



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA &
BIODIVERSIDADE**

**ASSIMETRIA FLUTUANTE E ENDOCRUZAMENTO EM *Drosophila willistoni*
Sturtevant, 1916 (Diptera, Drosophilidae)**

LARA HELENA PIRES VIEIRA

Foz do Iguaçu
2016



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA &
BIODIVERSIDADE**

**ASSIMETRIA FLUTUANTE E ENDOCRUZAMENTO EM *Drosophila willistoni*
Sturtevant, 1916 (Diptera, Drosophilidae)**

LARA HELENA PIRES VIEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Ribeiro Faria Junior

Coorientador: Prof. Dr. Hermes José Schmitz

Foz do Iguaçu
2016

LARA HELENA PIRES VIEIRA

**ASSIMETRIA FLUTUANTE E ENDOCRUZAMENTO EM *Drosophila willistoni*
Sturtevant, 1916 (Diptera, Drosophilidae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Ribeiro Faria Junior
Coorientador: Prof. Dr. Hermes José Schmitz

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto R. Faria Junior
UNILA

Prof. Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade
UNILA

Prof. Dra. Elaine Della Gustina Soares
UNILA

Foz do Iguaçu, _____ de _____ de _____.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente sempre, agradeço a minha mãe por toda o amor, dedicação, carinho, apoio e cuidado. Ao meu pai, aos meus irmãos, Guigo, Dimi e Mek, por todo o amor e apoio que me brindam. Aos meus avós, minha família e amigos por tornarem a vida melhor.

Agradeço muito, muito, muito ao Nuno e ao Hermes, meus orientadores, por terem topado me acompanhar nesse trajeto. Obrigada pela paciência e pela dedicação. Aprendi muito com vocês. Estou contente e satisfeita com a escolha de convidá-los para me orientar.

À Carla e a Elaine por terem aceitado compor a banca.

À Kata, a Maria e a Ara, pessoas maravilhosas que a UNILA me deu de presente para a vida com quem iniciei e agora encerro essa parte do caminho. A Diana por todas as conversas interessantíssimas e pela companhia na correria dos nossos experimentos.

Aos amigos que fiz em Foz do Iguaçu, não vou citar nominalmente para não correr o risco de esquecer alguém, aos que estão e aos que já foram. Meu muito obrigado, vocês são parte importante da razão de eu ser feliz aqui.

A Carla, Liliam, Paula, Solange, Amanda, Marieli, Everli, Gisele, Gilson, Bruno e demais técnicos de laboratório da UNILA, por toda ajuda durante todo o experimento. E também ao pessoal de Porto Alegre que me enviaram as linhagens — mais de uma vez — e tornaram a execução desta pesquisa possível.

Aos meus professores da graduação, sou grata pela formação que recebi. Aos meus companheiros de curso e disciplinas, por também serem parte da minha formação.

À Veridiana e ao Rubik, meus supervisores de estágio que me apoiaram muito durante todo o ano. À Jéssica, à Pato, à Bia que foram minhas companheiras durante o estágio. E à Giovana por ter aceitado ser minha orientadora.

Ao meu irmão por ter me acompanhado no laboratório durante algumas etapas do experimento.

À Bia, amigona, pela ajuda no TCC e por ser sempre tão prestativa e disposta a ajudar. Valeu, Nega!

À Alice, pela ajuda no TCC quando eu estava precisando mesmo. Minha

gratidão!

À Renata por ter ajudado muitíssimo nas etapas finais do TCC, nas horas em que eu mais precisei. Pela excelente companhia e incentivo. Obrigada não é suficiente.

Finalmente, à Lari por ter sido a minha companheira e meu porto seguro durante esses cinco anos, por todas os favores de última hora, pela dedicação, pelo carinho, pelo cuidado, por ter estado presente e por eu ter podido contar com você. Muito obrigada!

*Mundo velho
E decadente mundo
Ainda não aprendeu a admirar a beleza
A verdadeira beleza
(...)
A beleza do erro
Do engano
Da imperfeição. **Zeca Baleiro***

PIRES-VIEIRA, Lara Helena. **Assimetria Flutuante e Endocruzamento em *Drosophila willistoni* Sturtevant, 1916 (Diptera, Drosophilidae)**. 2016. 38p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Ecologia & Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2016.

RESUMO

Assimetria Flutuante (FA) é caracterizada como um pequeno desvio aleatório na perfeita simetria de características pareadas. Devido à baixa herdabilidade da FA, ela tem sido frequentemente apontada como um bom indicador de estressores no desenvolvimento dos organismos. O endocruzamento é um fenômeno que tem como consequência a baixa variabilidade genética, que por sua vez aumentam as chances de expressão de fenótipos prejudiciais ao indivíduo. Esse trabalho tem como hipótese a existência de relação entre endocruzamento e assimetria flutuante. Para testar essa hipótese avaliou-se as predições de maiores níveis de assimetria manifestada no tamanho de asas de *Drosophila willistoni* em linhagens submetidas a endocruzamento por um período maior e interação fraca com outros tipos de assimetria biológica. Foram extraídas 240 asas de 120 indivíduos de 4 linhagens separadas em duas categorias de intensidade de endocruzamento. Três parâmetros foram avaliados nas asas. Todas as linhagens apresentam níveis significativos e estatisticamente iguais de FA, mas não apresentam outro tipo de assimetria biológica. Contrariando nossas expectativas, os resultados obtidos podem estar relacionados a efeitos secundários do endocruzamento, fatores não controlados e níveis de assimetria flutuante em populações naturais. No contexto avaliado pelo presente trabalho, níveis maiores de endocruzamento não aumentam os níveis de assimetria flutuante.

Palavras-chave: Assimetrias biológicas. Morfometria. Drosofilídeos. Asa. Distúrbio no desenvolvimento.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Curvas de distribuição de frequências das assimetrias bilaterais. As abelhas representam como seria a distribuição das diferenças esperada nas populações para cada tipo de assimetria.	11
Figura 2: Resultado esperado para o nível de assimetria flutuante nas linhagens, modelo jitterplot	14
Figura 3: Resultado esperado para níveis de assimetria nas linhagens, modelo boxplot.....	15
Figura 4: Curva de distribuição de frequências esperada. ausência de curtose e média 0.	15
Figura 5: Modelo de foto da asa apresentando a posição dos landmarks.	19
Figura 6: Histogramas de distribuição das diferenças entre lado esquerdo e direito para P1.....	23
Figura 7: Histogramas de distribuição das diferenças entre lado esquerdo e direito para P2.....	24
Figura 8: Histogramas de distribuição das diferenças entre lado esquerdo e direito para P3.....	25
Figura 9: Boxplots das linhagens para P2 como proxy de tamanho da asa.	26
Figura 10: Boxplot de assimetria flutuante corrigida pelo tamanho dos indivíduos em P1 para todas as linhagens. Outliers incluídos.....	27
Figura 11: Boxplot de assimetria flutuante corrigida pelo tamanho dos indivíduos em P2 para todas as linhagens. Outliers incluídos.....	27
Figura 12: Boxplot de assimetria flutuante corrigida pelo tamanho dos indivíduos em P3 para todas as linhagens. Outliers incluídos.....	28
Figura 13: Jitterplot das diferenças entre lados corrigido pelo tamanho dos indivíduos para P1 nas quatro linhagens. Outliers excluídos.	28
Figura 14: Jitterplot das diferenças entre lados corrigido pelo tamanho dos indivíduos para P2 nas quatro linhagens. Outliers excluídos.	29
Figura 15: Jitterplot das diferenças entre lados corrigido pelo tamanho dos indivíduos para P3 nas quatro linhagens. Outliers excluídos.	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	MÉTODOS	16
2.1	LINHAGENS.....	16
2.1.1	Manutenção das linhagens em laboratório.....	17
2.1.1.1	<i>Meio de cultura</i>	17
2.2	PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS.....	18
2.3	FOTOGRAFIA.....	19
2.4	DADOS MORFOMÉTRICOS.....	19
2.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	20
3	RESULTADOS	21
4	DISCUSSÃO	30
5	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Simetria é a manifestação de uma identidade comum na forma e/ou no tamanho de unidades repetidas em torno de um eixo: é a harmonia de proporções (WEYL, 1952). A organização e quantidade de unidades repetidas varia na natureza, de forma que o padrão de simetria pode ser bilateral, radial, esférico, helicoidal, translacional e até mesmo se manifestar em padrões que escapam da geometria tradicional euclidiana como é o caso da simetria fractal, que é um tipo de simetria relativa à escala (GRAHAM et al., 2010).

Biologicamente, a razão da simetria ser um padrão tão recorrente entre as formas vivas parece ser a economia implicada nessa arquitetura por requerer menos energia livre em comparação às alternativas assimétricas (GRAHAM et al., 2010). É possível que a simetria represente um trade-off entre complexidade e gasto energético. Por ser esperado que a simetria seja o estado ideal — e não apenas por ser o padrão mais geral — os desvios na simetria causam estranhamento a ponto de parecerem dignos de estudo (TOMKINS; KOTIAHO, 2001).

Talvez uma das maiores vantagens metodológicas de se trabalhar com autoecologia, — especialmente com modelos metazoários — seja os limites ordinariamente perspicuos que separam um indivíduo de outro, e esses limites se manifestam na forma dos organismos, é dizer, o indivíduo enquanto unidade é reconhecido por sua forma (TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2010).

A forma do organismo é um relato — complexo e frequentemente nebuloso — dos processos últimos e dos sucessivos eventos evolutivos que culminaram naquela arquitetura de corpo (RIDLEY, 2006). A variação na forma revela também a história próxima e as idiosincrasias de sua ontogenia (WOLPERT et al., 2008). Com atenção suficiente é possível ainda detectar os desvios mais sutis, que, no entanto, se manifestam como efeito de ruídos nos processos que regulam a forma: é disso que se trata a assimetria flutuante enquanto um desvio da perfeita simetria (TOMKINS; KOTIAHO, 2001; PALMER; STROBECK, 2003; GRAHAM et al., 2010; BEASLEY et al., 2013).

Um atributo intimamente relacionado com a forma do organismo como um todo ou com suas partes é o tamanho. Variações no tamanho do corpo ou no tamanho de estruturas também refletem os processos próximos e últimos que permeiam a vida do organismo. Variações no tamanho podem trazer efeitos tão importantes ao fitness que geram alguns padrões reconhecíveis, superando eventualmente escalas locais e

abrangendo grupos variados de organismos, é o caso, por exemplo, da regra de Bergmann¹ (BEGON,2007). Ademais da história evolutiva, o tamanho também tem causas mais restritas à história de vida de cada organismo em si devido a fatores mais particulares, como por exemplo estresse nutricional (GRAHAM et al.,2010). Assimetria no tamanho também pode resultar de distúrbios durante o desenvolvimento (PALMER, 1994).

Na natureza, os desvios de simetria em características pareadas se manifestam sobretudo de três maneiras: assimetria direcional, antissimetria e assimetria flutuante (PALMER, 1994). O que caracteriza cada um desses tipos de desvios são as variações conjuntas em um grupo de indivíduos comparáveis entre si (TOMKINS; KOTIAHO, 2001).

A assimetria direcional é a tendência de um desvio que se manifesta padronizadamente na mesma direção, por exemplo, a posição tendenciada à esquerda do coração em mamíferos (SANSEVERINO; NESSIMIAN, 2008). Estatisticamente, a média das diferenças entre as características repetidas é diferente de zero (PALMER; STROBECK, 2003). Esse padrão de assimetria parece estar sujeito à seleção, o que significa que não necessariamente seja uma resposta a algum estresse, já que nesse contexto a assimetria é adaptativa (PÉLABON; HANSEN, 2008).

