

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**LUÍSA DE PAULA BOUZADA DIAS**

**DO SUTIL AO NOTÁVEL: RÁPIDAS MODIFICAÇÕES FENOTÍPICAS EM  
*Drosophila* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2024**

**LUÍSA DE PAULA BOUZADA DIAS**

**DO SUTIL AO NOTÁVEL: RÁPIDAS MODIFICAÇÕES FENOTÍPICAS EM  
*Drosophila* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Karla Suemy Clemente Yotoko

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

D541d  
2024

Dias, Luísa de Paula Bouzada, 1998-  
Do sutil ao notável: rápidas modificações fenotípicas em  
*Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) / Luísa de Paula Bouzada  
Dias. – Viçosa, MG, 2024.  
1 dissertação eletrônica (34 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Karla Suemy Clemente Yotoko.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Entomologia, 2024.  
Referências bibliográficas: f. 28-34.  
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.330>  
Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Drosophila*. 2. Domesticação. 3. Morfologia -  
Matemática. 4. Plasticidade. 5. Fenótipo. I. Yotoko, Karla  
Suemy Clemente, 1974-. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia. III. Título.

CDD 22. ed. 595.774


**LUÍSA DE PAULA BOUZADA DIAS**

**DO SUTIL AO NOTÁVEL: RÁPIDAS MODIFICAÇÕES FENOTÍPICAS EM  
*Drosophila* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2024.


Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 **LUISA DE PAULA BOUZADA DIAS**  
Data: 08/07/2024 14:43:38-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Luísa de Paula Bouzada Dias**

**Autora**

Documento assinado digitalmente  
 **KARLA SUEMY CLEMENTE YOTOKO**  
Data: 08/07/2024 14:41:18-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Karla Suemy Clemente Yotoko**

**Orientadora**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço muito e sempre aos meus pais, Cristiane e Jesus, por acreditarem em mim e nos meus objetivos e serem exemplo e inspiração para mim.

Ao meu irmão Henrique por trazer alegria à minha vida há 18 anos.

Às minhas avós, Marisa e Joana, aos meus tios e primos por torcerem por mim e celebrarem as minhas conquistas.

À minha madrinha Iara por se fazer presente e encorajar os meus planos desde sempre.

Ao Caique, pelo companheirismo e pelo incentivo diários.

Ao Laboratório de Bioinformática e Evolução, onde estudo e trabalho desde 2018. O LBE é um lugar especial porque nele há pessoas que se dedicam diariamente. Por isso agradeço muito à querida professora Karla, por me orientar para além da minha formação e sempre estar disposta a me ajudar e a me acolher. Às minhas amigas, Marina e Letícia, pelo apoio, pelo cuidado e parceria. Elas foram essenciais para o desenvolvimento e a conclusão de mais esta etapa na minha vida.

Aos amigos que conheci na graduação, Carol, Jade e Filipe, agradeço por me fortalecerem desde 2016 com carinho, risadas e zelo pela nossa amizade. Aos amigos da Entomologia, por compartilharem a rotina da pós-graduação e trazerem leveza e alegria a ela.

Ao professor Lino, pela gentileza de ter cedido seu tempo e seu trabalho ao realizar as fotos presentes nesta pesquisa.

Aos professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Entomologia e ao Departamento de Entomologia por complementarem minha formação e pelo auxílio no mestrado. Agradeço também aos professores de outros departamentos pelas disciplinas que ofertaram, pela ajuda e assistência que cederam prontamente quando os procurei.

À Universidade Federal de Viçosa pela minha formação desde a graduação, pelo ensino público e de qualidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

DIAS, Luísa P. B., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Do sutil ao notável: rápidas modificações fenotípicas em *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae)**. Orientadora: Karla Suemy Clemente Yotoko.

O processo de domesticação, essencial para o avanço da humanidade, envolve a manutenção controlada de organismos em ambientes distintos do seu habitat. Charles Darwin observou que a domesticação desencadeia modificações fenotípicas, tanto sutis quanto notáveis. Nas ciências biológicas, a domesticação de drosófilas foi fundamental para utilizá-las como modelo de estudos. Este trabalho avaliou 12 linhagens isofêmea de *Drosophila sturtevanti* Duda, 1927 desde a coleta em campo (G0) até a décima geração (F1 - F10). O presente estudo registrou modificações notáveis (deformações) até F10 e, utilizando morfometria geométrica, identificou mudanças sutis em tamanho e forma das asas dos machos entre G0, F1 e F10. O número de diferenças notáveis não se correlacionou com a intensidade de modificações sutis. O tamanho das asas diminuiu entre F1 e F10, provavelmente pelo aumento da densidade larval. A forma das asas foi avaliada por meio de seus componentes principais (PCs), com PC1 apresentando variação crescente entre as gerações e PC2 mostrando aumento de variação de G0 para F1 e redução de F1 para F10, confirmando o surgimento de modificações sutis e evidenciando a ação da seleção natural durante o processo.

Palavras-chave: Domesticação; Morfometria Geométrica; Plasticidade Fenotípica.

## ABSTRACT

DIAS, Luísa P. B., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2024. **From subtle to remarkable: rapid phenotypic changes in *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae)**. Adviser: Karla Suemy Clemente Yotoko.

The domestication process, essential for the advancement of humanity, involves the controlled maintenance of organisms in environments distinct from their habitat. Charles Darwin observed that domestication triggers both subtle and remarkable phenotypic changes. In the biological sciences, the domestication of *Drosophila* has been crucial for using them as a model for studies. This study evaluated 12 isofemale lines of *Drosophila sturtevantii* Duda, 1927, from field collection (G0) to the tenth generation (F1 - F10). The present study recorded notable modifications (deformations) up to F10 and, by using geometric morphometrics, identified subtle changes in size and shape of male wings among G0, F1, and F10. The number of notable differences did not correlate with the intensity of subtle modifications. Wing size decreased between F1 and F10, probably due to increased larval density. Wing shape was evaluated through its principal components (PCs), with PC1 showing increasing variation across generations and PC2 indicating an increase in variation from G0 to F1 and a decrease from F1 to F10, confirming the emergence of subtle modifications and highlighting the action of natural selection during the process.

Keywords: Domestication; Geometric Morphometrics; Phenotypic plasticity.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
2.1 COLETA .....	11
2.2 LINHAGENS .....	12
2.3 DEFORMAÇÕES .....	12
2.4 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA .....	12
<b>2.4.1 Erro na delimitação dos marcos anatômicos</b> .....	<b>14</b>
<b>2.4.2 Identificação de <i>outliers</i></b> .....	<b>14</b>
<b>2.4.3 Correções de Procrustes</b> .....	<b>15</b>
<b>2.4.4 Alometria</b> .....	<b>15</b>
<b>2.4.5 Análise de Componentes Principais (PCA)</b> .....	<b>16</b>
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	16
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
3.1 DEFORMAÇÕES .....	17
3.2 ERRO NA DELIMITAÇÃO DOS MARCOS ANATÔMICOS .....	18
3.3 VARIAÇÕES NO TAMANHO .....	18
3.4 ALOMETRIA .....	19
3.5 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) .....	19
3.6 VARIAÇÕES NA FORMA .....	22
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>28</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em “A Origem das Espécies”, Darwin (1859) relatou seu encanto por pombos domesticados que deram a ele a percepção de que a domesticação gera formas surpreendentemente distintas das normalmente encontradas em populações naturais (Darwin, 1868). Na domesticação, indivíduos provenientes de populações selvagens são acondicionados em um ambiente protegido de predadores, com nutrientes em abundância e condições gerais mais estáveis em comparação ao ambiente natural (Boice, 1973; Simões et al., 2009).

Por um lado, o novo ambiente pode aumentar a plasticidade fenotípica dos indivíduos por relaxar severas pressões seletivas presentes no ambiente natural, aumentando a viabilidade de indivíduos mutantes no sítio de domesticação em comparação com o campo (Czesak et al., 2006; Garland & Kelly, 2006). Por outro, o novo ambiente pode ser percebido como uma modificação abrupta que pode provocar alterações na regulação gênica durante o desenvolvimento embrionário, gerando diferentes fenótipos que aparecem já na primeira geração em confinamento (Christie et al., 2016; Costa, 2021) num fenômeno conhecido como síndrome de domesticação (Wilkins et al., 2014). Em uma analogia, Darwin (1868) sugeriu que mudanças no ambiente são como fagulhas que provocam alterações nos indivíduos. A alteração propriamente dita é como a chama iniciada pela fagulha, cujas propriedades dependem do combustível que está sendo queimado, ou seja, de características do indivíduo.

O sucesso da domesticação de espécies de *Drosophila* foi fundamental para o seu uso como organismo modelo de estudos na biologia (Kohler, 1993; Roberts, 2006). Em geral, o processo se inicia com o estabelecimento de linhagens (Hales et al., 2015), que muitas vezes descendem de uma única fêmea (linhagens isofêmea). Diversos pesquisadores utilizam linhagens isofêmea mantidas há décadas em *Stock Centers* (David et al., 2005; Mackay & Huang, 2017; Stobdan et al., 2024; Stocker & Gallant, 2008). Isto se justifica pelo fato de que linhagens recém coletadas estão em pleno processo de adaptação às condições de laboratório, o que poderia afetar resultados de experimentos (Harshman & Hoffmann, 2000; Schlötterer, 2023). Outros pesquisadores optam por coletar e manter suas próprias linhagens isofêmea que, em geral, também precisam se adaptar às condições de laboratório (Matos et al., 2000; Moreira et al., em preparação; Santos et al., 2010). É importante mencionar que nem

todas as fêmeas coletadas geram linhagens isofêmea longevas (observação pessoal), sugerindo que as condições do laboratório também podem impor restrições à manutenção de algumas linhagens.

