- Via, S., R.Gomulkiewicz, G. De Jong, S.M. Scheiner, C.D. Schlichting and P.H. Van Tienderen. 1995. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends Ecol. Evol.* 10:212-317.
- Watt, W.B. 1968. Adaptive Significance of Pigment Polymorphisms in *Colias* butterflies. I. Variation of Melanin Pigment in Relation to Thermoregulation. *Evolution* 22: 437-458.
- Weeks, A. R. & Hoffmann, A.A. 1998. Intense selection of mite clones in a heterogeneous environment. *Evolution* 52: 1325-1333.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.
- Whitlock, M.C. 2008. Evolutionary inference from  $Q_{ST}$ . *Molecular Ecology* 17: 1885-1896.
- Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323–354.
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice Hall.
- Zhang, X. 2005. Evolution and maintenance of the environmental component of the phenotypic variance: benefit of plastic traits under changing environments. *Am. Nat.* 166: 569-580.
- Zhivotovsky, L.A., Feldman, M.W. & Bergman, A. 1996. On the Evolution of Phenotypic Plasticity in a Spatially Heterogeneous Environment. *Evolution* 50: 547-558.