A antissimetria difere da assimetria direcional porque, apesar de existir prevalência da assimetria entre os indivíduos, os desvios se manifestam sem tendência a alguma direção (KLINGENBERG; GRAHAM, 2015). A média das diferenças entre as características repetitivas permanece zero, como na simetria, mas a dispersão das frequências das diferenças em torno da média é alta, a curva de frequências das diferenças é platicúrtica, tendenciando o surgimento — considerando características pareadas — duas modas diferentes nos valores de desvio (PALMER, 1994). Isso quer dizer que na população o tamanho de um membro esquerdo poderia ser muito maior em metade dos indivíduos e na outra metade o direito ser maior, por exemplo. A antissimetria também parece sofrer alguma interferência de fatores evolutivos (VAN VALEN,1962). Entre humanos existe a tendência de que os indivíduos apresentem maiores habilidades com membros de um lado em detrimento do outro — assimetria —, embora o lado varie entre os indivíduos — destros ou canhotos — e entre alguns crustáceos existe a tendência de uma das quelas ser maior que a outra, tanto pode ser a esquerda quanto a direita na mesma população

¹ Segundo essa regra, indivíduos endotérmicos provenientes de locais de climas mais frios, ou seja, latitudes maiores, tendem a apresentar maiores tamanhos do que indivíduos da mesma espécie provenientes de latitudes menores, climas mais quentes.

(SANSEVERINO; NESSIMIAN, 2008)

A assimetria flutuante (FA) é caracterizada por desvios pequenos e aleatórios na perfeita simetria das características repetitivas. O conjunto de variações possui média tendendo a zero e baixa dispersão das frequências das diferenças em relação a média, uma única moda (zero) e distribuição normal (PALMER, 1994; PALMER; STROBECK, 2003).

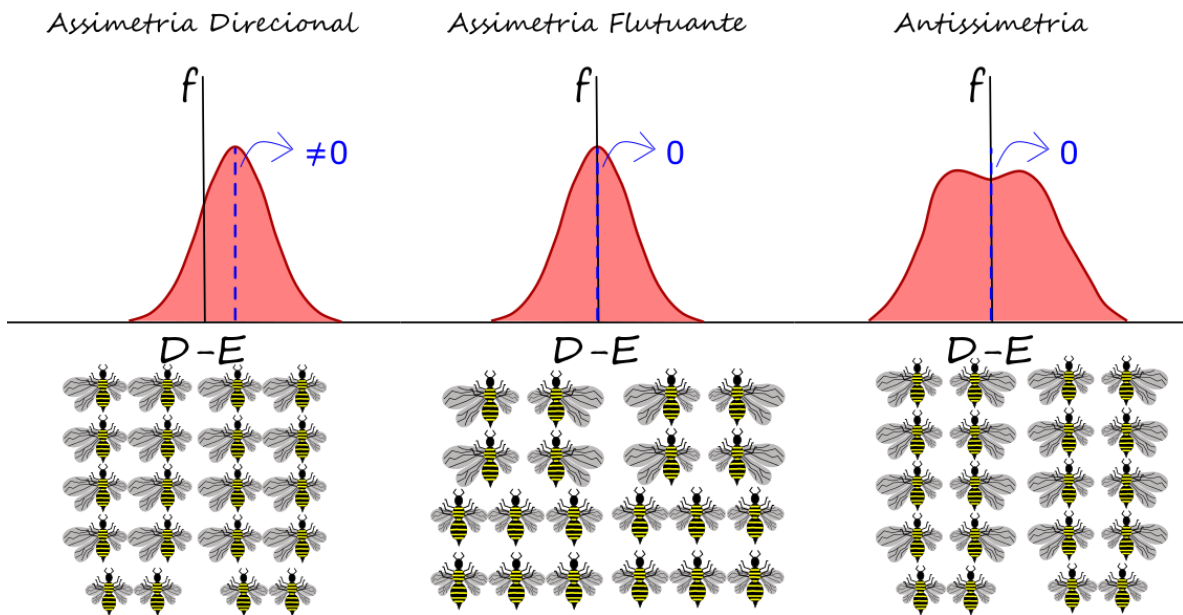


Figura 1: Curvas de distribuição de frequências das assimetrias bilaterais. As abelhas representam como seria a distribuição das diferenças esperada nas populações para cada tipo de assimetria. O eixo D-E representa a magnitude das diferenças entre os lados direitos e esquerdos e o eixo f representa a frequência dessas diferenças. A linha azul tracejada representa a média das diferenças. A assimetria direcional no exemplo, descreve uma população de abelhas cuja a asa esquerda da maioria dos indivíduos é maior que a asa direita. Na assimetria flutuante a maioria das abelhas é simétrica (em relação às asas), mas algumas apresentam desvios sem tendência a um lado específico. Na antissimetria, as asas das abelhas são em geral assimétricas, mas sem tendência a um lado específico.

Diferentemente dos outros tipos de assimetrias biológicas, a assimetria flutuante não parece ser mediada pela seleção, inclusive a herdabilidade aparentemente se aproxima de zero (e.g. WOODS et al., 1998; DONGEN et al., 1999; CAMPO et al., 2005). Nesse sentido vale chamar atenção para a observação de que a aleatoriedade da FA e a ausência da atuação de fatores evolutivos não implicam na ausência de outro processo mediador desse fenômeno (PALMER, 1994; TOMKINS; KOTIAHO, 2001; PALMER; STROBECK, 2003; GRAHAM et al., 2010; BEASLEY et al., 2013). Ao contrário, a baixa herdabilidade e o custo-benefício da simetria são bons motivos para relacionar a FA com fatores extrínsecos ao organismo, isto é, estresses ambientais que causam instabilidade no

desenvolvimento (BEASLEY et al., 2013).

O período de desenvolvimento do organismo é bastante crítico, por isso instabilidades nessa fase podem se tornar evidentes no indivíduo adulto (PINTO et al., 2015). A instabilidade no desenvolvimento está relacionada com estresses ambientais (HOFFMANN et al., 2002; BEASLEY et al., 2013), sendo que esses estresses podem ter como fonte a escassez de recursos (ROULSTON; CANE, 2000), parasitismo (e.g. ALIBERT et al., 2002), a presença ou ausência de alguma substância que afeta reações metabólicas (RIBEIRO et al., 2007), competição severa, condições subótimas, alterações forçadas na fenologia do organismo, e estresses genéticos (SANSEVERINO; NESSIMIAN, 2008), fragmentação, redução do habitat (LENS et al., 1999) mudanças climáticas e ações antrópicas (SILVA et al., 2009)

A instabilidade no desenvolvimento pode estar associada a níveis altos de endocruzamento (MARKOW; MARTIN, 2009). Populações com alta intensidade de endogamia possuem baixa variabilidade genética já que a expectativa da inserção de novos alelos é baixa, além de que o pool de alelos da próxima geração ficaria restrito basicamente ao que já havia na geração anterior presente no local (RIDLEY, 2006).

As consequências de uma variabilidade genética baixa podem ser a diminuição da heterozigosidade, aumento das chances de expressão de fenótipos prejudiciais ou letais, baixa viabilidade e fertilidade da prole, diminuição da resistência a distúrbios, mortalidade dos indivíduos seja na fase juvenil ou adulta, e também alterações na morfologia dos indivíduos (GONÇALVES; MARE, 2005; HARTL; CLARK, 2010). Se a variabilidade genética é baixa, qualquer distúrbio que afeta um indivíduo deve afetar uma parte significativa da população (ver RIDLEY, 2006).

Outra consequência gerada pela baixa variabilidade e heterozigosidade é a instabilidade das vias genéticas e metabólicas que controlam o desenvolvimento, de forma que o crescimento do indivíduo durante o desenvolvimento seja desordenado e finalmente assimétrico, pois indivíduos heterozigotos aparentemente têm mais sucesso em tamponar distúrbios no desenvolvimento em comparação com indivíduos homozigotos (CLARKE, 1993). Assim, o endocruzamento pode ser uma importante fonte de estresse causadora da assimetria flutuante em uma população (TOMKINS; KOTIAHO, 2001). Isso é bastante preocupante em um cenário de fragmentação de habitat ostensiva, como o atual, que potencialmente tornaria as populações naturais mais sujeitas ao endocruzamento (PIRES et al., 2006; NASCIMENTO, 2007).

Boa parte do conhecimento biológico -- incluindo efeitos dos

estressores/variáveis mencionadas anteriormente -- está baseado em alguns poucos modelos e entre os mais estudados e com maior abundância de informações estão as drosófilas — conhecidas também como moscas-da-fruta — (POWELL, 1997), com os genomas completos já sequenciados de, pelo menos, doze espécies (DROSOPHILA 12 GENOMES CONSORTIUM, 2007). O grupo é um modelo clássico em trabalhos em ecologia, genética de população, biologia do desenvolvimento, evolução (POWELL, 1997; MARKOW; O'GRADY, 2006).

Drosophila willistoni foi renomeada por Sturtevant em 1916, foi descrita por Williston em 1896 — por isso *willistoni* — como *Drosophila pallida*, nome conflituoso, pois em 1847 já estava descrita outra espécie com o mesmo nome (*D. pallida* Zett.) (STURTEVANT, 1916). É um modelo de ocorrência neotropical, (STURTEVANT, 1916; POWELL, 1997; GOTTSCHALK et al., 2008) e está entre as espécies que possui o genoma sequenciado (DROSOPHILA 12 GENOMES CONSORTIUM, 2007).

As vantagens de trabalhar com drosofilídeos são em parte derivadas da própria tradição, já que o acúmulo de informações biológicas acerca do grupo é admirável, se comparada a outros; e, por outro lado, pelo seu ciclo de vida rápido, pela abundância, pela facilidade, custo relativamente baixo de cultivo (POWELL, 1997) e também pelas questões éticas mais afrouxadas em se tratando de experimentos com invertebrados (BLOOM et al., 2012).

Mesmo com um bom modelo biológico definido, a assimetria flutuante por ser aleatória e sutil é de difícil previsibilidade quanto ao marcador morfológico que apresenta o desvio (PALMER; STROBECK, 2003). Os critérios de escolha do marcador devem observar em primeiro lugar as características pareadas, em seguida a comparabilidade entre os indivíduos, a aferição mais precisa possível, ou seja, menor erro embutido nas medidas e a plasticidade do marcador (TOMKINS; KOTIAHO, 2001; PALMER; STROBECK, 2003; GRAHAM et al., 2010). Nesse sentido, as asas são boas características para serem avaliadas em relação a assimetria flutuante, tanto para forma quanto para tamanho. A utilização das asas como marcadores em estudos de alometria em insetos é, inclusive, bastante comum (e.g. KLINGENBERG et al., 1998; BITNER-MATHÉ; KLACZKO, 1999; PITHER; TAYLOR, 2000; HOFFMANN et al., 2002; RIBEIRO et al., 2007; MCLACHLAN, 2010; BENÍTEZ et al., 2014; PINTO et al., 2015).

Apesar de boa parte da bibliografia consultada acerca deste tema citar o endocruzamento como um dos principais estressores relacionados a assimetria flutuante, poucos dos trabalhos consultados estudaram a interferência direta do endocruzamento nos

níveis de assimetria flutuante. Alguns estudos conectam o endocruzamento com a assimetria através de cenários de fragmentação (e.g SARRE, 1996), e estes estudos, assim como os que envolvem experimentação direta de endocruzamentos, geralmente percebem níveis moderados deste parâmetro (e.g FOWLER; WHITLOCK, 1994) em cenários onde a assimetria flutuante poderia ocorrer. Desta forma, estudos interessados em testar de forma direta o “mito da relação endocruzamento-assimetria flutuante” fazem-se necessários.