Linhagens mantidas por décadas nos laboratórios devem apresentar um alto índice de endogamia (David et al., 2005). Ainda assim, é possível encontrar indivíduos com fenótipos alterados após sucessivas gerações de acasalamento entre descendentes de uma mesma fêmea (D'Ávila et al., 2008). Isto pode estar relacionado à variabilidade genética de cada linhagem, determinada pelo número de parceiros com os quais cada fêmea coletada acasalou e pela heterozigotidade apresentada pelos indivíduos desta geração fundadora. Neste caso, as alterações seriam resultado da produção de indivíduos homozigotos recessivos, mais comuns em ambientes sob endogamia e que, por estarem em condições menos seletivas, sobreviveriam em laboratório.

No entanto, fatores ambientais como a temperatura, também podem desencadear o aparecimento de fenótipos alterados que podem ser confundidos com mutantes. D'Ávila et al. (2008) relacionaram o aumento da frequência de alterações fenotípicas com o aumento da temperatura de criação em uma das linhagens de *Drosophila willistoni* Sturtevant, 1916 mantidas no laboratório. Os autores se referiram a esta linhagem como hipermutável por ter apresentado mais alterações que as outras da mesma espécie sob as mesmas condições. Eles argumentaram que esta linhagem tem maior capacidade que as outras de alterar o fenótipo, via mecanismos de regulação gênica ou interferência de elementos transponíveis, que acabam gerando alterações fenotípicas ao longo do tempo. Qualquer que seja o motivo da alta frequência de indivíduos alterados numa linhagem, é evidente que se trata de uma característica de certas linhagens e não da espécie em estudo ou da população (D'Ávila et al., 2008; Loreto et al., 1998; Sultan, 2021).

Nossa equipe do Laboratório de Bioinformática e Evolução (LBE) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) coletou fêmeas de uma população de *Drosophila sturtevanti* Duda, 1927 e estabeleceu linhagens isofêmea. Esta espécie pertence ao grupo *Drosophila saltans*, um grupo neotropical que ocorre em diversos biomas brasileiros (de Campos Bicudo, 1973; Dobzhansky & Streisinger, 1944; Magalhães, 1962). Nosso grupo de estudos faz coletas frequentes em um fragmento de Mata Atlântica dentro da UFV, que tem *D. sturtevanti* como a espécie mais abundante dentre os drosofilídeos nativos, assim como no restante deste bioma

(Chaves & Tidon, 2008; Da Mata et al., 2008; Dobzhansky & Pavan, 1950; Gottschalk et al., 2007). A partir da primeira geração emergida em laboratório (F1), foram observados, em cada linhagem, diversos indivíduos que apresentavam as mais distintas mutações já observadas em *D. melanogaster* (mutações catalogadas ao longo do tempo e organizadas em Chyb & Gompel, 2013). Dentre as mutações encontradas, destacam-se olhos brancos, asas *curly* e asas vestigiais, além de outros fenótipos relacionados a modificações nas asas.

Chamou a atenção o fato de que, logo na primeira geração no laboratório, foi encontrada uma fêmea de olhos brancos com irmãos de olhos vermelhos em uma das linhagens. A mutação que gera indivíduos de olhos brancos encontra-se no cromossomo X, de modo que são esperados mais machos que fêmeas com este fenótipo (Morgan, 1910). Ainda, parte dos indivíduos que apresentaram alterações nas asas tinham uma asa normal e a outra deformada. Uma vez que a formação das duas asas depende da expressão do mesmo conjunto de genes (Debat & Peronnet, 2013; Santos, 2002), apresentar apenas uma asa deformada também deve estar associado a alterações na expressão do genótipo. Estas duas constatações levaram à compreensão de que estávamos diante de alterações na expressão do fenótipo, e não de mutações gênicas (Duncan et al., 2014; Wakimoto, 1998). É importante ressaltar que a asa é uma estrutura suscetível a mudanças ambientais e, por isso, pode ser usada para avaliar efeitos do ambiente nos organismos. Estudos envolvendo espécies de *Drosophila* já demonstraram que fatores como temperatura (Machida et al., 2022), altitude (Jardeleza et al., 2022) e umidade (Önder & Aksoy, 2022) afetam o tamanho e a forma da asa.

Em todas as linhagens foram encontrados indivíduos com fenótipos alterados e algumas linhagens apresentaram mais destes indivíduos que outras. A partir de suas observações, Darwin (1859) supôs que um mesmo estímulo ambiental leva a modificações diferentes que dependem do indivíduo, que podem ser “extremamente sutis” ou “notavelmente marcadas”. Supondo que em nosso desenho amostral cada linhagem isofêmea carrega um *background* genético distinto (um *proxy* para diferentes indivíduos), nos propusemos a *i.* quantificar a plasticidade fenotípica em termos de morfometria geométrica utilizando apenas asas consideradas normais (modificações extremamente sutis) ao longo do tempo em cada linhagem e *ii.* correlacionar tal variação ao número de fenótipos alterados (modificações notavelmente marcadas) detectados em cada linhagem. Com estes resultados, pretendemos começar a

compreender o surgimento de novas formas nestas linhagens em um ambiente homogêneo e estável, lançando luz sobre os mecanismos adjacentes ao processo de domesticação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COLETA

Em abril de 2022, a equipe do LBE realizou, na Mata da Biologia (20° 45' 36.2" S, 42° 52' 14.6" W) da UFV, uma coleta com o objetivo de amostrar espécimes do grupo *Drosophila saltans*. Foram utilizadas armadilhas contendo isca de banana conforme proposto por Medeiros e Klaczko (1999). As armadilhas foram deixadas por 48 h no campo e, posteriormente, os drosofilídeos foram triados após anestesia com dióxido de carbono. Treze fêmeas foram identificadas como possivelmente pertencentes ao grupo *Drosophila saltans*. A identificação dos indivíduos do grupo é facilitada pelo fato de que estas espécies são mais melanizadas que as outras que ocorrem na área (Markow & O'Grady, 2006). No entanto, a identificação no nível de espécie requer a dissecação e detalhamento do edeago (Magalhães & Björnberg 1957; Magalhães, 1962), que pode ser obtido nos machos da prole de cada fêmea. Cada fêmea coletada foi acondicionada em um tubo contendo meio de cultura banana-cevada (Moreira et al., em preparação) para depositar seus ovos e gerar linhagens isofêmea. A partir da primeira geração obtida em laboratório (F1), dissecamos o edeago dos machos e confirmamos a coleta de 13 fêmeas de *Drosophila sturtevanti*, que deram origem a 12 linhagens isofêmea mantidas no laboratório por 10 gerações (uma das linhagens foi mantida apenas até a F6)

Além das 12 fêmeas de *D. sturtevanti*, nesta coleta foi obtido um total de 20 machos pertencentes ao grupo *Drosophila saltans*. À medida que as armadilhas foram triadas, armazenamos os machos em álcool absoluto. Posteriormente, dissecamos o edeago dos machos coletados em campo e identificamos 19 deles como *D. sturtevanti*. Tais machos foram avaliados neste trabalho como uma amostra da população original (G0).

## 2.2 LINHAGENS

Os tubos contendo as fêmeas coletadas em campo foram revisados de dois em dois dias em busca de larvas. No primeiro dia de detecção de larvas, as fêmeas G0 foram armazenadas em álcool absoluto e mantidas sob refrigeração (-20 °C). Seus descendentes adultos (F1) foram transferidos para tubos novos que também foram revisados em intervalos de dois em dois dias até a visualização de larvas para obtenção de F2. Repetimos este procedimento até obter a décima geração (F10) para garantir que as gerações não fossem sobrepostas. Todos os adultos das 10 primeiras gerações foram preservados em álcool e armazenados a uma temperatura de -20 °C. Cada amostra foi etiquetada, indicando a linhagem e a geração específica a que pertence.

Até a quarta geração, todas as linhagens foram deixadas em temperatura ambiente, isoladas das demais linhagens mantidas no laboratório. Este é um procedimento padrão no nosso laboratório que visa proteger as demais linhagens mantidas em câmara de criação do tipo BOD (incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio) da infestação por eventuais ectoparasitas e fungos vindos do campo. À medida que as linhagens atingiam a quinta geração, elas foram transferidas para a BOD, a 23 °C com fotoperíodo controlado (12 horas claro/12 horas escuro).

## 2.3 DEFORMAÇÕES

Durante o manejo dos adultos de cada linhagem para tubos novos, foram observados espécimes com alterações conspícuas (ou notavelmente marcadas, nas palavras de Darwin) de morfologia, como olhos brancos, torções alares e asas vestigiais (**Fig. 1**). Separamos tais espécimes na tentativa de obter descendentes com o mesmo fenótipo e os mantivemos separados por até quatro gerações para identificar mutações genéticas. Os indivíduos com alterações foram contabilizados por linhagem, fotografados e armazenados ao longo das dez gerações.

## 2.4 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

Neste trabalho, quantificamos o efeito da domesticação no tamanho (usado como *proxy* do tamanho do indivíduo) (Taylor et al., 2015) e na forma da asa direita de machos de G0, F1 e F10 de *Drosophila sturtevantii* por meio de morfometria geométrica.



**Figura 1.** Exemplos de modificações notáveis encontradas em diferentes linhagens de *Drosophila sturtevantii*. Fêmea com par de asas normal (A); fêmea de L20 (F03) com deformação na asa direita (B); fêmea de L09 (F2) com olhos brancos - esta linhagem só foi mantida até F6 no laboratório (C); fêmea L04 (F1) com asa esquerda deformada (D).

