

Universidade Estadual de Campinas



Carlos Alberto da Conceição Andrade

**Evolução da Genitália Masculina em
*Drosophila mediopunctata***

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Carlos Alberto da Conceição Andrade e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese a ser apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko.

Orientador: Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko

Campinas, SP

2006

UNIDADE BC
 Nº CHAMADA AN24e UNICAMP
 V _____ EX _____
 TOMBO BC/ 68963
 PROC. 16.123-06
 C D
 PREÇO 11,00
 DATA 12/06/06

lib-id 383911

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

An24e Andrade, Carlos Alberto da Conceição
 Evolução da genitália masculina em *Drosophila mediopunctata* / Carlos Alberto da Conceição Andrade. --
 Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Louis Bernard Klaczko.
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
 Campinas, Instituto de Biologia.

1. Drosófila. 2. Hereditariedade. 3. Pênis. 4.
 Asas. 5. Biometria. I. Kaczko, Louis Bernard. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
 Biologia. III. Título.

Título em inglês: Evolution of the male genitalia in *Drosophila mediopunctata*.

Palavras-chave em inglês: Drosophila; Heredity; Penis; Wings; Biometrics.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Louis Bernard Klaczko, Rosana Tidon, Sérgio Furtado dos Reis, Vera Nisaka Solferini, Fábio de Melo Sene.

Data da defesa: 08/02/2006.


DATA DE DEFESA: 15/02/2006

Banca Examinadora

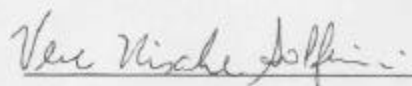
Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko (Orientador)



Profa. Dra. Rosana Tidon



Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini



Prof. Dr. Fábio de Melo Sene

Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis



Prof. Dr. Alexandre Afrânio Peixoto



Prof. Dr. Ângelo Pires do Prado

Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

A minha companheira, Ana Maria, e a meus filhos, Tobias,
Esther e Eduardo; e a meus pais, Rita e Francisco

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Louis Bernard Klaczko por vários motivos. Como se não bastassem sua competência e amizade, devo reconhecer que ele é daqueles que deixa o sol brilhar para todos (“*Sol lucet omnibus*”). Com a idade acima de 40 anos, o Prof. Louis não só me aceitou, como também se mostrou bastante preocupado com minha formação. Aprendi com ele, devagar, um pouco de cada assunto. Confesso que minha gratidão é pouca para quem mais me apoiou nesta jornada.

A Galina Ananina, Horácio Montenegro, Hermes Medeiros, Luciane Hatadani e Roberto Vieira pelas sugestões valiosas e, sobretudo, companheirismo.

Luciana Araripe participou com debates temperados sobre morfometria geométrica.

Felipe, Laura e Marcos representam a nova geração. É com a presença dos mais jovens que nossas vidas rejuvenescem. Eles sempre me encheram de ânimo e coragem.

Meus sinceros agradecimentos a Wilma, Salete, Sandra e Laércio pela forma com que me trataram: de maneira educada, fraterna e profissional.

A Eliane e Andrea Klaczko pela maneira cordial, hospitaleira e carinhosa. Nunca fui tão bem recebido e tratado longe de minha família.

Ana Branco, minha companheira, apoiou-me em todos os momentos. Não sei como lhe pagar os momentos que deixamos de passar juntos.

Aos Profs. Sérgio Furtado dos Reis e Leandro Rabello Monteiro pelo ensinamento avançado em morfometria geométrica.

Aos Profs. Alexandre Afrânio Peixoto e Blanche Christine Bitner-Mathé pelo apoio principalmente na fase de pré-banca.

A Profa. Vera Nisaka Solferini pelas sugestões e correções que contribuíram sobremaneira para o aprimoramento da tese.

Por fim, um agradecimento especial vai para meus pais. Embora extremamente humildes tiveram a lucidez de me deixar em uma escola com pessoas dignas e responsáveis que sempre me enalteceram. O que dizer destas pessoas pensadoras, amantes da educação?

Esta obra teve o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa da UNICAMP (FAEP-UNICAMP) e a Fundação para o Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). O Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense e o Programa Institucional de Capacitação de Docentes e Técnica (PICDT) me apoiaram e concederam afastamento integral necessário para me qualificar.