Utilizando *Drosophila willistoni* Sturtevant, 1916 como modelo de estudo, o objetivo geral dessa pesquisa é avaliar a relação entre endocruzamento e assimetria flutuante. Os objetivos específicos são (i) avaliar a relação entre tempo de isolamento de linhagens de *Drosophila willistoni* e os níveis de assimetria flutuante manifestados em desvio no tamanho da asa e (ii) avaliar a interação deste tipo de assimetria com outras assimetrias biológicas na forma e tamanho das asas. Espera-se que (i) haja uma correlação positiva entre o tempo de isolamento das linhagens e os níveis de assimetria flutuantes, e que (ii) a interação com outras assimetrias biológicas seja fraca. Se essas expectativas se confirmarem, apoiarão a hipótese deste trabalho que é a existência de relação causal entre endocruzamento e assimetria flutuante. As Figura 2, Figura 3 e Figura 4 apresentam os resultados esperados correspondentes às predições.

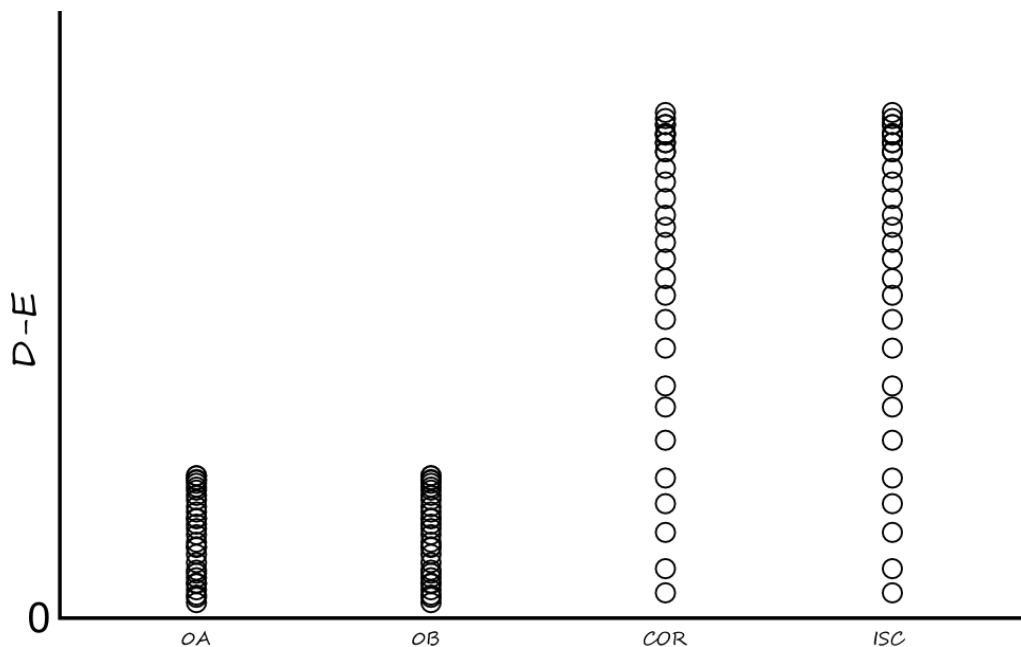


Figura 2: Resultado esperado para o nível de assimetria flutuante nas linhagens, modelo jitterplot. Os círculos representam os indivíduos. O eixo vertical representa a diferença entre asas direita e esquerda. O eixo horizontal apresenta as linhagens. As linhagens OA e OB apresentam menores intensidades de endocruzamento e as linhagens COR e ISC apresentam maiores intensidades de endocruzamento. Espera-se que as duas últimas linhagens apresentem maiores valores de assimetria do que as outras.

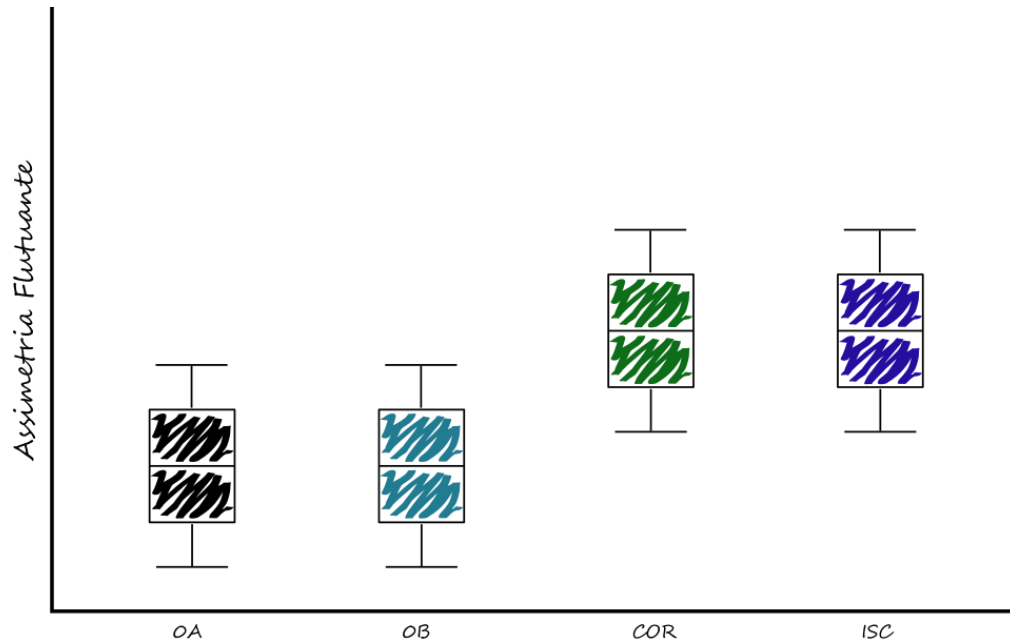


Figura 3: Resultado esperado para níveis de assimetria nas linhagens, modelo boxplot. O eixo vertical representa a diferença entre asas direita e esquerda. O eixo horizontal apresenta as linhagens. As linhagens OA e OB apresentam menores intensidades de endocruzamento e as linhagens COR e ISC apresentam maiores intensidades de endocruzamento. Espera-se que as duas últimas linhagens apresentem níveis significativamente maiores de Assimetria Flutuante do que as outras.

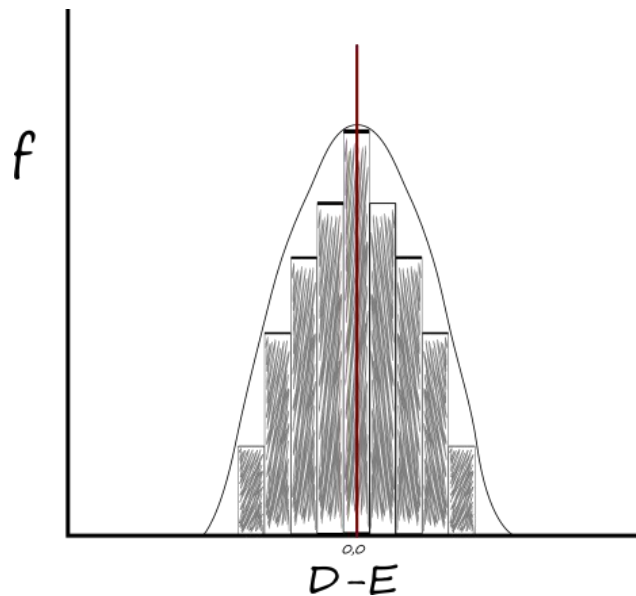


Figura 4: Curva de distribuição esperada. O eixo horizontal representa a diferença entre asas direita e esquerda. O eixo vertical representa a frequência das diferenças. Ausência de curtose e mediadas diferenças igual a 0.

2 MÉTODOS

Para testar a hipótese de que o endocruzamento aumenta os níveis de FA em *Drosophila willistoni*, o experimento foi dividido em cinco etapas: criação de quatro linhagens com diferentes graus de endocruzamento; extração das asas dos indivíduos e preparação das lâminas contendo as asas; fotografia das asas; extração de dados morfométricos e análises estatísticas.

2.1 LINHAGENS

O experimento foi realizado com quatro linhagens de *Drosophila willistoni*. O nível de endocruzamento foi considerado correlato ao tempo de estabelecimento das linhagens em laboratório, é dizer, quanto mais antiga a linhagem, maior é o nível de endocruzamento esperado. Essa consideração parte do fato de que as linhagens de laboratório são, em primeiro lugar, estabelecidas a partir de uma única fêmea — isolinhagens — ou poucas fêmeas e, em segundo lugar, a cada geração apenas alguns indivíduos são selecionados para a continuidade da criação da linhagem no laboratório.

Neste experimento, por limitações metodológicas, o nível de endocruzamento é um dado categórico e nesse sentido as quatro linhagens foram separadas em duas categorias: nível baixo de endogamia e nível alto de endogamia. As linhagens 0A e 0B foram estabelecidas apenas para esse experimento — por isso o “0” referente a sua idade — e correspondem à primeira categoria de endocruzamento. Já as linhagens COR, com 20 anos de idade e ISC, 25 anos de idade, correspondem à segunda categoria de endocruzamento. **O Erro! Fonte de referência não encontrada.** contém informações complementares sobre as linhagens.

Linhagem	Local	Coordenadas	Ano	Coletor
0A	Foz do Iguaçu, PR (Brasil)	25°32'44.0"S, 54°24'57.6"W	2015	Hermes J. Schmitz
0B	Foz do Iguaçu, PR (Brasil)	25°32'44.0"S, 54°24'57.6"W	2015	Hermes J. Schmitz
Coronilla (COR)	Coronilla (Uruguai)	33° 53'S, 59° 82'W	1996	Beatriz Goñi
Ilha de Santa Catarina (ISC)	Florianópolis, SC (Brasil)	27° 42'S, 48° 30'W	1991	Daniela de Toni

Quadro 1: Informações sobre as linhagens. Nome, cidade, coordenadas geográficas, ano de coleta e nome do coletor das linhagens estudadas no experimento.

2.1.1 Manutenção das linhagens em laboratório

A cultura das linhagens nesse experimento foi padronizada. As linhagens foram criadas em frascos de vidro transparente em formato cilíndrico — e região superior com diâmetro menor que a inferior — com volume de aproximadamente 250 cm³, sendo 40 cm³ ocupados pelo meio de cultura. Os frascos foram mantidos em câmara incubadora a uma temperatura constante de aproximadamente 25 °C e 12 horas de fotoperíodo.

A criação das linhagens 0A e 0B durou de novembro de 2015 a dezembro do mesmo ano. A criação padronizada das linhagens COR e ISC, para fins desse experimento, durou de agosto de 2016 a outubro do mesmo ano.

Uma vez por semana ou de acordo com a necessidade, as moscas foram repicadas para meios novos para que as gerações não se misturassem, para manter a qualidade padrão do meio de ovoposição e também evitar estresses relacionados à densidade populacional elevada.

2.1.1.1 Meio de cultura

Os ingredientes, proporções e modo de preparo do meio de cultura para as moscas foi padronizado segundo o protocolo de Gomes (2001) com algumas adaptações.