Para isso, definimos 12 marcos anatômicos comuns às asas direitas dos machos das 12 linhagens isofêmea de *D. sturtevantii*. Todos os marcos anatômicos escolhidos foram do tipo I, ou seja, pontos onde duas ou mais veias alares se encontram ou onde uma veia encontra a borda da asa (Prestes et al., 2021) (**Fig. 1**). Estas intersecções são consideradas homólogas em drosofilídeos (de Celis, 2003) e as asas que não apresentaram todas as intersecções, por danos durante a vida do indivíduo ou por mutações que eliminaram veias ou impediram a formação de intersecção, foram descartadas do estudo. Neste sentido, avaliamos apenas as asas de indivíduos considerados normais, portanto observamos aqui modificações extremamente sutis nas palavras de Darwin. Utilizamos até 30 machos por linhagem e por geração e os machos qualificados como deformados não fizeram parte da análise. Dos 19 machos coletados no campo, 17 foram avaliados em G0.

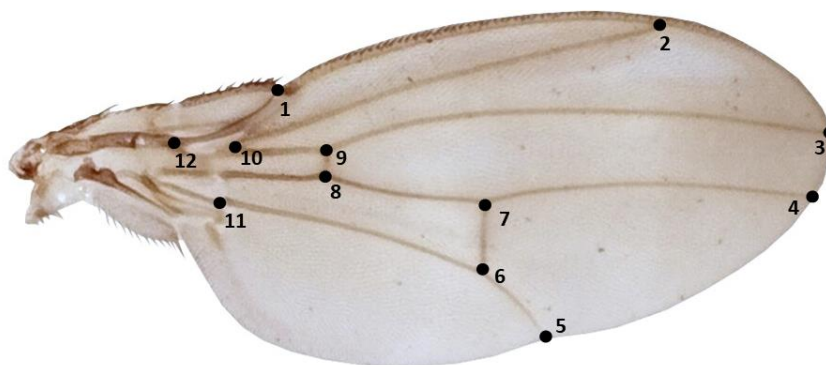
Os machos armazenados em álcool tiveram suas asas retiradas na inserção com o tórax. As asas foram montadas em lâminas histológicas identificadas por linhagem e geração. Em cada lâmina havia uma escala de 1 mm para a estimativa do

tamanho de cada asa. As imagens foram obtidas com auxílio de um microscópio estereoscópico (Nikon SMZ 745T) que tem a câmera Labomed iVu 3100 acoplada.

Utilizamos o *software* TPSUtil v.1.82 (Rohlf, 2015) para organizar as imagens e construir um arquivo Thin-Plate Spline (TPS). No *software* TpsDig v.2.32 (Rohlf, 2015), o arquivo TPS foi usado para a digitalização dos marcos anatômicos e da escala. No TPSDig, os pontos foram convertidos em coordenadas cartesianas que foram avaliadas no programa MorphoJ v.1.07a (Klingenberg, 2011).

#### 2.4.1 Erro na delimitação dos marcos anatômicos

Antes de iniciar as análises, foi feita uma aferição do erro na delimitação dos marcos anatômicos (mostrados na **Figura 2**). Para tanto, cada asa teve seus marcos delimitados duas vezes, em datas distintas, para aferir a qualidade da imagem e a precisão na delimitação (Klingenberg & McIntyre, 1998). Com os dois conjuntos de dados, realizamos uma ANOVA de Procrustes que visa quantificar o erro e definir sua significância estatística.



**Figura 2.** Vista dorsal da asa direita com marcos anatômicos do tipo I. Os marcos anatômicos foram delimitados em função do padrão de veiação da asa (segundo Prestes et al., 2021).

#### 2.4.2 Identificação de *outliers*

Antes de iniciar as análises, conferimos a existência de *outliers*. Os *outliers* podem ser observados caso haja asas com forma muito distinta da média de cada amostra. Isto pode acontecer quando os pontos foram marcados na ordem errada. Neste caso, os erros foram corrigidos antes de prosseguir com as análises. Outra possibilidade são os *outliers* biológicos, que foram retirados da amostra e substituídos

por indivíduos normais, para limitar o estudo morfométrico às modificações extremamente sutis.

### **2.4.3 Correções de Procrustes**

A medida de variação de forma numa amostra requer correções para a remoção de parâmetros indesejáveis, como tamanho e posição, o que deve ser feito com Análise Generalizada de Procrustes, implementada no programa MorphoJ. Esta função reduz diferenças entre as configurações dos marcos anatômicos dos indivíduos por meio de três operações: escalonamento, translação e rotação (Zelditch et al., 2012).

Na operação de escalonamento, é definido o centroide de cada asa (centro de gravidade de uma configuração) (Klingenberg & Zaklan, 2000). Depois disto, o MorphoJ calcula a distância de cada ponto ao centroide e gera o tamanho do centroide, dado pela raiz quadrada do somatório das distâncias ao quadrado de cada marco anatômico ao centroide (Dryden & Mardia, 1998; Fornel e Estrela, 2012).

A partir do tamanho de centroide de cada asa, foi calculado o tamanho de centroide médio e todas as asas foram redimensionadas para ter este mesmo tamanho de centroide, eliminando o efeito do tamanho nas diferenças de forma entre as asas. Posteriormente, as coordenadas foram transladadas e rotacionadas de modo que, em todos os marcos anatômicos, as distâncias entre as amostras fosse a menor possível.

Com as coordenadas devidamente escalonadas, translacionadas e rotacionadas, um novo conjunto de coordenadas foi gerado, as Coordenadas de Procrustes (Zelditch et al., 2012), que retêm informações de forma depois de corrigidos o tamanho e a posição.

### **2.4.4 Alometria**

Nas Coordenadas de Procrustes existem ainda associações de forma e tamanho referentes à alometria, onde espera-se que indivíduos menores apresentem formas diferentes dos indivíduos maiores (Cheverud, 1982; Klingenberg, 1996). A alometria é bastante comum em fases distintas do desenvolvimento, já que jovens apresentam formas diferentes dos adultos de maneira previsível (Pélabon et al.,

2012). Apesar das asas só estarem presentes em adultos de insetos, algum grau de alometria é esperado mesmo entre eles (Stern & Emlen, 1999).

Em função disto, a alometria foi mensurada pela regressão entre tamanho (Tamanho do Centroide – variável independente) e forma (Coordenadas de Procrustes – variável dependente). Qualquer correlação significativa deve ser considerada como sinal significativo de alometria, que deve ser levada em consideração para a comparação de forma entre as asas. Para isso, foram calculados os resíduos da regressão, que devem ser dispostos em uma nova matriz de coordenadas cartesianas, que representam as diferenças de forma livres da dimensão tamanho e da alometria.

#### **2.4.5 Análise de Componentes Principais (PCA)**

A matriz de coordenadas dos resíduos da correlação tamanho x forma foi avaliada em uma análise de componentes principais com o auxílio do programa MorphoJ. Tal análise consiste em decompor a variação de forma, disposta em 24 coordenadas, em componentes principais que são ordenados em ordem decrescente: o primeiro componente (PC1) é o que guarda a maior parte da variação, seguido do segundo (PC2) e assim por diante (Greenacre et al., 2022). Esta análise tem a vantagem de permitir a visualização da variação nos primeiros componentes principais, de modo que é possível avaliar a variação de forma em cada linhagem ou em cada geração. Para aferir as significâncias estatísticas das diferenças de forma entre as linhagens e entre as gerações, foram avaliados os valores no PC1 e PC2 de cada espécime, que foram plotados em uma matriz pelo programa MorphoJ e exportada para o programa R, onde foram feitas as análises estatísticas subsequentes.

### **2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

A aferição de diferenças significativas de tamanho (tamanho do centroide - item 2.4.3) e forma (valores de PC1 e PC2 - item 2.4.5) entre G0 (item 2.1) e as 12 linhagens nas gerações F1 e F10 (item 2.2) foi feita com o auxílio do programa R versão 4.3.1 (RCoreTeam, 2022).

Antes de proceder as análises, avaliamos se a distribuição de cada uma das variáveis (tamanho do centroide, PC1 e PC2 de cada linhagem e geração) atendia ao

pressuposto de normalidade por meio de um teste de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965). Como nem todos os dados apresentaram distribuição normal, testamos a transformação dos dados para logaritmo (Osborne, 2019), raiz quadrada (Hamasha et al., 2022) e Box-Cox (Box & Cox, 1964) sem sucesso, já que alguns conjuntos continuaram violando o pressuposto de normalidade. Diante disto, utilizamos métodos não paramétricos para avaliar diferenças no tamanho e na forma entre as linhagens e as gerações.

Especificamente, as diferenças de tamanho (tamanho de centroide) e forma (PC1 e PC2) foram estimadas por meio do teste de Kruskal-Wallis (Hollander & Wolfe, 1973). Nas comparações par-a-par (entre linhagens e entre gerações) utilizamos o teste *post hoc* Dunn (Dunn, 1964) e a correção de Bonferroni (dunn.test, version 1.3.5; Dinno & Dinno, 2017), usada para evitar erros tipo I em múltiplas comparações (Haynes, 2013).

Os resultados de tamanho foram mostrados em *box plots*, enquanto os resultados de forma foram mostrados em termos de medianas e intervalos interquartis (IQRs), que foram utilizados para avaliar a dispersão dos dados de forma. Os IQRs foram avaliados em termos de seus valores absolutos para detectar aumentos ou reduções na dispersão (aumentos ou reduções na variação da forma) entre G0, F1 e F10 em cada linhagem.