ÍNDICE

Agradecimentos	iv
Índice	vi
Resumo	vii
Summary	ix
1. Introdução	
1.1. A genitália intromitente como caráter diagnóstico	1
1.2. Evolução da genitália intromitente	2
1.3. Morfometria	3
1.4. Herdabilidade	5
1.5. Plasticidade Fenotípica	6
1.6. Objetivos	8
2. Padronização das técnicas	
2.1. Dissecção e montagem	9
2.2. Escolha da posição para tomada das medidas	9
2.3. Uma digressão: o porquê da repetibilidade	10
2.4. Obtenção dos dados e repetibilidade	12
2.5. Organização da Tese	14
3. “Phenotypic plasticity of the aedeagus of <i>Drosophila mediopunctata</i>: Effect of the temperature”	15
4. “Evolution of the male genitalia: morphological variation of the aedeagi in a natural population of <i>Drosophila mediopunctata</i>”	22
5. Conclusões	52
6. Referências bibliográficas	54

RESUMO

O tamanho e forma do edeago de *Drosophila mediopunctata* foram estudados a partir de moscas oriundas de duas coletas realizadas numa população natural na Mata Santa Genebra, Campinas, SP.

A metodologia empregada em todo o trabalho consistiu na elaboração de dois desenhos para o edeago de cada espécime. A seguir, foram estimadas as médias e as configurações consensos para cada par de desenhos, que foram utilizadas, respectivamente, em análises estatísticas univariadas e de morfometria geométrica. Esta metodologia permitiu obter resultados consistentes e confiáveis para analisar o tamanho e forma do edeago.

Em primeiro lugar, investigamos a plasticidade fenotípica do edeago de *D. mediopunctata*, verificando como ele varia quando as moscas são criadas em duas temperaturas diferentes. O resultado obtido mostrou diferenças de tamanho e forma nestas duas condições experimentais: moscas criadas a 16.5°C tiveram os edeagos maiores do que as criadas a 20°C; uma área no edeago (apical) foi responsável pela maior parte da variação em forma.

Em segundo lugar, comparamos a variação fenotípica do edeago com a da asa, estudada simultaneamente nos mesmos animais, os quais vieram diretamente do campo ou foram criados no laboratório; bem como a herdabilidade natural e no laboratório. A asa foi empregada como um sistema de referência para a variação de tamanho e forma do corpo; e, também, analisada com estatísticas univariadas e de morfometria geométrica. Para medidas lineares foram encontrados: coeficientes de variação, em média, maiores no edeago do que na asa entre os animais criados no laboratório; enquanto que nos animais vindos diretamente do campo não houve diferença significativa. Além disto, foram calculadas as correlações fenotípicas entre medidas dos dois órgãos.

A partir de moscas oriundas do campo e laboratório detectamos herdabilidades significativas para medidas lineares do edeago. Com relação à asa identificamos apenas um traço com herdabilidade natural significativa, ao passo que no laboratório seis traços mostraram valores significativos.

Nossa investigação capturou a herdabilidade “natural” para a forma da asa e variação para a forma do edeago. Contudo, valores significativos para tamanho do centróide e para o componente uniforme de ambas estruturas só foram encontrados para as estimativas de herdabilidade no laboratório.

Outros dados pertinentes foram: primeiro, correlação significativa e positiva entre os tamanhos do centróide do edeago e asa; segundo, o tamanho do centróide do edeago mostrou poucas correlações com a forma da asa; terceiro, muitas correlações fenotípicas foram encontradas entre ambas estruturas, embora não consistentes.

Nossos dados foram discutidos com relação a três hipóteses centrais (chave-e-fechadura, pleiotropia e seleção sexual) que tentam explicar a evolução da genitália masculina. Nossos resultados não apóiam a hipótese chave-e-fechadura, mas não nos permitem refutar as hipóteses da pleiotropia e seleção sexual. Embora este estudo tenha se concentrado exclusivamente no órgão intromitente, é recomendável analisar a contrapartida na genitália feminina.

SUMMARY

The size and shape of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*, obtained from two collections of a natural population in Mata Santa Genebra, were analyzed in this study.

The methodology applied in all of the study consisted in making two drawings for each aedeagus of each specimen. Next, the averages or consensus configurations were estimated for each pair of drawings. These figures were used in univariate statistical analysis and in geometric morphometrics. This methodology resulted in consistent and reliable results to analyze the size and shape of the aedeagus.

Firstly, we investigated the phenotypic plasticity of the aedeagus of *D. mediopunctata*, observing how it varies when the flies are reared in two different temperatures. The result obtained showed differences in size and shape in these two experimental conditions: flies reared at 16.5°C had larger aedeagus than those reared at 20°C; one area of the aedeagus (apical) accounted for most of the shape variation.