- Ingredientes

Mistura I:

Ágar – 2,5 gramas

Glicose de milho – 30 ml

Levedura (fermento biológico) – 28 g

Água destilada (ou bidestilada, ou deionizada) – 150 ml

Mistura II:

Farinha de milho – 35 g

Água destilada (ou bidestilada, ou deionizada) – 200 ml

- Modo de preparo

A farinha de milho foi dissolvida em água quente — em geral, aquecida por aproximadamente 30 segundos no micro-ondas em potência alta — durante o preparo da mistura II. A glicose de milho foi dissolvida na água quente e misturada ao ágar e fermento — ambos sempre pesados em balança de precisão. Após a adição de todos os

ingredientes, a mistura I foi aquecida — no microondas, potência alta, em intervalos de 15 segundos — e agitada até que estivesse visivelmente homogênea. Adicionou-se a mistura I à mistura II e o conteúdo resultante foi aquecido — no microondas, potência alta, em intervalos de 30 segundos aproximadamente — e homogeneizado até a fervura.

Para minimizar a proliferação de fungos, após a fervura do material resultante das misturas I e II, foram adicionados 25 ml de uma solução de Nipagin a 10% em etanol a 70%.

Ainda quente e antes da solidificação, o meio foi fracionado em porções de 40 ml — estimados com proveta — e vertido nos frascos. Quando o meio já estavam sólidos no frasco, eram feitas — para a ovoposição — fissuras superficiais formando uma cerquilha no meio de cultura. Utilizou-se um pedaço de papel filtro fixado no meio de cultura para manter a umidade do frasco e retirar o excesso de umidade presente no meio.

Os animais eram depositados nos frascos, depois do meio estar sólido e em temperatura ambiente e os frascos estarem secos o suficiente para evitar que as moscas fiquem grudadas. Os frascos foram vedados com tecido fino e elástico ou espuma.

Durante o período de manutenção dos indivíduos, quando necessário, fermento dissolvido em água — a consistência da mistura depende do estágio do desenvolvimento dos indivíduos, se houver muitos adultos, a consistência da mistura precisa estar mais firme — foi adicionado ao meio de cultura.

2.2 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

A partir da segunda geração da cultura padronizada, 30² fêmeas³ de cada linhagem foram separadas — a seleção dos indivíduos foi baseada na integridade, sendo selecionados os 30 primeiros que apresentassem as duas asas com os marcadores morfológicos de interesse intactos para a preparação das lâminas.

A extração das asas foi realizada com auxílio de seringas — 0,5 e 1 mL — sendo que a agulha foi utilizada como instrumento de corte. As asas foram depositadas entre duas lâminas — para microscopia, com uma extremidade fosca, sem lapidar, tamanho 25,4X76,2mm — com identificação da linhagem, sexo, lado — esquerdo e direito, definidos relativamente ao indivíduo em posição dorsal — e número do indivíduo, e foram fixadas em álcool a 70%. As lâminas foram seladas com esmalte incolor. Cada lâmina — entende-se

² Esse número foi definido afim de atender minimamente requisitos estatísticos como a possibilidade de distribuição normal dos dados.

³ Foram selecionadas apenas às fêmeas com a intenção de padronizar efeitos relacionados ao sexo.

o par de lâminas seladas — contém 10 asas — esquerda e direita — provenientes de 5 indivíduos.

No total foram preparadas 40 lâminas contendo 240 asas de 120 indivíduos.

2.3 FOTOGRAFIA

Cada asa foi fotografada individualmente através da estereomicroscópio Carl Zeiss SE64, acoplado ao programa ZEN 2.3 – blue edition versão 2.3.64.0 e com as seguintes configurações: objetiva 1,0X, câmera 0,5X, Zoom 54X e magnificação de 27X, campo 4,3 mm, refletor BF, 100% dos leds superiores ligados e intensidade de luz não padronizada — de acordo com a nitidez de cada lâmina ou asa —, tempo de exposição automática — entre 16,78 e 16,85 ms, balanço de branco automático e 50% de temperatura (cor), escala: 1 pixel = 2,2 μm x 2,2 μm . As imagens foram identificadas com a linhagem, número do indivíduo e lado da asa, e salvas no formato CZI — nativo do ZEN — em memória ROM.

2.4 DADOS MORFOMÉTRICOS

Os dados morfométricos também foram extraídos através do ZEN 2.3. Foram escolhidos 3 seguimentos (P1, P2 e P3) apresentados na Figura 5 da asa que conectam marcos anatômicos homólogos em *Drosophila*, ou seja, regiões que são passíveis de reconhecimento entre todas as asas analisadas.

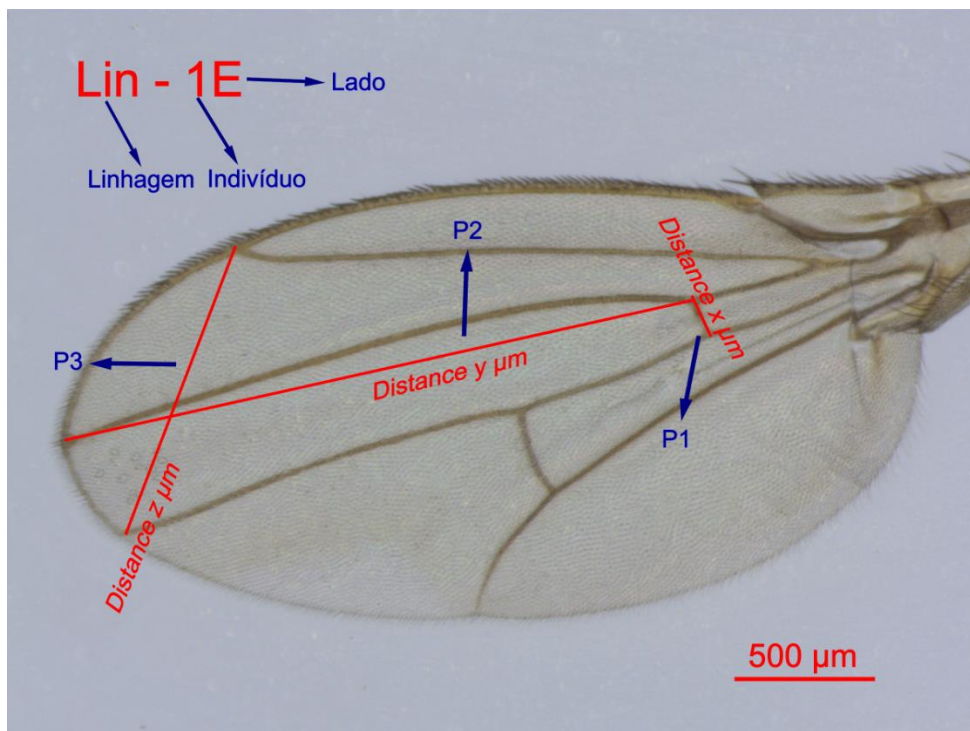


Figura 5: Modelo de foto da asa apresentando a posição dos segmentos avaliados.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas utilizadas neste trabalho foram baseadas em PALMER (1994). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Jarque-Bera e a homocedasticidade foi avaliada pelo teste de Levene.

Para verificar a significância da assimetria direcional foi utilizado o índice FA10 (Palmer, 1994) e para verificar a presença de antissimetria nas linhagens realizou-se teste de curtose e assimetria na curva de distribuição das diferenças entre lados. Utilizando P2 como proxy do tamanho da asa, a necessidade de correção das diferenças pelo tamanho das moscas foi avaliada por meio de ANOVA. Para comparação entre os níveis de assimetria flutuante das linhagens foi utilizado o teste FA3 que avalia as diferenças em módulo já corrigindo pelo tamanho (PALMER, 1994). Para comparação par-a-par, foi aplicado o teste de Tukey. As análises estatísticas e os gráficos apresentados foram feitos utilizando o software R.

3 RESULTADOS

De acordo com as análises estatísticas nenhuma das linhagens possui níveis significativos de antissimetria ou assimetria direcional. As Tabela 1 a 4 apresentam os valores do quadrado médio (MS), graus de liberdade (DF) e valor de F da ANOVA de dois fatores para os três parâmetros avaliados em cada linhagem. Valores de F acompanhados de asterisco são significativos considerando um alfa crítico de 5%. Nenhum valor de F associado ao parâmetro “Lado” é significativo, o que indica ausência de assimetria direcional significativa. O parâmetro indivíduo avalia as diferenças de tamanho entre os espécimes estudado. Quase todos os valores de F associados a esse parâmetro são significativos, indicando que, como esperado, os indivíduos variam de tamanho entre si. Os valores de F provenientes da interação lado X indivíduos são significativos, exceto em P2 e P3 da linhagem 0B. Esses resultados evidenciam níveis significativos de assimetria flutuante em todas as linhagens para quase todos os parâmetros morfológicos analisados. As Figura 6 a Figura 8 apresentam os histogramas com a curva de densidade dos valores resultantes da diferença entre lados para P1, P2 e P3 respectivamente em todas as linhagens.

Tabela 1: Resultados da ANOVA de dois fatores para a linhagem 0A

0A	Lado (S)			Indivíduo (I)			Interação (SxI)			Erro	
	MS	DF	F	MS	DF	F	MS	DF	F	MS	DF
P1	3,70E-04	1	2,17	1,13E-03	29	6,69*	1,70E-04	29	2,12*	8,00E-05	120
P2	9,17E-03	1	0,44	2,66E-01	29	12,87*	2,07E-02	29	392,89*	5,00E-05	120
P3	1,22E-03	1	0,48	3,31E-02	29	13,07*	2,54E-03	29	14,61*	1,70E-04	120

Tabela 2: Resultados da ANOVA de dois fatores para a linhagem 0B

0B	Lado (S)			Indivíduo (I)			Interação (SxI)			Erro	
	MS	DF	F	MS	DF	F	MS	DF	F	MS	DF
P1	2,36E-05	1	0,22	4,25E-04	29	3,90*	1,09E-04	29	13,18*	8,28E-06	120
P2	5,02E-03	1	0,88	8,20E-02	29	14,39*	5,70E-03	29	1,33	4,30E-03	120

* p<0,05

P3 7,41E-04 1 0,56 1,25E-02 29 9,38* 1,33E-03 29 1,13 1,17E-03 120

Tabela 3: Resultados da ANOVA de dois fatores para a linhagem COR

COR	Lado (S)			Indivíduo (I)			Interação (SxI)			Erro	
	MS	DF	F	MS	DF	F	MS	DF	F	MS	DF
P1	9,58E-05	1	0,76	3,88E-04	29	3,09*	1,26E-04	29	22,63*	5,56E-06	120
P2	3,07E-03	1	1,22	2,06E-02	29	8,21*	2,50E-03	29	16,48*	1,52E-04	120
P3	1,88E-02	1	6,86	1,30E-02	29	4,74*	2,74E-03	29	37,91*	7,22E-05	120

Tabela 4: Resultados da ANOVA de dois fatores para a linhagem ISC

ISC	Lado (S)			Indivíduo (I)			Interação (SxI)			Erro	
	MS	DF	F	MS	DF	F	MS	DF	F	MS	DF
P1	2,62E-06	1	0,02	4,45E-04	29	3,76*	1,18E-04	29	20,75*	5,70E-06	120
P2	5,65E-04	1	0,46	3,60E-02	29	29,02*	1,24E-03	29	9,40*	1,32E-04	120
P3	1,21E-01	1	1,07	1,33E-01	29	1,18	1,13E-01	29	1643,70*	6,89E-05	120