### 3 RESULTADOS

As 12 linhagens isofêmea de *D. sturtevantii* foram acompanhadas por 10 gerações no laboratório, sem sobreposições. O número de machos na primeira geração (F1) variou entre as linhagens (**Tab. 1**). Este número provavelmente varia com a idade de cada fêmea coletada e dos diferentes graus de viabilidade dos ovos no ambiente novo. Já em F10, todas as linhagens estavam bem estabelecidas e, por isso, 30 machos de cada linhagem foram utilizados para as análises.

#### 3.1 DEFORMAÇÕES

Ao longo das gerações, contabilizamos todos os espécimes com deformações (**Tab. 1**) (alterações notavelmente marcadas, nas palavras de Darwin) detectados durante a manutenção das linhagens. O acondicionamento destes espécimes deformados em tubos isolados para a obtenção de descendentes em até quatro

gerações gerou, em todas as tentativas, exceto em uma, progênies de fenótipo normal. Este resultado indicou que a grande maioria, se não todas as deformações, não foram causadas por mutações genéticas, mas por alterações durante o desenvolvimento embrionário ou das larvas, possivelmente em resposta à modificação do ambiente.

**Tabela 1.** Número de machos utilizados nas análises morfométricas da asa direita na geração F1 e número de indivíduos que apresentaram deformações (def.) ao longo de 10 gerações em cada linhagem isofêmea (Lin).

Lin	F1	def.
L01	27	5
L02	28	6
L04	13	9
L06	17	33
L13	22	1
L14	30	6
L15	13	1
L16	30	6
L18	25	9
L20	20	5
L22	29	3
L23	13	2

### 3.2 ERRO NA DELIMITAÇÃO DOS MARCOS ANATÔMICOS

A **Tabela 2** mostra o resultado da ANOVA de Procrustes que indicou que o quadrado médio da variação (MS – *Mean Squares*) do fator “Indivíduo” foi significativamente maior que o erro de medição (Erro 1) (Benítez et al., 2022), tanto para tamanho quanto para forma. Desse modo, os eventuais erros na delimitação dos marcos anatômicos foram estatisticamente insignificantes e as diferenças entre os indivíduos puderam ser consideradas nas análises subsequentes.

### 3.3 VARIAÇÕES NO TAMANHO

A partir dos tamanhos do centroide, comparamos os tamanhos da asa direita dos machos coletados no campo (G0) com os obtidos nas 12 linhagens em estudo nas gerações F1 e F10 (**Fig. 3**).

Em F1, nenhuma das linhagens apresentou tamanhos significativamente diferentes de G0 (**Fig. 3**). Chama a atenção em F1 o fato de que a L15 apresentou dispersão nas medidas de tamanho (IQR) muito maior que G0. Já em F10, a maioria

das linhagens apresentou asas significativamente menores que G0 (**Fig. 3**) e, diferentemente de F1, o IQR da maioria das linhagens foi maior que o de G0.

**Tabela 2.** ANOVA de Procrustes do erro de delimitação dos marcos anatômicos para inferir tamanho de centroide e forma da asa direita de machos de *Drosophila sturtevantii*.

Parâmetro	Efeito	SS	MS	df	F	p	Pillai tr.	p
Tamanho	Indivíduo	32,17098	<b>0,049955</b>	644	72,5	< 0,0001		
	Erro 1	0,443021	<b>0,000689</b>	643				
Forma	Indivíduo	0,954801	<b>7,41E-05</b>	12880	9,98	< 0,0001	15,91	< 0,0001
	Erro 1	0,095541	<b>7,43E-06</b>	12860				

SS=Sum of Squares; MS=Mean Squares; df=Degrees of freedom; F = Goodall's F.

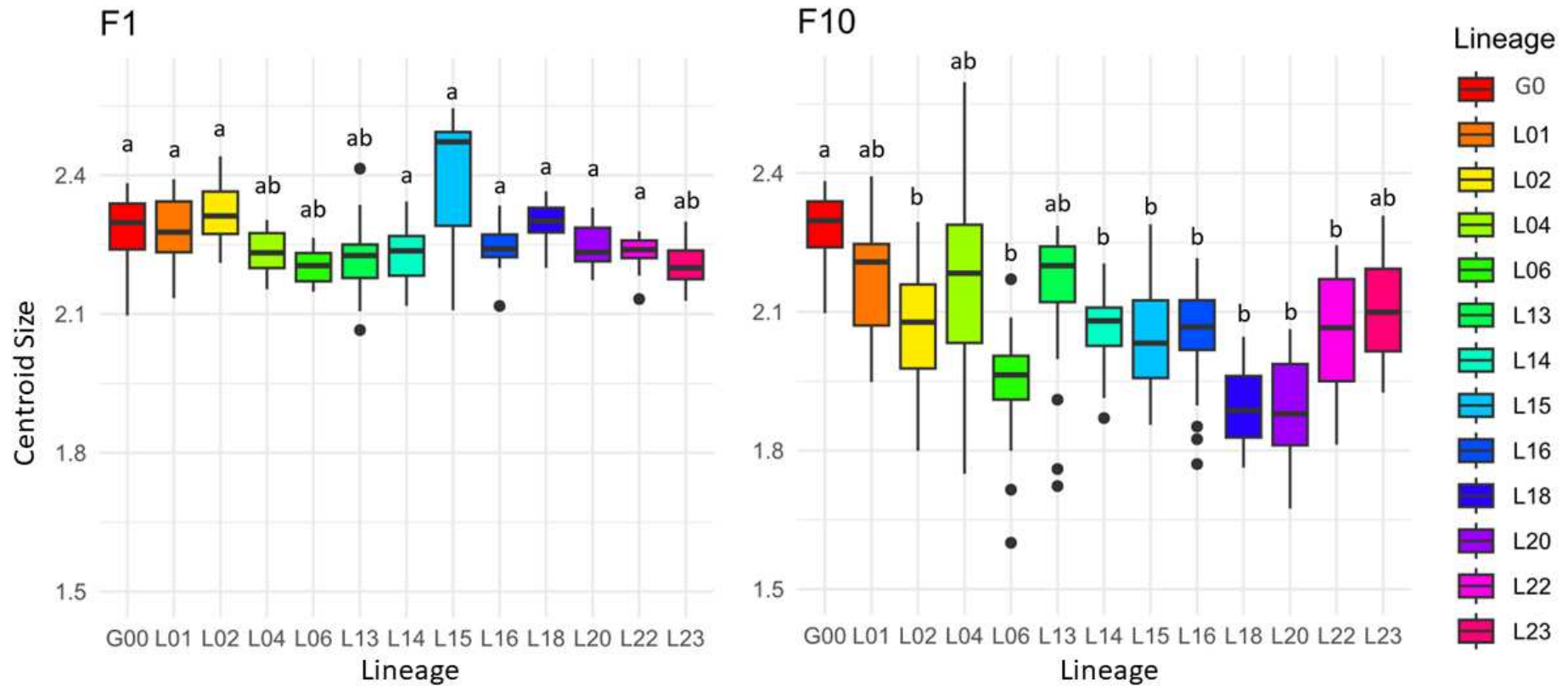
De maneira geral, houve redução do tamanho das asas entre F1 e F10 dentro de cada linhagem.

### 3.4 ALOMETRIA

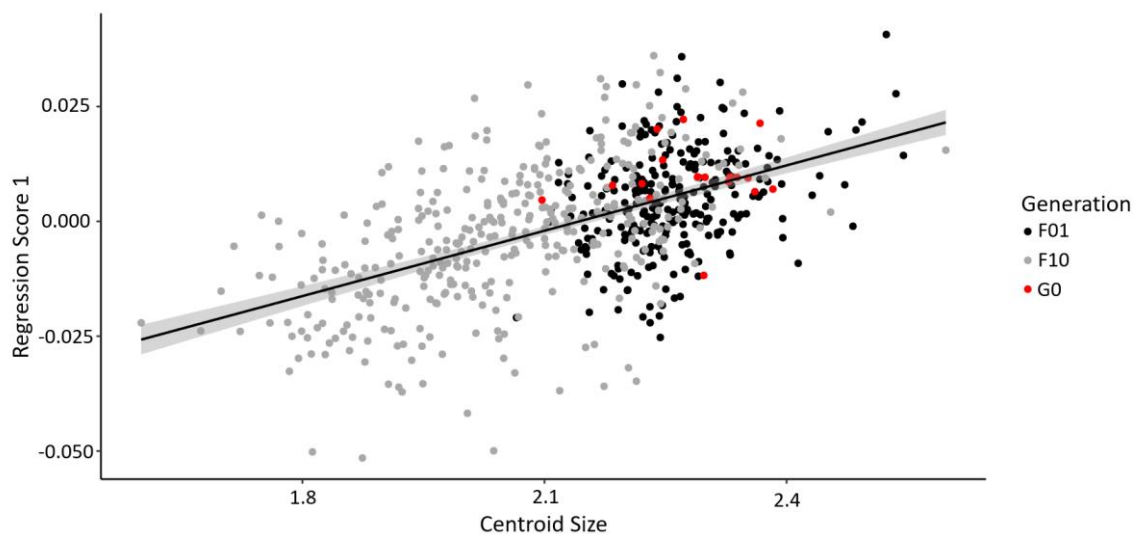
Encontramos correlação positiva e significativa (7,2302 %,  $p < 0,0001$ ) entre o tamanho e a forma dos indivíduos de *D. sturtevantii*, indicando alometria (**Fig. 4**). A partir desta regressão, foram calculados os resíduos, que foram plotados em uma segunda matriz de coordenadas utilizada para as análises de forma, conforme descrito no item 2.4.4 dos métodos.