Secondly, we compared the phenotypic variation of the aedeagus with the wing, studied simultaneously in the same flies which came directly from the field or were raised in the laboratory. The natural and laboratory heritability were also compared. For linear measures, the following was found: the coefficients of variation, in average, were higher in the aedeagus than in the wing. Furthermore, the phenotypic correlations between the two organs were calculated. The wing was also analyzed with univariate statistics and geometric morphometrics to provide a reference system for variation of size and shape.

From field and laboratory flies, we detected significant heritabilities for linear measures of the aedeagus: five for the first and six for the second. Regarding the wing, we identified only one trait with natural heritability, whereas for the laboratory, six traits were found.

Our investigation captured the natural heritability for the shape of the wing and the variation of the shape of the aedeagus. Significant data for centroid size and for the uniform component of both structures were found for the estimates of heritability in the laboratory.

Other pertinent data were: first, significant and positive correlation between the centroid sizes of the aedeagus and the wing; second, the size of the centroid of the aedeagus showed few correlations with the shape of the wing; third, many phenotypic correlations were found between both structures, although not consistent.

Our data was discussed with relation to three main hypotheses (lock-and-key, pleiotropy, and sexual selection) which attempt to explain the evolution of male genitalia. Our results allow us to refute the lock-and-key hypothesis, but not the hypotheses of pleiotropy and sexual selection. Although this study concentrated exclusively on the intromittent organ, further verification of the counterpart in the female genitalia is necessary.

1. INTRODUÇÃO

A descrição e a explicação da variação individual são um tema central em biologia evolutiva. Quando esta variação está presente dentro de uma população, ela pode sofrer os efeitos das forças evolutivas. No entanto, somente a variação herdável responde à seleção.

O escrutínio da variação dentro de uma população pode ser iniciado, portanto, ao isolar um órgão ou traço na tentativa de descrever com precisão seu tamanho e forma. Essa é uma condição necessária para estimar o número e o significado funcional dos genes que controlam o órgão ou traço (Kulikov *et al.*, 2004). Assim, o ponto de partida deve ser medir e caracterizar a variabilidade de um órgão ou traço em uma população, procurando pormenores em sua estrutura que indicam uma possível direção de mudança. Os passos seguintes são: caracterizar sua herdabilidade, verificar se há diferenças entre populações e os fatores ou variáveis ambientais que influenciam a variação encontrada. Além disso, é preciso buscar ou, se possível, apontar quais são as forças evolutivas responsáveis por suas mudanças.

1.1. A genitália intromitente como caráter diagnóstico

A genitália masculina de *Drosophila* é formada por um conjunto de apêndices (*e.g.* edeago, hipândrio e arcos genitais). O estudo comparativo desses apêndices facilita bastante ao sistemata estabelecer relações entre grupo de espécies (Breuer & Pavan, 1950, 1954).

A grande diferenciação encontrada nos apêndices da genitália masculina das moscas nem sempre é acompanhada por igual diferenciação na morfologia do restante do corpo. Para exemplificar há, em diversos grupos do gênero *Drosophila*, espécies que compartilham morfologia semelhante, sendo muitas vezes necessário fazer uso de caracteres da genitália masculina – principalmente o edeago e o arco genital – a fim de distingui-las. Isto pode ser visto em vários grupos, tais como: *tripunctata*, *willistoni*, *repleta* e *melanogaster*. Silva & Sene (1991) destacaram que, se existe variação geográfica com relação ao edeago, isto pode representar o

início de um processo de diferenciação interpopulacional, o qual pode até culminar em especiação, ainda que não obrigatoriamente.

1.2. Evolução da genitália intromitente

A evolução rápida e divergente da genitália masculina é um dos padrões mais gerais de diversificação morfológica em animais com fertilização interna (Eberhard, 1990, 1993, 2001; Arnqvist, 1997; House & Simmons, 2005; Huber *et al.*, 2005). Todavia, as causas desta tendência evolutiva são pouco conhecidas (Arnqvist, 1997; Arnqvist & Thornhill, 1998). Para explicar a evolução da genitália masculina foram aventadas algumas hipóteses: chave-e-fechadura (veja revisão em Scudder, 1971; Shapiro & Porter, 1989; Arnqvist, 1997), pleiotropia (Mayr, 1963) e seleção sexual (Eberhard, 1990; Rowe *et al.*, 1994; Arnqvist, 1997; Arnqvist & Thornhill, 1998).