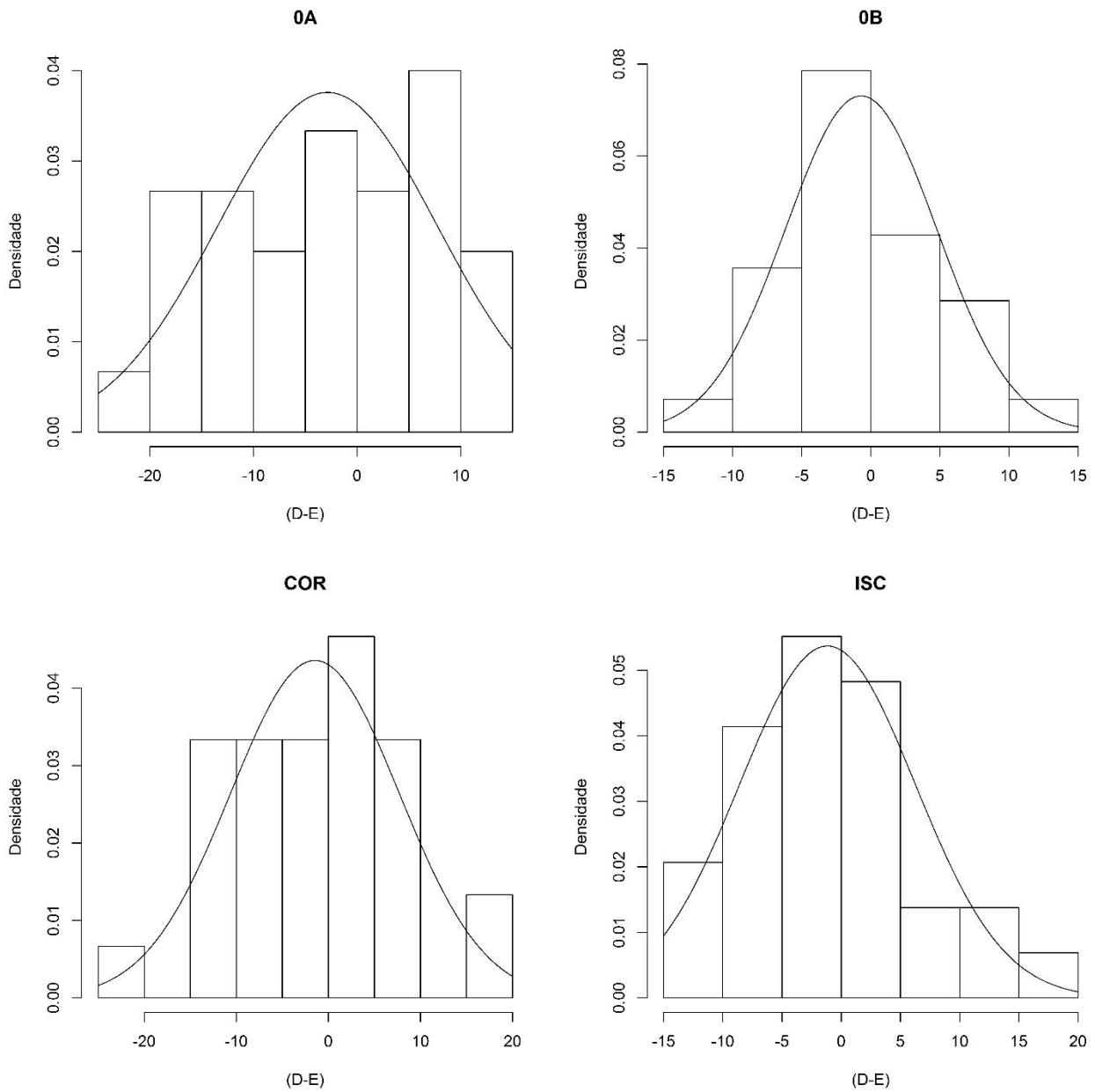


Figura 6: Histogramas de distribuição das diferenças entre lado esquerdo e direito para P1. No eixo vertical a densidade dos valores e no eixo horizontal a diferença entre as medidas em cada lado. A média das diferenças não difere significativamente de 0.

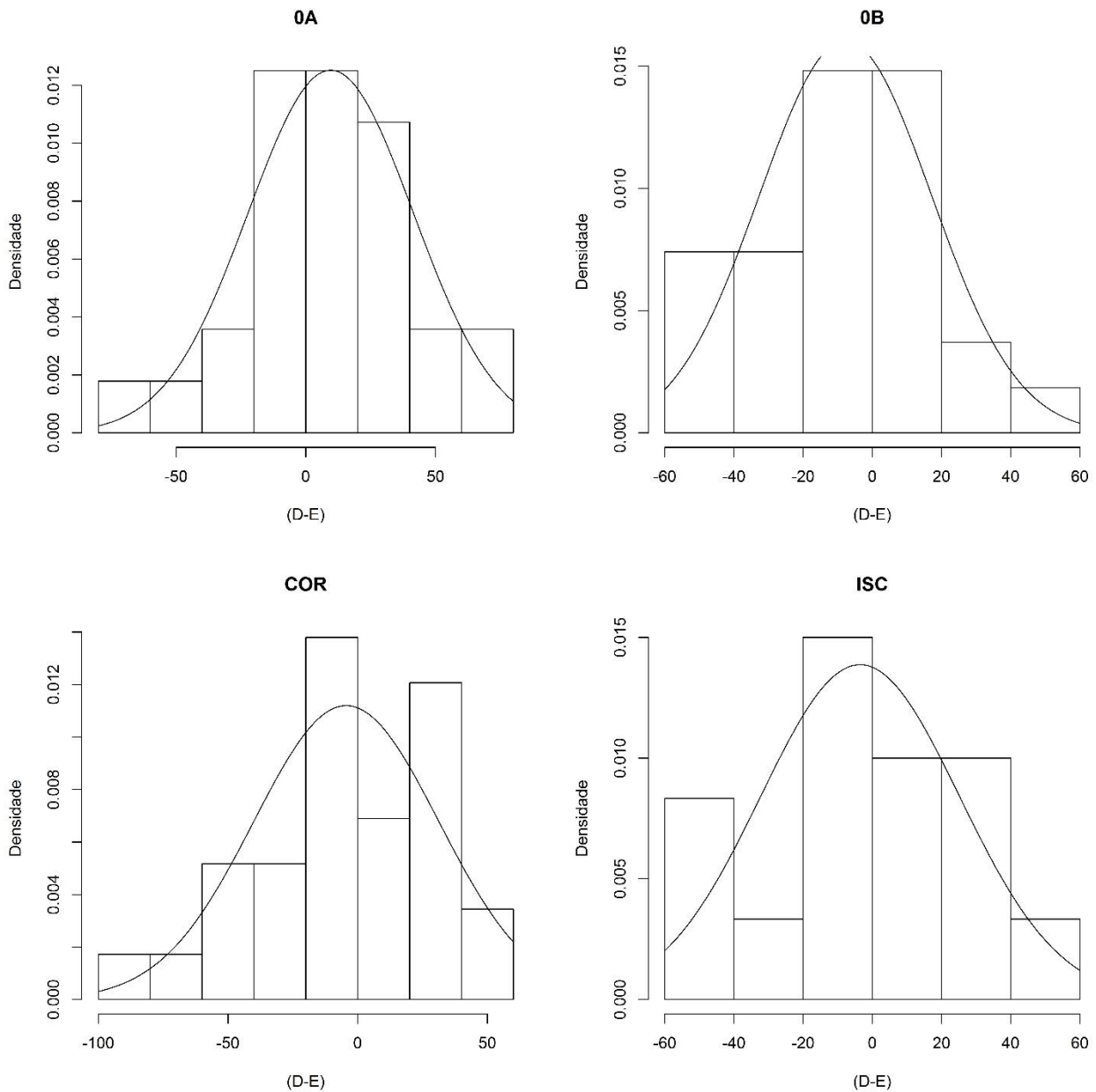


Figura 7: Histogramas de distribuição das diferenças entre lado esquerdo e direito para P2. No eixo vertical a densidade dos valores e no eixo horizontal a diferença entre as medidas em cada lado. A média das diferenças não difere significativamente de 0.

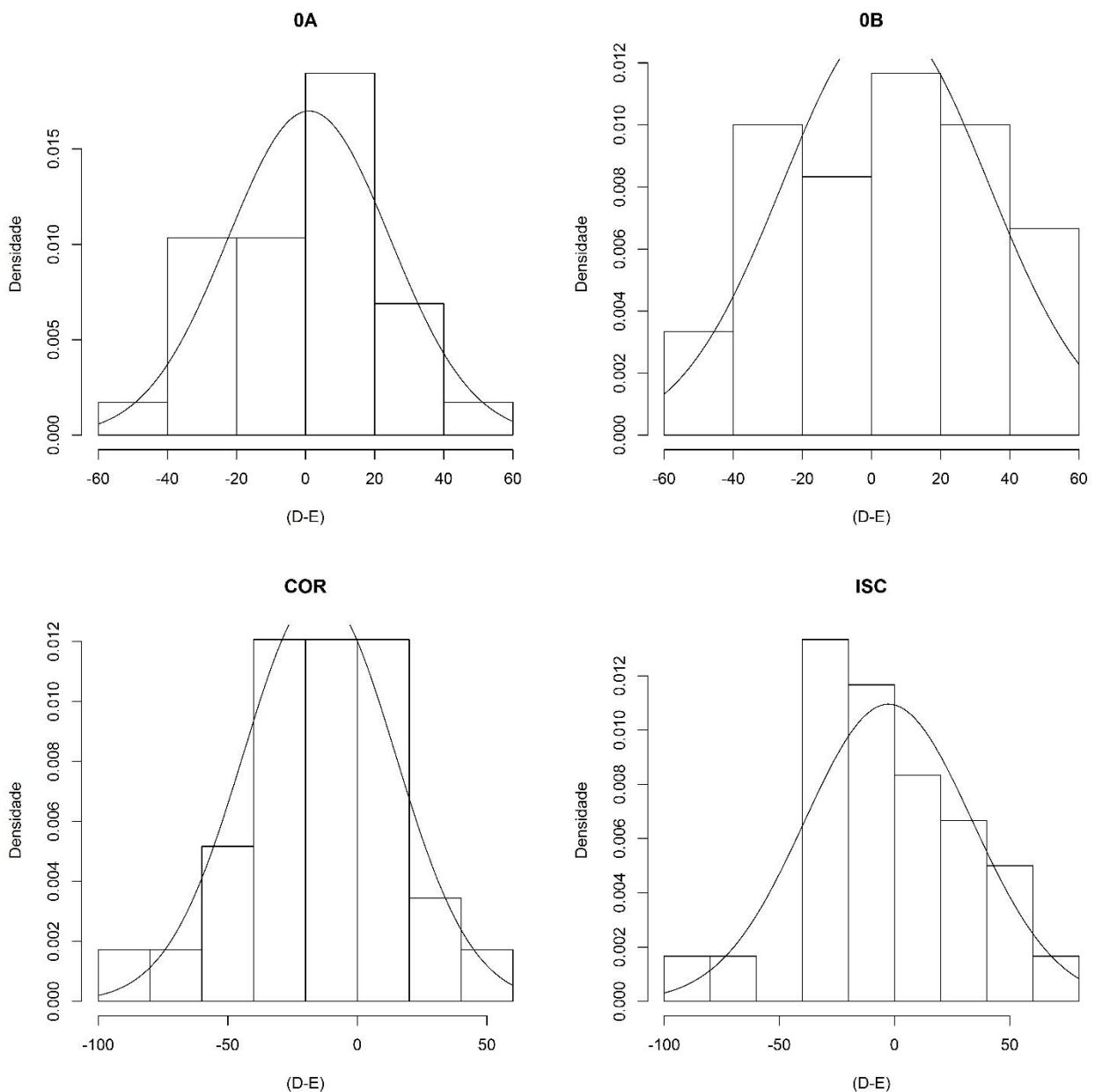


Figura 8: Histogramas de distribuição das diferenças entre lado esquerdo e direito para P3. No eixo vertical a densidade dos valores e no eixo horizontal a diferença entre as medidas em cada lado. A média das diferenças não difere significativamente de 0.