### 3.5 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

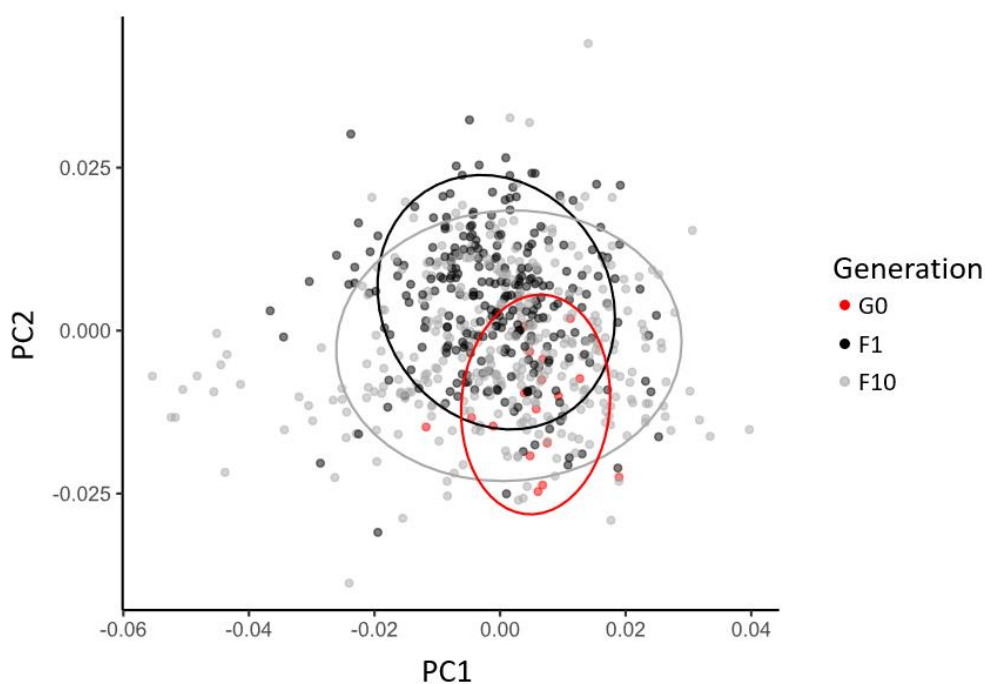
As coordenadas residuais da regressão entre forma e tamanho foram submetidas a uma PCA (item 2.4.5). O primeiro componente (PC1) corresponde a 24,26 %, enquanto o segundo componente (PC2) a 17,34 % da variação de forma encontrada nas asas dos machos em G0, F1 e F10. As elipses mostradas na **Figura 5**, que abrangem 90 % da variação em cada geração, revelam aumento da variação de forma de G0 para F1 e de F1 para F10, especialmente em PC1.



**Figura 3.** Box plots do tamanho do centroide da asa direita dos machos de 12 linhagens isôfêmea de *Drosophila sturtevantii* na primeira (F1) e na décima (F10) geração de manutenção em laboratório. Em cada linhagem, a linha mais espessa representa a mediana e o retângulo abrange os 50% dos tamanhos das asas observados em cada linhagem (intervalo interquartis – IQR). G0, representado nos dois gráficos, corresponde a uma amostra de machos coletada em campo. As letras sobre os boxes indicam as diferenças significativas entre as medianas das linhagens, determinadas pelo teste de Dunn corrigido com Bonferroni. Todas as linhagens, nas duas gerações, incluindo os representantes de G0, foram comparadas par a par e valores de  $p \leq 0,025$  foram considerados significativos.



**Figura 4.** Correlação entre tamanho (*Centroid Size*) e forma (*Regression Score 1*) da asa direita dos machos de 12 linhagens isofêmea de *Drosophila sturtevantii* na primeira (F1 – pontos em preto) e na décima (F10 – pontos em cinza) geração de manutenção em laboratório. Os pontos em vermelho (G0) correspondem à amostra de 17 machos coletados em campo.



**Figura 5.** Primeiro (PC1) e segundo (PC2) componentes da Análise de Componentes Principais (PCA) dos resíduos da correlação tamanho x forma (**Fig. 4**) da asa direita dos machos de 12 linhagens isofêmea de *Drosophila sturtevantii* na primeira (F1 – pontos em preto) e na décima (F10 – pontos em cinza) geração de manutenção em laboratório. Os pontos em vermelho (G0) correspondem à amostra de machos coletada em campo. Todas as elipses têm intervalo de confiança de 90 %.

### 3.6 VARIAÇÕES NA FORMA

A partir da análise dos componentes principais (PCA – **Figura 5**), obtivemos os valores de PC1 e PC2 para cada asa. A **Figura 6** mostra as medianas e os intervalos interquartis (representando 50 % da variação) do PC1 (eixo X) e do PC2 (eixo Y) em G0 e em cada linhagem nas gerações F1 e F10. Em F1, G0 e as 12 linhagens apresentaram formas mais parecidas entre si no PC1 que em F10, sugerindo aumento da diversificação neste eixo com o tempo. Já no PC2, a forma da asa de G0 e das linhagens foram mais diferentes em F1 que em F10, evidenciando o surgimento de formas novas em F1, que devem ter sido eliminadas entre F1 e F10.

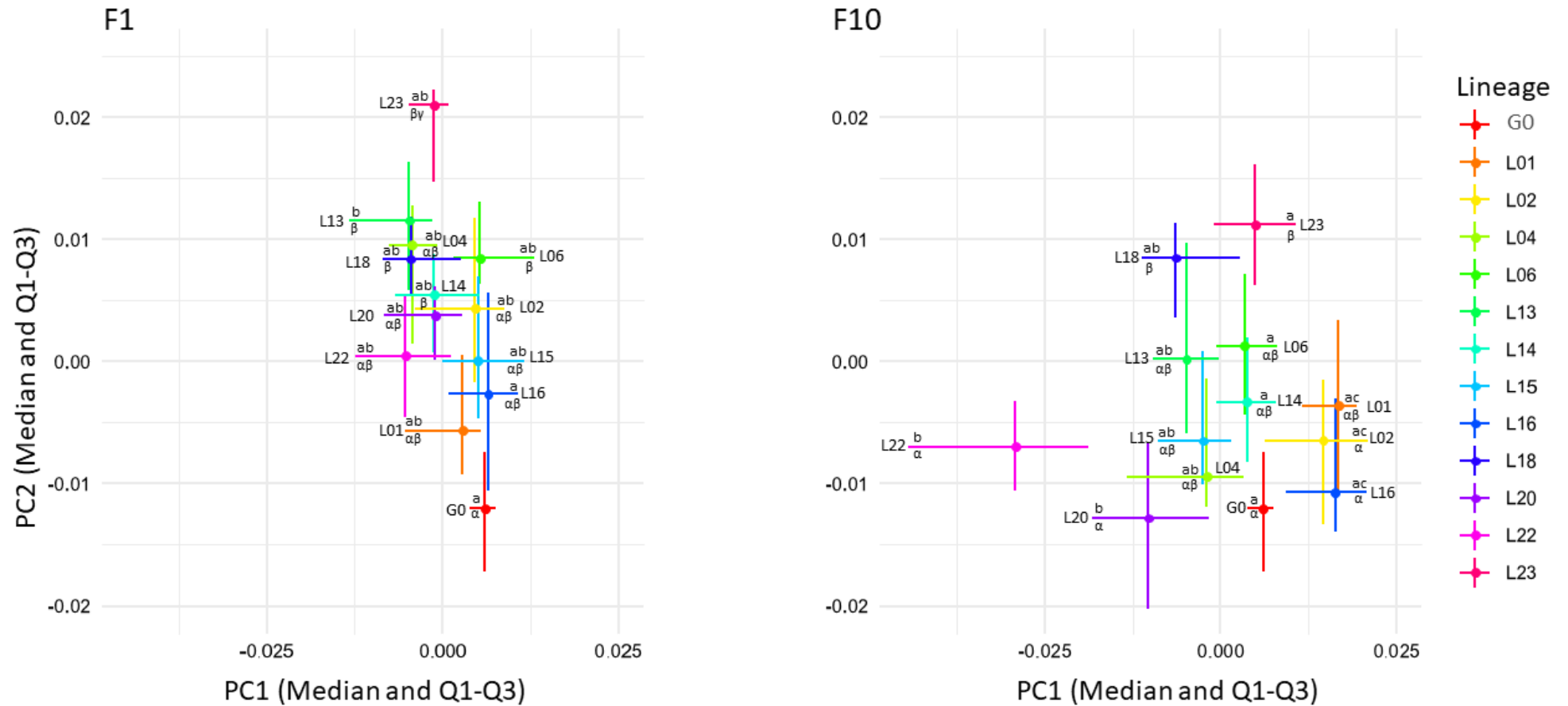
A **Figura 7** representa a variação no IQR da forma em PC1 e PC2 em cada linhagem. Ela revela que no PC1, assim como a variação entre linhagens, o IQR de cada linhagem apresentou tendência de aumento ao longo das gerações. No PC2, por outro lado, o IQR aumentou em algumas linhagens e reduziu em outras de G0 para F1, mas, em quase todas elas, retornou a níveis mais próximos de G0 em F10.