A ANOVA realizada com os dados de P2 mostra que a, apesar de não haver diferença significativa no tamanho das asas entre 0A, 0B e COR, a diferença é significativa entre ISC, que é maior, e todas as outras linhagens. A Figura 9: Boxplots das linhagens para P2 como proxy de tamanho da asa., apresenta os boxplot das linhagens para a média de P2.

Segundo os resultados das comparações entre os níveis de assimetria flutuante entre as linhagens, não há diferenças significativas entre os níveis de assimetria flutuante das linhagens. As Figura 10 aFigura 15 apresentam comparações entre os níveis de FA das linhagens.

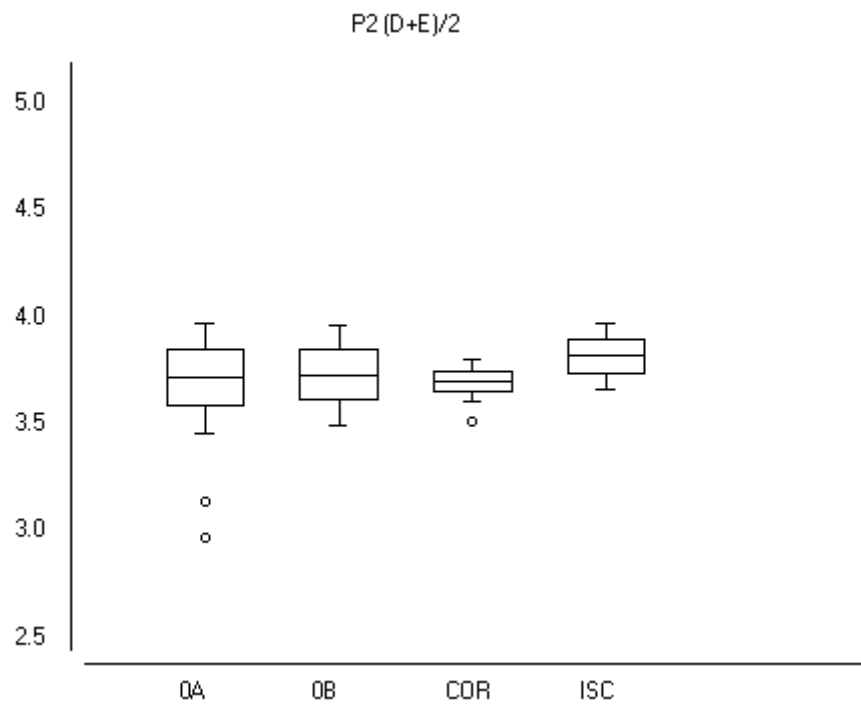


Figura 9: Boxplots das linhagens para P2 como proxy de tamanho da asa. A linhagem ISC é significativamente maior que as outras.

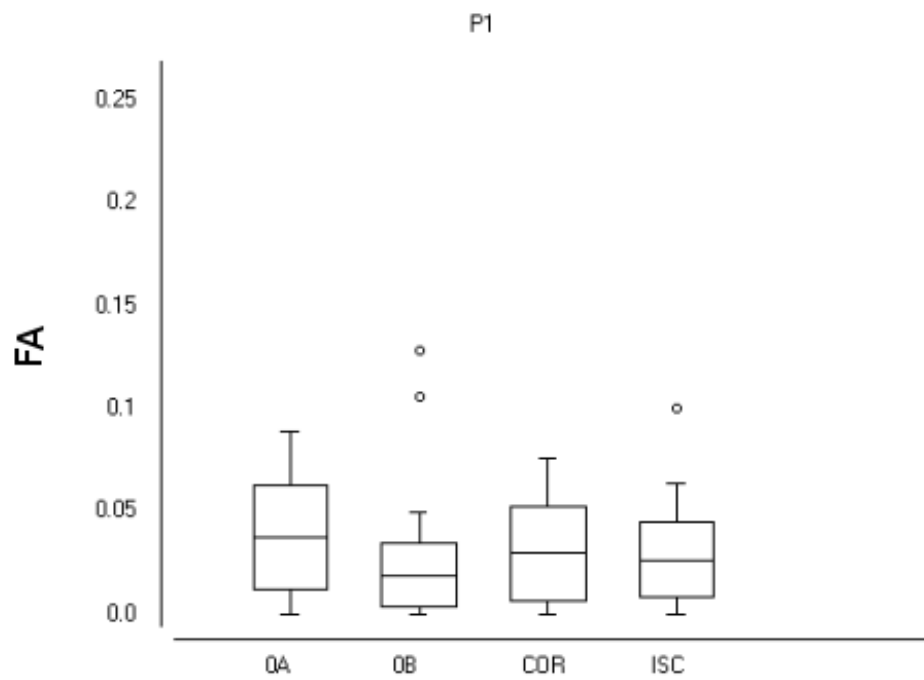


Figura 10: Boxplot de assimetria flutuante corrigida pelo tamanho dos indivíduos em P1 para todas as linhagens. Outliers incluídos. No eixo vertical, a magnitude de assimetria flutuante e no eixo horizontal, as linhagens. A diferença do grau de FA entre as linhagens não é significativa..

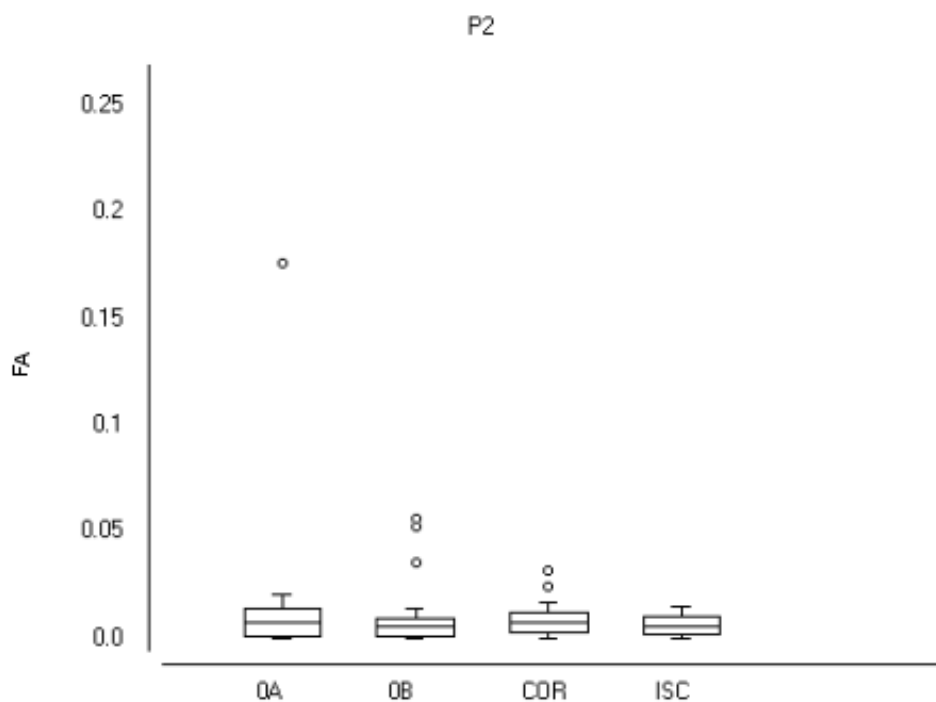


Figura 11: Boxplot de assimetria flutuante corrigida pelo tamanho dos indivíduos em P2 para todas as linhagens. Outliers incluídos. No eixo vertical, a magnitude de assimetria flutuante e no eixo horizontal, as linhagens. A diferença do grau de FA entre as linhagens não é significativa..

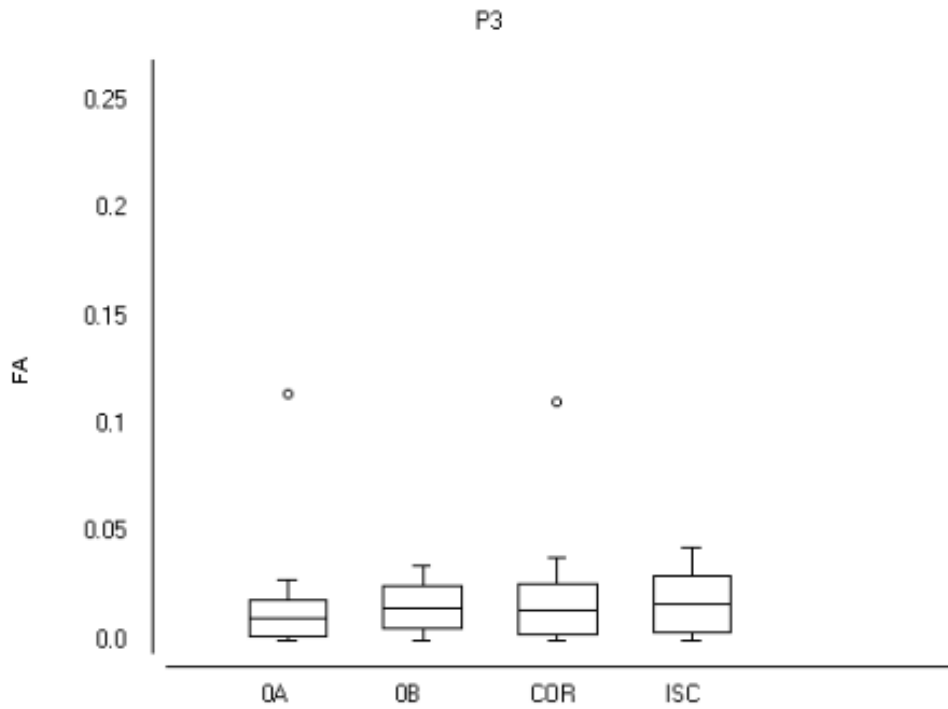


Figura 12: Boxplot de assimetria flutuante corrigida pelo tamanho dos indivíduos em P3 para todas as linhagens. Outliers incluídos. No eixo vertical, a magnitude de assimetria flutuante e no eixo horizontal, as linhagens. A diferença do grau de FA entre as linhagens não é significativa.

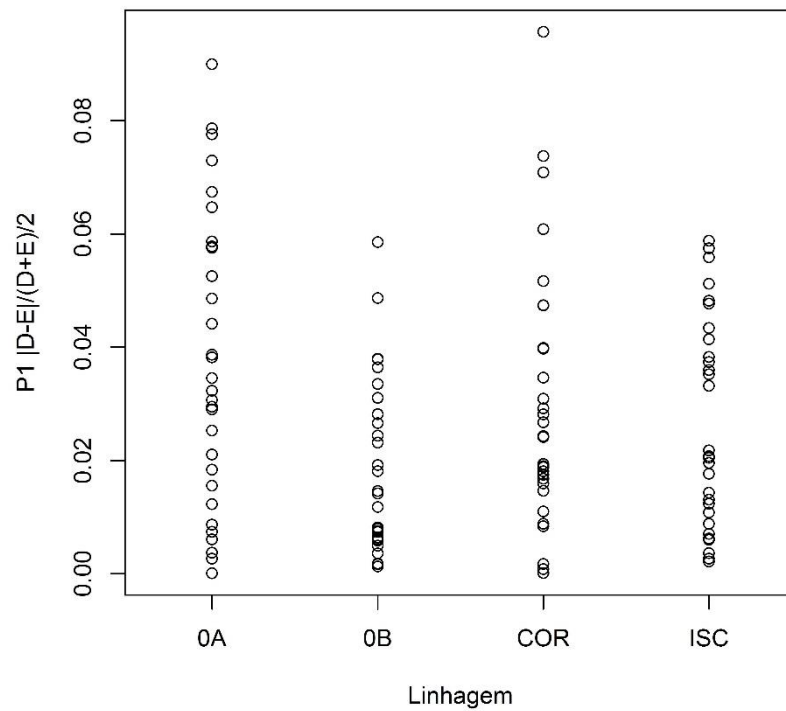


Figura 13: Jitterplot das diferenças entre lados corrigido pelo tamanho dos indivíduos para P1 nas quatro linhagens. Outliers excluídos.

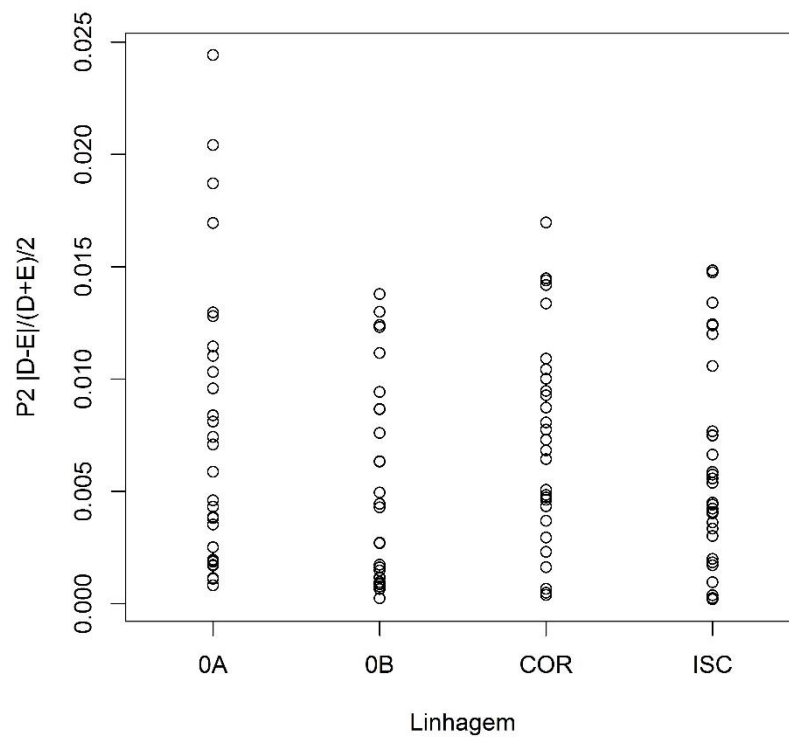


Figura 14: Jitterplot das diferenças entre lados corrigido pelo tamanho dos indivíduos para P2 nas quatro linhagens. Outliers excluídos.

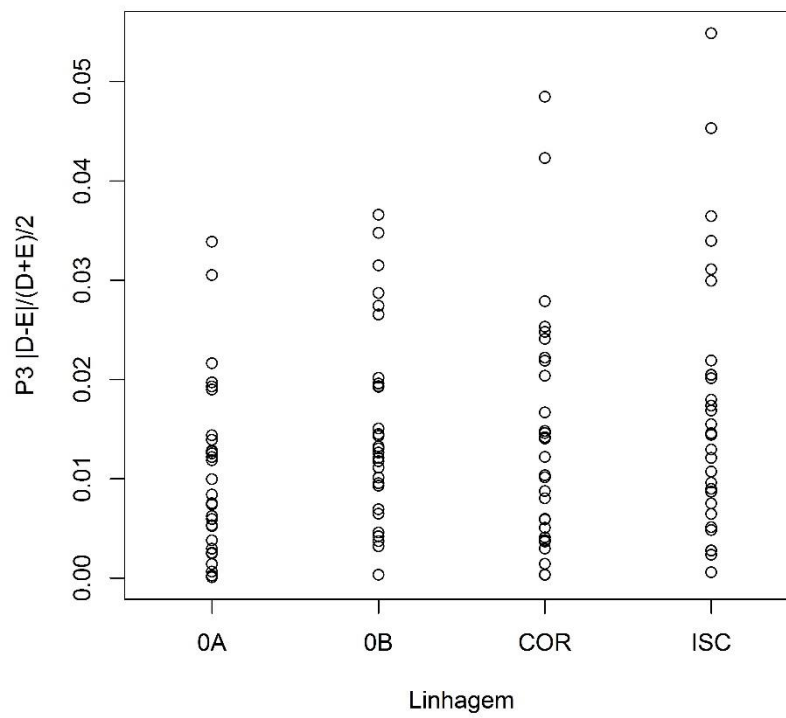


Figura 15: Jitterplot das diferenças entre lados corrigido pelo tamanho dos indivíduos para P3 nas quatro linhagens. Outliers excluídos.

4 DISCUSSÃO

Contrariando as expectativas para este experimento, os resultados observados indicam que, para o contexto avaliado aqui, maior quantidade de gerações suscetíveis à endogamia não aumenta os níveis de FA nas asas.

Além disso, para os mesmos parâmetros morfológicos não são observados níveis significativos de assimetria direcional, de acordo com a análise de FA10, e tampouco são observados níveis significativos de antissimetria, de acordo com a análise de curtose e assimetria na curva de distribuição das diferenças entre lados, para nenhum parâmetro em nenhuma linhagem.

Considerando que tanto os níveis de assimetria direcional, como os níveis de antissimetria apontariam para relações entre assimetria e evolução (VAN VALEN, 1962; PÉLABON; HANSEN, 2008), e que níveis significativos de FA que, devido à baixa herdabilidade (WOODS et al., 1998; DONGEN et al., 1999; CAMPO et al., 2005) é tida como resultado de distúrbio no desenvolvimento (BEASLEY et al., 2013), uma análise preliminar poderia levar a dois cenários. No primeiro, os níveis significativos de assimetria flutuante encontrados na maioria dos parâmetros morfológicos avaliados e em todas as linhagens poderia se dar por (i) estresses provenientes do cultivo em laboratório; (ii) o endocruzamento seria um estresse tão intenso e fortemente associado com assimetria flutuante que provocaria níveis significativos de FA em duas ou três gerações a partir do estabelecimento da isolinhagem.

Confrontando o primeiro cenário com evidências disponíveis na literatura — e abordadas na seção de introdução — poderíamos apontar como principais fatores que levariam a níveis significativos de FA: nutrição, temperatura, estresse hídrico, parasitismo, substâncias tóxicas, densidade populacional elevada. O método de criação das moscas foi empregado justamente com a preocupação de controlar esses fatores. Embora a câmara

incubadora não tenha controle automático sobre a umidade, foram utilizados equipamentos para avaliar esse parâmetro. Aliás, frequentemente adicionou-se solução de água e fermento nos frascos com a intenção de minimizar quaisquer distúrbios relacionados à falta de água e recurso nutricional. O parasitismo é o parâmetro mais plausível de estar relacionado aos níveis generalizados de assimetria flutuante, se a hipótese gerada pelo cenário (i) é real. Durante a manutenção das linhagens, notou-se a presença de ácaros nos frascos, o que é bastante comum em culturas de drosófilas. Os ácaros presentes em culturas de drosófilas podem atuar como vetores de transferência horizontal de elementos transponíveis (SASSI *et al.*, 2005), embora suas consequências no desenvolvimento não estejam totalmente desvendadas. Também é válido questionar qual é o papel do confinamento das moscas durante a criação na fonte da assimetria flutuante.

No segundo cenário seria possível imaginar um panorama onde o endocruzamento provoca instabilidade no desenvolvimento logo nas primeiras gerações provocando saltos no nível de assimetria e, nesse sentido, não encontraríamos diferença entre as diferentes categorias de endocruzamento devido ao acúmulo de genes deletérios que reduziriam o número de indivíduos que chegam na fase adulta em cada geração das linhagens mais antigas. Ainda, esperando que a assimetria na asa afete a capacidade de voo e ou o fitness do indivíduo, o nível de FA não poderia crescer irrestritamente porque níveis muito altos poderiam levar inclusive à inviabilidade do indivíduo. Por outro lado, essa hipótese é bastante especulativa, até porque indivíduos criados em laboratório não são tão dependentes da capacidade de voo quanto os indivíduos de populações naturais.

Em uma análise mais cuidadosa podem ser levantados outros cenários: (iii) as populações naturais apresentam níveis significativos de assimetria flutuante; (iv) o endocruzamento é menos importante para gerar assimetria flutuante do que outros fatores extrínsecos que foram, inclusive, controlados no experimento; (v) o endocruzamento

realmente torna as populações mais assimétricas, mas essa assimetria é mascarada por outros efeitos da endogamia (mesmo aqueles não relacionados à assimetria), que impediriam a constatação de níveis altos em indivíduos, que poderiam apresentar essa característica, mas não chegaram a fase adulta.

Acerca do cenário (iii), Costa et. al (2015) encontraram níveis significativos de assimetria flutuante em machos de populações naturais de *Drosophila antonietae* ao longo da distribuição geográfica da espécie. Esta evidência pode ser uma luz no entendimento dos resultados deste experimento, é dizer, a presença de assimetria flutuante em populações naturais poderia explicar a observação de assimetria flutuante em linhagens com poucas gerações, supostamente, de endocruzamento.

A partir dessa evidência temos ainda alguns caminhos: a) as populações naturais estão sofrendo perturbações provocando aumento dos níveis de assimetria; b) a assimetria flutuante significativa é uma característica natural dessas populações. Assumir o primeiro caminho implica dizer que algum fator de estresse importante ficou de fora do controle da criação em laboratório. Assumir o segundo caminho implica em questionar a qualidade da assimetria flutuante como indicador de perturbações extrínsecas. Qualquer um dos dois caminhos assumidos poderia levar a um questionamento da herdabilidade da assimetria flutuante, contrariando as evidências trazidas pela literatura e talvez até assumir um flerte entre assimetria flutuante e evolução. Embora, níveis de assimetria significativos em populações naturais expliquem os resultados para as linhagens 0A e 0B, não explicam o porquê de os níveis dessas linhagens não diferirem dos níveis de COR e ISC. Os cenários (iv) e (v) podem completar a explicação do cenário (iii).

Uma vez que parece razoável considerar que a hipótese proposta no cenário (iv) seja robusta, ISC e COR apresentariam apenas os níveis naturais de assimetria, ainda que significativos, uma vez que os outros fatores extrínsecos mais importantes foram

controlados pela padronização do cultivo. Se, por outro lado, a hipótese proposta no cenário (v) é um fato, uma alta taxa de mortalidade, baixa taxa de fecundidade, diferença do sucesso reprodutivo entre linhagens devem ser esperadas.

Pela experiência deste trabalho, a dificuldade em criar e alcançar o número de indivíduos necessários para a extração das asas foi mais elevada nas linhagens COR, e especialmente, na linhagem ISC. A linhagem ISC, que — talvez não — coincidentemente é a linhagem mais antiga, foi perdida nas duas primeiras tentativas de criação e na última tentativa alguns indivíduos adultos já mortos precisaram ser resgatados para a extração das asas, ao contrário das outras linhagens.