## 4 DISCUSSÃO

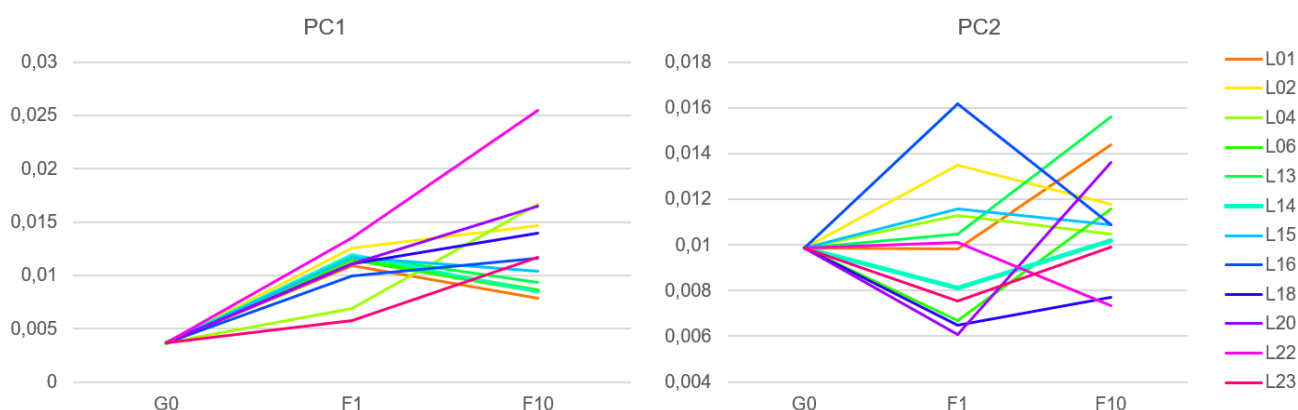
Nos dois anos de desenvolvimento deste trabalho, testemunhamos a evolução fenotípica *in vitro* ao longo de apenas 10 gerações no laboratório. Nossos resultados mostraram que a mudança de ambiente, atrelada ao isolamento de genótipos permitiu o surgimento de novidades, vistas no tamanho e na forma das asas dos machos.

Em “A origem das espécies”, Darwin (1859) mencionou que a domesticação poderia gerar alterações notavelmente marcadas ou extremamente sutis, ressaltando que o aparecimento de tais alterações são características dos indivíduos (1868). Neste estudo, detectamos ambos os tipos de alterações após o início do processo de domesticação, que inclui a transição para um ambiente estável, o confinamento e, no caso de linhagens isofêmea, o isolamento.

Ao iniciarmos os trabalhos de manutenção das linhagens de *D. sturtevanti* no laboratório, nos deparamos com alterações extravagantes que nos levaram a pensar primeiro em problemas no trato com as moscas, depois em mutações possivelmente ocultas nos heterozigotos e finalmente em alterações desencadeadas pelo processo de domesticação.



**Figura 6.** Medianas e intervalos interquartis do resíduo da correlação forma x tamanho (Fig. 4) da asa direita dos machos de G0 e de 12 linhagens isofêmea de *Drosophila sturtevantii* na primeira (F1) e na décima (F10) geração de manutenção em laboratório. O primeiro componente principal (PC1) contém 24,26 % da variação de forma e o segundo componente principal (PC2), 17,34 %. Em cada linhagem, o círculo representa a mediana e as linhas representam os IQRs nos dois PCs. As letras romanas indicam as diferenças significativas no PC1 entre as linhagens e as letras gregas diferenças no PC2, ambas determinadas pelo teste de Dunn corrigido com Bonferroni. O PC1 de todas as linhagens, nas duas gerações, incluindo os representantes de G0, foram comparadas par a par e valores de  $p \leq 0,025$  foram considerados significativos. O mesmo procedimento foi utilizado no PC2.



**Figura 7.** Intervalos interquartis (IQRs) dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) da forma da asa direita dos machos das 12 linhagens de *D. sturtevantii* em estudo nas gerações F1 e F10 em comparação com G0.

Desde os trabalhos de Darwin, muito se estudou a respeito de como os fenótipos são produzidos nos organismos (Vogt, 2021). Hoje sabemos que as alterações notavelmente marcadas podem ser fruto da ação de epimutações que, diferentemente de mutações gênicas, são modificações hereditárias associadas a, por exemplo, perdas ou ganhos de metilação do DNA ou outras modificações herdáveis na cromatina (Oey & Whitelaw, 2014) nas histonas ou decorrer de microRNAs (Glazko et al., 2022) ou movimentos de elementos transponíveis (González & Petrov, 2009).

Diante das alterações de cor dos olhos e de morfologia das asas, a primeira ideia foi contabilizar quantas deformações apareceriam em 10 gerações de manutenção no laboratório. Como a capacidade de gerar novas formas é uma característica do indivíduo e não da espécie ou da população (Sultan, 2021), esperávamos que em algumas linhagens isofêmea fossem encontrados mais indivíduos notavelmente alterados que em outras, o que acabou se confirmando. A **Tabela 1** mostra que na linhagem 6 foram encontrados 33 indivíduos alterados, enquanto na linhagem 13 foi encontrado apenas um. No entanto, não encontramos correlação entre o número de deformações (alterações notavelmente marcadas) com a variação morfométrica (alterações extremamente sutis) em cada linhagem, o que pode ser explicado pelo fato de que nossas observações ficaram limitadas aos fenótipos mais conspícuos. É possível, portanto, que além das modificações que chamaram mais a atenção, houvesse mais modificações que passaram despercebidas na inspeção durante a rotina de manutenção das linhagens. De fato, no processo de obtenção das imagens e marcação dos pontos homólogos, fomos

obrigadas a eliminar alguns indivíduos da amostra porque não apresentavam todas as nervuras alares esperadas para a espécie.

Nossos resultados de morfometria geométrica das asas nos mostraram que, em termos de tamanho, não houve modificações dos machos coletados no campo (G0) para os obtidos em F1. No entanto, em F10, a maioria das linhagens apresentou mediana das asas menor e variação de tamanho maior que em G0 (altura dos boxes na **Figura 3**). Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que o confinamento em tubos de ensaio contendo meio de cultura pode levar a uma alta densidade larval, gerando maior competição por alimento. Neste sentido, larvas que se alimentam menos tendem a se desenvolver em adultos menores (Stern & Emlen, 1999; Williams, 1980). É preciso mencionar que o número de indivíduos produzidos em F1 foi muito menor que o produzido em F10 em todas as linhagens, já que F10 foi produzida a partir de muitas fêmeas, enquanto F1 foi produzida por uma única fêmea coletada no campo.

As análises de forma revelaram um resultado mais complexo. Em primeiro lugar, não foi observado um único padrão na maioria das linhagens como aconteceu com o tamanho. Para avaliar a forma, fizemos uma análise de componentes principais para nos concentrarmos nos dois componentes que retêm mais variação em todos os indivíduos em estudo (machos de todas as 12 linhagens nas gerações F1 e F10 e aqueles coletados no campo, aqui denominados G0).

O primeiro componente principal (PC1), que retém 24,26 % da variação de forma encontrada, revelou que, ao contrário do que se poderia esperar apenas com variabilidade genética, a variação das asas dos machos aumentou de G0 para F1 e de F1 para F10 (**Fig. 5**). Partindo do pressuposto de que há muito mais variação genética em 17 indivíduos coletados no campo do que em qualquer quantidade de indivíduos de cada linhagem no laboratório, o que quer que PC1 represente deve estar sob forte seleção no campo, mas tal seleção foi relaxada no laboratório. De fato, dentro de qualquer uma das 12 linhagens, a variação do PC1, representada pelo IQR (comprimento das barras horizontais na **Figura 6**), é maior em F1 ou F10 que em G0, o que pode ser mais bem visualizado na **Figura 7**.

A forma das asas é essencial para garantir a capacidade e eficiência de voo em insetos, mas, como outras estruturas responsáveis pelo movimento, está sujeita a um conjunto complexo de parâmetros, incluindo seleção natural e sexual, que definem e restringem as estruturas responsáveis pelo movimento em animais (Dickinson et al.

2000; Ray et al. 2016). Menezes et al. (2013) mostraram que em *D. melanogaster*, o bater das asas dos machos é componente fundamental do comportamento de corte, já que interfere na maneira (visual e sonora) como os indivíduos são percebidos por seus parceiros sexuais, de modo que a seleção sexual é particularmente importante para o formato das asas.

Nossos resultados sugerem que a manutenção das linhagens no laboratório, além de aumentar a variação no PC1 dentro de cada linhagem (**Fig. 7**), também contribuiu para a diferenciação entre linhagens (**Fig. 6**), evidenciando a ação da seleção natural em cada uma delas. É interessante ressaltar que todas as linhagens foram mantidas sob as mesmas condições. Considerando a premissa de Darwin de que a domesticação produz alterações devido ao estresse do confinamento e da mudança de ambiente, é possível que tais mudanças estejam associadas a modificações na regulação gênica durante o desenvolvimento embrionário (Mirth et al., 2021) ou à ação de transposons (Bologa et al., 2021; Cancian et al, 2022), além de outros fatores como a ação de RNAs de interferência (Ray et al. 2016), que podem desencadear alterações diferentes em cada linhagem. Tais alterações podem ser tão drásticas que não permitem a manutenção da linhagem no laboratório. De fato, nem todas as fêmeas de drosófilas geram linhagens longevas. Em nossa coleta, a linhagem L09 só foi mantida até F6, quando apenas duas fêmeas vingaram, impedindo a geração de F7. As diferenças se devem a particularidades de cada indivíduo, nas palavras de Darwin (1868) ou ao genótipo de cada linhagem. Considerando ainda as condições mais permissivas do laboratório, além do grande número de indivíduos que são mantidos nos tubos, a seleção natural deve ter sido a responsável pela manutenção e ampliação das diferenças significativas no PC1 entre as linhagens durante o processo de adaptação às condições de confinamento.