Uma outra possibilidade de cenário é que (vi) os níveis equiparados de FA entre as diferentes categorias de endocruzamento possam refletir, na verdade, a eficiência de mecanismos que atuam com tampões de estresses que provocam ruídos no desenvolvimento que possam afetar o fenótipo: canalização, plasticidade e estabilidade no desenvolvimento (DEBAT; DAVID, 2001). Assim, por mais que o endocruzamento tivesse potencial de aumentar os níveis de assimetria na população, esses níveis seriam estabilizados por esses mecanismos. Alternativamente pode-se imaginar um sétimo cenário no qual os resultados representam efeitos sinérgicos de alguns ou todos os cenários propostos.

Um questionamento que faço a partir desses resultados é se a significância da assimetria flutuante para todas as linhagens é de fato biológica ou sobretudo estatística. Quero dizer, é possível que ao fim e ao cabo essas flutuações nos tamanhos das asas entre os lados seja suficiente para produzir uma variação estatisticamente significativa, mas em uma escala biologicamente insignificante no que diz respeito à alterações na aptidão dos indivíduos.

5 CONCLUSÃO

Os resultados observados estão de acordo com a predição de fraca evidência de DA e AS nas linhagens, mas não estão de acordo com a predição de níveis mais altos de FA em linhagens sujeitas ao endocruzamento por maior tempo. Consequentemente esses resultados não evidenciam relação causal entre endocruzamento e assimetria flutuante para as 4 linhagens de *Drosophila willistoni* estudadas neste trabalho. No contexto tratado aqui, maior número de gerações sujeitas à endogamia não provoca aumento significativo nos níveis de assimetria flutuante.

REFERÊNCIAS

- ALIBERT, P.; BOLLACHE, L.; CORBERANT, D.; GUESDON, V.; CÉZILLY, F. Parasitic infection and developmental stability: fluctuating asymmetry in *Gammarus pulex* infected with two acanthocephalan species. **The Journal of parasitology**, v. 88, n. 1, p. 47–54, 2002.
- BEASLEY, D. A. E.; BONISOLI-ALQUATI, A.; MOUSSEAU, T. A. The use of fluctuating asymmetry as a measure of environmentally induced developmental instability: A meta-analysis. **Ecological Indicators**, v. 30, p. 218–226, 2013. Elsevier Ltd.
- BENÍTEZ, H. A.; LEMIC, D.; BAŽOK, R.; GALLARDO-ARAYA, C. M.; MIKAC, K. M. Evolutionary directional asymmetry and shape variation in *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae): An example using hind wings. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 111, n. 1, p. 110–118, 2014.
- BITNER-MATHÉ, B. C.; KLACZKO, L. B. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal and microgeographical variation. **Genetica**, v. 105, n. 1, p. 35–42, 1999.
- CAMPO, J. L.; GIL, M. G.; DÁVILA, S. G.; MUÑOZ, I. Estimation of heritability for Fluctuating Asymmetry in chickens by restricted maximum likelihood: Effects of Age and Sex. **Poultry Science**, v. 84, p. 1689–1697, 2005.
- CLARKE, G. M. The genetic basis of developmental stability: Relationships between stability, heterozygosity and genomic coadaptation. **Genetica**, v. 89, p. 15–23, 1993.
- COSTA, M. Marcelo costa padrões de assimetria ao longo da distribuição geográfica de *Drosophila antonietae*. 2008.
- COSTA, Marcelo; MATEUS, Rogério P.; MOURA, Mauricio O.. Constant fluctuating asymmetry but not directional asymmetry along the geographic distribution of *Drosophila antonietae* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. entomol.*, São Paulo , v. 59, n. 4, p. 337-342, Dec. 2015 .
- DEBAT, Vincent; DAVID, Patrice. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends in Ecology & Evolution* v. 16, n. 10, p. 555–561 , out. 2001.
- DONGEN, S. V. A. N.; SPRENGERS, E.; FSTEDT, È.; MATTHYSEN, E. Heritability of tibia fluctuating asymmetry and developmental instability in the winter moth (*Operophtera brumata* L.) (Lepidoptera, Geometridae). **Heredity**, v. 82, n. July 1998, p. 535–542, 1999.
- DROSOPHILA 12 GENOMES CONSORTIUM. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila phylogeny*. **Nature**, v. 450, p. 203–218, 2007.
- FOWLER, K.; WHITLOCK, M. C. Fluctuating asymmetry does not increase with moderate inbreeding in *Drosophila melanogaster* R-L. **Heredity**, v. 73, n. January, p. 373–376, 1994.
- GLAVIS-BLOOM, Justin; MUHAMMED, Maged; MYLONAKIS, Eleftherios. Of model hosts

and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. In: **Recent Advances on Model Hosts**. Springer New York, 2012. p. 11-17.

GONÇALVES, R. R.; MARE, R. A. DI. Biologia da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* Linnaeus (Lepidoptera, Yponomeutidae), sob condições controladas de temperatura, e parasitóides associados. Part III. Estudo sobre a biologia de *Apanteles piceotrichosus* (Blanchard) (Hymenoptera, Braco. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 806–809, 2005.

GOTTSCHALK, M. S.; HOFMANN, P. R. P.; VALENTE; S, VERA L. Diptera, Drosophilidae : historical occurrence in Brazil. **Check List**, v. 4, n. 4, p. 485–518, 2008.

GOMES, R. A. P. L. PROTOCOLO - Utilização de *Drosophila* em Genética: 1ª Parte. **Biologias**. n. 1, p. 4, 2011. Disponível em: <<http://www.ordemblogos/Biologias/N1.html>>.

GRAHAM, J. H.; RAZ, S.; HEL-OR, H.; NEVO, E. Fluctuating Asymmetry: Methods, Theory, and Applications. **Symmetry**, v. 2, n. 2, p. 466–540, 2010.

HARTL, D.L. ; CLARK, A.G. **Princípios de Genética De Populações**. 4ª Edição. Artmed: Porto Alegre, 2010.

HOFFMANN, A. A; COLLINS, E.; WOODS, R. Wing Shape and Wing Size Changes as Indicators of Environmental Stress in *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera : Noctuidae) Moths : Comparing Shifts in Means, Variances, and Asymmetries Wing Shape and Wing Size Changes as Indicators of Environmental St. **Entomological Society of America**, v. 31, n. 6, p. 965–971, 2002.

KLACZKO, L. B.; BITNER-MATHÉ, B. C. On the edge of a wing. **Nature**, v. 346, p. 321, 1990.

KLINGENBERG, C. P.; GRAHAM, J. H. Analyzing Fluctuating Asymmetry with Geometric Morphometrics: Concepts, Methods, and Applications. **Symmetry**, v. 7, p. 843–934, 2015.

KLINGENBERG, C. P.; MCINTYRE, G. S.; ZAKLAN, S. D. Left-right asymmetry of fly wings and the evolution of body axes. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 265, n. February, p. 1255–1259, 1998.

LENS, L.; DONGEN, S. VAN; WILDER, C. M.; BROOKS, T. M.; MATTHYSEN, E. Fluctuating asymmetry increases with habitat disturbance in seven bird species of a fragmented afro-tropical forest. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 266, n. 1425, p. 1241, 1999.

MARKOW, T. A.; MARTIN, J. F. Inbreeding and developmental stability in a small human population. **Annals of Human Biology**, v. 4460, n. December, 2009.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. M. **Drosophila: A guide to species identification and use**. San Diego, California: Academic Press Elsevier, 2006.

MCLACHLAN, A. J. Fluctuating Asymmetry in Flies, What Does It Mean? **Symmetry**, v. 2,

n. 2, p. 1099–1107, 2010.

NASCIMENTO, S. M. DO. **Efeitos da fragmentação de habitats em populações vegetais**, 2007. Universidade Estadual de Campinas.

PALMER, A. R. Fluctuating asymmetry analyses: A primer. **Developmental instability: Its origins and evolutionary implications**, v. 93, p. 335–364, 1994.

PALMER, A.; STROBECK, C. Fluctuating Asymmetry Analyses Revisited. **Developmental Instability (DI): Causes and Consequences**, v. 2001, p. 279–319, 2003.

PÉLABON, C.; HANSEN, T. F. On the Adaptive Accuracy of Directional Asymmetry. , p. 2855–2867, 2008.

PINTO, N. S.; SILVA, D. P.; RODRIGUES, J. G.; MARCO, P. DE. The Size But not the Symmetry of the Wings of *Eulaema nigrita* Lepeletier (Apidae: Euglossini) is Affected by Human-Disturbed Landscapes in the Brazilian Cerrado Savanna. **Neotropical Entomology**, v. 44, n. 5, p. 439–447, 2015.

PIRES, A. S.; FERNANDEZ, F. A. S.; BARROS, C. S. Vivendo em um Mundo em Pedacos: Efeitos da Fragmentação Florestal sobre Comunidades e Populações Animais. **Essências em Biologia da Conservação**. p.231–260, 2006.

PITHER, J.; TAYLOR, P. D. Directional and fluctuating asymmetry in the black-winged damselfly *Calopteryx maculata* (Beauvois) (Odonata: Calopterygidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 78, n. 10, p. 1740–1748, 2000.

POWELL, J. R. **Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila Model**. 1997.

RIBEIRO, B.; GUEDES, R. N. C.; CORRÊA, A. S.; SANTOS, C. T. Fluctuating asymmetry in insecticide-resistant and insecticide-susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 77–83, 2007.

RIDLEY, Mark. **Evolução**. 3ª Edição. Artmed: Porto Alegre, 2006.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. **Fundamentos em Ecologia**. 3ª Edição. Artmed: Porto Alegre, 2010.

ROULSTON, T. H.; CANE, J. H. The Effect of Diet Breadth and Nesting Ecology on Body Size Variation in Bees (Apiformes). **The Kansas Entomological Society**, v. 73, n. 3, p. 129–142, 2000.

SANSEVERINO, A. M.; NESSIMIAN, J. L. Assimetria Flutuante em Organismos Aquáticos e sua aplicação para avaliação de impactos ambientais. **Oecol. Bras.**, v. 12, n. 3, p. 382–405, 2008.

SARRE, S. Habitat fragmentation promotes fluctuating asymmetry but not morphological divergence in two geckos. **Researches on Population Ecology**, v. 38, n. 1, p. 57–64, 1996.

- SASSI, Adriana Koslovski *et al.* Transposable elements P and gypsy in natural populations of *Drosophila willistoni*. **Genetics and Molecular Biology** v. 28, n. 4, p. 734–739, dez. 2005.
- SILVA, M. C.; LOMÔNACO, C.; AUGUSTO, S. C.; KERR, W. E. Climatic and anthropic influence on size and fluctuating asymmetry of Euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in a semideciduous seasonal forest reserve. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 8, n. 2, p. 730–737, 2009.
- STURTEVANT, A. H. Notes on North American Drosophilidae with descriptions of twenty-three new species. **Annals of the Entomological Society of America**, v. IX, p. 323–343, 1916.
- TOMKINS, J. L.; KOTIAHO, J. S. Fluctuating Asymmetry. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–5, 2001.
- VALEN, L. VAN. A study of Fluctuating Asymmetry. **Evolution**, v. 16, n. 2, p. 125–142, 1962.
- WEYL, H. Symmetry. **Princeton University Press**, 1952.
- WOLPERT, Lewis. **Princípios em Biologia do Desenvolvimento**. 3ª Edição. Artmed: Porto Alegre, 2008.
- WOODS, R. E.; HERCUS, M. J.; HOFFMANN, A. R. Y. A. Estimating the heritability of Fluctuating Asymmetry in field *Drosophila*. **Evolution**, v. 52, n. 3, p. 816–824, 1998.