No PC2, que retém 17,34 % da variação encontrada, o panorama é um tanto distinto: as diferenças em F1 entre as linhagens e G0 foi muito maior que em F10. Isto sugere que, se na primeira geração em laboratório o desenvolvimento embrionário foi perturbado o suficiente para gerar novas formas (F1, **Figura 6**), em F10 já se vê ação da seleção natural no sentido de reduzir a variação de formas. Isto indica que talvez algumas das inovações produzidas e expressas em F1 não tenham sido bem-sucedidas por apresentarem valor adaptativo menor que a forma encontrada no ambiente natural. A linhagem 23, por exemplo, apresentou uma forma muito distinta no PC2 em F1, mas parece ter retornado a uma forma mais semelhante de G0 em

F10. Com isso, podemos concluir que o que quer que esteja representado em PC2 guarda restrições semelhantes no campo e no laboratório. Na **Figura 7**, o PC2 mostra que algumas linhagens mantiveram, outras apresentaram mais ou menos variação em F1 que em G0, o que se repetiu de F1 para F10. Deste modo, a variação de PC2 observada nas linhagens ficou em torno da variação em G0 e não apresentou tendência de aumento, como no PC1.

As novas formas observadas foram selecionadas positivamente em algumas linhagens no PC1, onde as diferenças se tornaram mais intensas de F1 para F10. Já no PC2, as novidades parecem ter sido filtradas, resultando em menor diferenciação fenotípica entre linhagens em F10 que em F1. Estes resultados reforçam que a mudança de ambiente causa alterações fenotípicas nos organismos e que algumas destas alterações podem ser selecionadas positivamente num processo rápido de adaptação ao novo ambiente.

Como o processo de domesticação está frequentemente atrelado a uma seleção intencional, ou seja, o agente da seleção escolhe uma determinada característica e trata de intensificá-la, podemos deixar como contribuição a sugestão de uma nova metodologia. Em nosso trabalho, simplesmente mantivemos as linhagens separadas e deixamos as modificações acontecerem em função da mudança de ambiente e a seleção natural atuar nas diferentes linhagens, gerando formas significativamente diferentes das encontradas em campo num intervalo de apenas 10 gerações. Diante destes resultados, nos perguntamos o quão útil seria este tipo de estratégia em organismos de interesse humano.

Partindo do princípio que o processo de domesticação implica em manter os organismos em ambientes controlados, nas condições possíveis para um produtor, o primeiro passo para a domesticação é trazer indivíduos para o ambiente controlado, o que replica o processo de domesticação feito até então pela humanidade. Nossa sugestão de modificação no protocolo está no que fazer com os indivíduos produzidos na primeira geração em cativeiro: isolar reprodutivamente os adultos gerados por cada indivíduo da população (sementes de uma mesma planta mãe, por exemplo) por algumas gerações no ambiente controlado, sem seleção intencional de qualquer característica. Este procedimento evitaria os efeitos colaterais da seleção intencional, que além de restringir o desenvolvimento de novos caracteres, pode trazer junto, por proximidade no cromossomo, características indesejáveis ou comprometedoras à sobrevivência dos espécimes (Gregory, 2009; Moyers et al., 2018; Teletchea, 2019).

Dessa maneira, o objetivo da nova metodologia aqui proposta é visualizar fenótipos que surgem pelo stress da mudança de ambiente e que são mantidos, amplificados e moldados pela seleção natural nas novas condições. A vantagem desta estratégia é deixar a seleção natural agir sobre as novidades juntamente com o genoma e em conformidade com o novo ambiente, mitigando potenciais efeitos colaterais da seleção intencional.

## REFERÊNCIAS

- Benítez, H. A., Püschel, T. A., & Suazo, M. J. (2022). *Drosophila* wing integration and modularity: A multi-level approach to understand the history of morphological structures. *Biology*, 11(4), 567. <https://doi.org/10.3390/biology11040567>
- Boice, R. (1973). Domestication. *Psychological Bulletin*, 80(3), 215. <https://doi.org/10.1037/h0034893>
- Bologa A.M., Stoica, I., Constantin, N.D., & Ecovoiu, A. A. (2023). The Landscape of the DNA Transposons in the Genome of the Horezu\_LaPeri Strain of *Drosophila melanogaster*. *Insects*, 14(6), 494. <https://doi.org/10.3390/insects14060494>.
- Box, G. E., & Cox, D. R. (1964). An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology*, 26(2), 211-243. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1964.tb00553.x>
- Cancian, M., da Fontoura Gomes, T. M. F., & Loreto, E. L. S. (2022). Somatic Mobilization: High Somatic Insertion Rate of mariner Transposable Element in *Drosophila simulans*. *Insects*, 13(5), 454. <https://doi.org/10.3390/insects13050454>
- Chaves, N. B., & Tidon, R. (2008). Biogeographical aspects of drosophilids (Diptera, Drosophilidae) of the Brazilian savanna. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52, 340-348. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262008000300005>
- Cheverud, J. M. (1982). Relationships among ontogenetic, static, and evolutionary allometry. *American Journal of Physical Anthropology*, 59(2), 139-149. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330590204>
- Christie, M. R., Marine, M. L., Fox, S. E., French, R. A., & Blouin, M. S. (2016). A single generation of domestication heritably alters the expression of hundreds of genes. *Nature communications*, 7(1), 10676. <https://doi.org/10.1038/ncomms10676>
- Chyb, S., & Gompel, N. (2013). *Atlas of Drosophila Morphology: Wild-type and classical mutants*. Academic Press.
- Costa, J. T. (2021). *Phenotypic plasticity as an intrinsic property of organisms*. In D. W. Pfennig, ed., *Phenotypic Plasticity and Evolution: Causes, Consequences*,

*Controversies.* CRC Press, Boca Raton, FL.  
<https://doi.org/10.1201/9780429343001>

- Czesak, M. E., Fox, C. W., & Wolf, J. B. (2006). Experimental evolution of phenotypic plasticity: how predictive are cross-environment genetic correlations?. *The American Naturalist*, *168*(3), 323-335. <https://doi.org/10.1086/506919>
- Da Mata, R.A., McGeoch, M., & Tidon, R. (2008). Drosophilid assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the brazilian savanna. *Biodiversity and Conservation*, *17*, 2899-2916. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9403-7>
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray.
- Darwin, C. (1868). *The Variation of Animals and Plants Under Domestication* (Vol. 2). John Murray.
- David, J. R., Gibert, P., Legout, H., Pétavy, G., Capy, P., & Moreteau, B. (2005). Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity*, *94*(1), 3-12. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800562>
- D'Ávila, M. F., Garcia, R. N., Loreto, E. L., & Valente, V. L. D. S. (2008). Analysis of phenotypes altered by temperature stress and hipermutability in *Drosophila willistoni*. *Iheringia. Série Zoologia*, *98*, 345-354. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212008000300009>
- Debat, V., & Peronnet, F. (2013). Asymmetric flies: the control of developmental noise in *Drosophila*. *Fly*, *7*(2), 70-77. <https://doi.org/10.4161/fly.23558>
- De Campos Bicudo, H. E. M. (1973). Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. I. The *saltans* subgroup. *Genetica*, *44*(3), 313-329. <https://doi.org/10.1007/BF00161311>
- De Celis, J. F. (2003). Pattern formation in the *Drosophila* wing: the development of the veins. *Bioessays*, *25*(5), 443-451. <https://doi.org/10.1002/bies.10258>
- Dickinson, M. H., Farley, C. T., Full, R. J., Koehl, M. A. R., Kram, R., & Lehman, S. (2000). How animals move: an integrative view. *Science*, *288*(5463), 100-106. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.100>
- Dinno, A., & Dinno, M. A. (2017). Package 'dunn.test'. *CRAN Repos*, *10*, 1-7.
- Dobzhansky, T., & Pavan, C. (1950). Local and seasonal variations in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. *Journal of Animal Ecology*, *19*, 1-14. <https://doi.org/10.2307/1566>

- Dobzhansky, T., & Streisinger, G. (1944). Experiments on Sexual Isolation in *Drosophila*: II. Geographic Strains of *Drosophila prosaltans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 30(11), 340–345. <https://doi.org/10.1073/pnas.30.11.340>
- Dryden, I. L., & Mardia, K. V. (2016). *Statistical shape analysis: with applications in R* (Vol. 995). John Wiley & Sons.
- Duncan, E. J., Gluckman, P. D., & Dearden, P. K. (2014). Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype?. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 322(4), 208-220. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22571>
- Dunn, O. J. (1964). Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, 6(3), 241-252. <https://doi.org/10.1080/00401706.1964.10490181>
- Fornel, R., & Cordeiro-Estrela, P. (2012). Morfometria Geométrica e a quantificação da forma dos organismos. In J. R. Marinho, L. U. Hepp, & R. Fornel. (Org.). *Temas em Biologia: Edição comemorativa aos 20 anos do Curso de Ciências Biológicas e aos 5 anos do PPG-Ecologia da URI Campus de Erechim* (pp. 101–120).
- Garland Jr, T., & Kelly, S. A. (2006). Phenotypic plasticity and experimental evolution. *Journal of Experimental Biology*, 209(12), 2344–2361. <https://doi.org/10.1242/jeb.02244>
- Glazko, V. I., Kosovski, G. Y., & Glazko, T. T. (2022). The sources of genome variability as domestication drivers. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 57(5), 832-851. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2022.5.832eng>
- Gregory, T.R. (2009). Artificial Selection and Domestication: Modern Lessons from Darwin's Enduring Analogy. *Evolution: Education and Outreach*, 2, 5–27. <https://doi.org/10.1007/s12052-008-0114-z>
- González, J., & Petrov, D. A. (2009). The adaptive role of transposable elements in the *Drosophila* genome. *Gene*, 448(2), 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.06.008>
- Gottschalk, M. S., De Toni, D. C., Valente, V. L., & Hofmann, P. R. (2007). Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. *Neotropical entomology*, 36, 848-862. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2007000600005>
- Greenacre, M., Groenen, P. J., Hastie, T., d'Enza, A. I., Markos, A., & Tuzhilina, E. (2022). Principal component analysis. *Nature Reviews Methods Primers*, 2(1), 100. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00184-w>
- Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuenta, A. M., & Roberts, D. M. (2015). Genetics on the fly: a primer on the *Drosophila* model system. *Genetics*, 201(3), 815-842. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.183392>

- Hamasha, M. M., Ali, H., Hamasha, S. & Ahmed, A. (2022). Ultra-fine transformation of data for normality. *Heliyon* 8(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09370>
- Harshman, L. G., & Hoffmann, A. A. (2000). Laboratory selection experiments using *Drosophila*: what do they really tell us?. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(1): 32-36. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01756-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01756-5)
- Haynes, W. (2013). Bonferroni Correction. In W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K. H. Cho, & H. Yokota (Eds.) *Encyclopedia of Systems Biology*. Springer, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7>
- Hollander, M., & Wolfe, D. A. (1973). *Nonparametric Statistical Methods*. 115–120. John Wiley & Sons.
- Jardeleza, M. K. G., Koch, J. B., Pearse, I. S., Ghalambor, C. K., & Hufbauer, R. A. (2022). The roles of phenotypic plasticity and adaptation in morphology and performance of an invasive species in a novel environment. *Ecological Entomology*, 47(1), 25-37. <https://doi.org/10.1111/een.13087>
- Klingenberg, C. P. (1996). Multivariate allometry. In *Advances in morphometrics* (pp. 23-49). Boston, MA: Springer US.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, 11(2), 353-357. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>
- Klingenberg, C. P., & McIntyre, G. S. (1998). Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution*, 52(5), 1363-1375. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb02018.x>
- Klingenberg, C. P., & Zaklan, S. D. (2000). Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution*, 54(4), 1273-1285. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00560.x>
- Kohler, R. E. (1993). *Drosophila*: A life in the laboratory. *Journal of the History of Biology*, 26(2), 281–310. <https://doi.org/10.1007/bf01061971>
- Loreto, É. S., Zaha, A., Nichols, C., Pollock, J. A., & Valente, V. L. S. (1998). Characterization of a hypermutable strain of *Drosophila simulans*. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 54, 1283-1290. <https://doi.org/10.1007/s000180050254>
- Machida, W. S., Tidon, R., & Klaczko, J. (2022). Wing plastic response to temperature variation in two distantly related Neotropical *Drosophila* species (Diptera, Drosophilidae). *Canadian Journal of Zoology*, 100(2), 82-89. <https://doi.org/10.1139/cjz-2021-0099>

- Mackay, T. F., & Huang, W. (2017). Charting the genotype–phenotype map: lessons from the *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 7(1), e289. <https://doi:10.1002/wdev.289>
- Magalhães, L.E. (1962). Notes on the taxonomy, morphology, and distribution of the saltans group of *Drosophila*, with descriptions of four new species. *University of Texas Publication 6205*, 135–154.
- Markow, T., & O’Grady, P. (2006). *Drosophila: A Guide to Species Identification and Use*. Elsevier.
- Matos, R., Rocha, M. T. P., & Rego, A. (2000). Adaptation to the laboratory environment in *Drosophila subobscura*. *Journal of Evolutionary Biology*, 13 (1), 9–19. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00116.x>
- Medeiros, H. F., & Klaczko, L. B. (1999). A weakly biased *Drosophila* trap. *Drosophila Information Service*, 82, 100-102.
- Menezes, B. F., Vigoder, F. M., Peixoto, A. A., Varaldi, J., & Bitner-Mathé, B. C. (2013). The influence of male wing shape on mating success in *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour*, 85(6), 1217-1223. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2013.03.008>
- Mirth, C. K., Saunders T. E., & Amourda, C. (2021). Growing Up in a Changing World: Environmental Regulation of Development in Insects. *Annual Review of Entomology*, 66, 81-99. <https://doi/10.1146/annurev-ento-041620-083838>
- Moreira, M. M., Dias, L. P. B., Sarmiento, C. G., Sena, L. C. P., Almeida, J. P. P., & Yotoko, K. (2024). Flipping the script: *Wolbachia* favoring males in a Neotropical *Drosophila*. To be submitted at *Journal of Evolutionary Biology*.
- Morgan, T. H. (1910). Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science*, 32(812), 120–122. <https://doi:10.1126/science.32.812.120>
- Moyers, B. T., Morrell, P. L., & McKay, J. K. (2018). Genetic costs of domestication and improvement. *Journal of Heredity*, 109(2), 103-116. <https://doi:10.1093/jhered/esx069>
- Oey, H., & Whitelaw, E. (2014). On the meaning of the word ‘epimutation’. *Trends in Genetics*, 30(12), 519–520. <https://doi:10.1016/j.tig.2014.08.005>
- Önder, B. Ş., & Aksoy, C. F. (2022). Seasonal variation in wing size and shape of *Drosophila melanogaster* reveals rapid adaptation to environmental changes. *Scientific Reports*, 12(1), 14622. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18891-5>
- Osborne, J. (2019). Notes on the use of data transformations. *Practical Assessment, Research, and Evaluation*, 8(1). <https://doi.org/10.7275/4vng-5608>

- Pélabon, C., Firmat, C., Bolstad, G.H., Voje, K.L., Houle, D., Cassara, J., Rouzic, A.L., Hansen, T.F. (2014). Evolution of morphological allometry. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1320(1), 58-75. <https://doi.org/10.1111/nyas.12470>
- Prestes, J. O., Costa, M., Machado, L. P. B., & Mateus, R. P. (2021). Asymmetry of the wing in *Drosophila mojavensis sonorensis* Castrezana in Pfeiler et al., 2009 (Diptera, Drosophilidae): main versus seasonal host. *Brazilian Journal of Biology*, 83, e246677. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.246677>
- Ray, R. P., Nakata, T., Henningsson, P., & Bompfrey, R. J. (2016). Enhanced flight performance by genetic manipulation of wing shape in *Drosophila*. *Nature communications*, 7(1), 10851. <https://doi.org/10.1038/ncomms10851>
- RCoreTeam. (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.Rproject.org/>
- Roberts, D. B. (2006). *Drosophila melanogaster*: the model organism. *Entomologia experimentalis et applicata*, 121(2), 93-103. <https://doi.org/10.1111/j.1570-8703.2006.00474.x>
- Rohlf, F. J. (2015). The tps series of software. *Hystrix*, 26(1), 9-12. <https://doi.org/10.4404/hystrix-26.1-11264>
- Santos, M. (2002). Genetics of wing size asymmetry in *Drosophila buzzatii*. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(5), 720-734. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00450.x>
- Santos, M., Fragata, I., Santos, J., Simoes, P., Marques, A., Lima, M., & Matos, M. (2010). Playing Darwin. Part B. 20 years of domestication in *Drosophila subobscura*. *Theory in Biosciences*, 129, 97-102. <https://doi.org/10.1007/s12064-010-0086-8>
- Schlötterer, C. (2023). How predictable is adaptation from standing genetic variation? Experimental evolution in *Drosophila* highlights the central role of redundancy and linkage disequilibrium. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 378(1877), 20220046. <https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0046>
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611. <https://doi.org/10.2307/2333709>
- Simões, P., Santos, J., & Matos, M. (2009). *Experimental evolutionary domestication*. In *Experimental evolution: concepts, methods, and applications of selection experiments* (pp. 89-110). California University Press, Berkeley, CA. <https://doi.org/10.1525/california/9780520247666.003.0005>
- Stern, D. L., & Emlen, D. J. (1999). The developmental basis for allometry in insects. *Development*, 126(6), 1091-1101. <https://doi.org/10.1242/dev.126.6.1091>

- Stobdan, T., Wen, N. J., Lu-Bo, Y., Zhou, D., & Haddad, G. G. (2024). The Pupa Stage Is the Most Sensitive to Hypoxia in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 710. <https://doi.org/10.3390/ijms25020710>
- Stocker, H., & Gallant, P. (2008). Getting started: an overview on raising and handling *Drosophila*. *Drosophila: methods and protocols*, 27-44. Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1_2)
- Sultan, S. E. (2021). Phenotypic plasticity as an intrinsic property of organisms. In D. W. Pfennig, ed., *Phenotypic Plasticity and Evolution: Causes, Consequences, Controversies*. CRC Press, Boca Raton, FL. <https://doi.org/10.1201/9780429343001>
- Taylor, M. L., Skeats, A., Wilson, A. J., Price, T. A., & Wedell, N. (2015). Opposite environmental and genetic influences on body size in North American *Drosophila pseudoobscura*. *BMC Evolutionary Biology*, 15, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0323-3>
- Teletchea, F. (2019). *Animal Domestication: A Brief Overview*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86783>
- Vogt, G. (2021). Epigenetic variation in animal populations: Sources, extent, phenotypic implications, and ecological and evolutionary relevance. *Journal of Biosciences*, 46(1), 24. <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00138-6>
- Wakimoto, B. T. (1998). Beyond the nucleosome: epigenetic aspects of position–effect variegation in *Drosophila*. *Cell*, 93(3), 321-324. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81159-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81159-9)
- Wilkins, A. S., Wrangham, R. W., & Fitch, W. T. (2014). The “domestication syndrome” in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics. *Genetics*, 197(3), 795-808. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.165423>
- Zelditch, M., Swiderski, D., & Sheets, H. D. (2012). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Academic Press.