A hipótese chave-e-fechadura postula que o isolamento mecânico (pré-zigótico) seleciona uma dada genitália masculina (a chave) que se ajusta precisamente à genitália feminina (a fechadura). Este ajuste impediria a produção de progênie híbrida de qualidade inferior, em outras palavras, diferenças em morfologia da genitália são importantes para manter o isolamento reprodutivo entre espécies morfológicamente similares (Sota & Kubota, 1998; Tatsuta *et al.*, 2001; Horton & Lewis, 2005).

A hipótese pleiotrópica, por outro lado, postula que traços da genitália evoluem de uma maneira neutra. Como os traços da genitália e outros da morfologia geral estão correlacionados, efeitos pleiotrópicos de um ou mais genes, que ocorrem durante o período de divergência, podem ocasionar mudanças simultâneas em diversos traços, inclusive aqueles relacionados com a genitália de ambos os sexos (Mayr, 1963).

Recentemente alguns autores vêm criticando duramente a hipótese chave-e-fechadura (Eberhard, 1990, 1993, 2001; Eberhard & Ramirez, 2004; Arnqvist & Thornhill, 1998) e, em menor grau, a hipótese da pleiotropia. Por outro lado, estes mesmos autores vêm priorizando

investigações em favor da hipótese de seleção sexual. Eberhard (1990) aponta que as estruturas da genitália masculina desempenham um papel essencial na corte ao estimular a fêmea durante a copulação. Como o mecanismo de seleção sexual é bastante amplo, ele tem sido desdobrado em diversas hipóteses menores. Por exemplo, Hosken & Stockley (2004) citam vários mecanismos de seleção sexual envolvidos com a evolução da genitália masculina, por exemplo: seleção Fisheriana ou “runaway”, competição por esperma e conflito sexual.

1.3. Morfometria

D’Arcy W. Thompson publicou em 1917 um tratado sobre crescimento e forma. Embora ele tenha apresentado várias figuras mostrando mudanças na forma, na verdade, ele não usou qualquer método matemático rigoroso para descrevê-las (Reyment, 1991, 1996). Este trabalho, no entanto, foi uma das bases para a construção da morfometria, cujos idealizadores (Bookstein *et al.*, 1985) se basearam no uso de “landmarks” (pontos de referência), rede de treliças e estatísticas multivariadas, processando os dados em computadores.

Bookstein (1978) definiu pontos de referência como pontos especiais, os quais têm definições anatômicas seguras e são consistentes com regras de homologia. Já Reyment (1991) assinalou que estes pontos não definem a forma de qualquer contorno ou superfície, mas simplesmente fornecem pontos fixos, de referência. Como as medições entre tais pontos geram distâncias, Strauss & Bookstein (1982) propuseram a rede de treliça, um método para caracterizar o tamanho e a forma de um órgão. Ela consiste na identificação dos pontos de referência, e construção de quadriláteros contíguos que contêm duas diagonais internas. Este é um método apropriado para abstrair o tamanho e a forma de um órgão qualquer, já que são tomadas medidas lineares em todas as direções (Bookstein *et al.*, 1985).

Em sentido menos formal, a morfometria pode ser entendida como uma área da pesquisa cuja fronteira reside entre a biologia, a estatística e a geometria, mas rigorosamente é definida

como “o estudo estatístico da covariância entre mudanças de forma e fatores causais” (Bookstein, 1991).

De posse de medidas lineares, várias análises estatísticas multivariadas são possíveis. Rohlf & Marcus (1993) revisaram as que são de interesse para os estudos do tamanho e da forma. Por exemplo, a análise dos componentes principais é um método que reduz a dimensão de uma matriz de covariâncias entre caracteres morfométricos dos organismos em estudo, concentrando a maior parte da variação da matriz original nos primeiros componentes principais (CP1, CP2 e CP3). Nesta análise o primeiro componente é normalmente interpretado como um componente que representa a variável latente tamanho, desde que ele apresente correlações positivas com cada uma das variáveis medidas. Os demais componentes são interpretados como indicadores da forma do organismo ou do órgão, ao exibirem contraste entre diferentes medidas (Neff & Marcus, 1980; Reis, 1988; Reis *et al.*, 1987; Bitner-Mathé *et al.*, 1995; Monteiro, 1997). A morfometria “tradicional” – baseada em distâncias entre os pontos de referência - ainda é uma metodologia poderosa capaz de trazer análises e interpretações novas para problemas biológicos importantes (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999b; Parsons *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2004).

Novos métodos estatísticos projetados para descrever a variação bi e tridimensional na forma de estruturas biológicas, entre espécimes, abriram possibilidades novas para trabalhar com morfologias complexas. Estes métodos multivariados potencialmente fornecem muito mais medidas integrativas e sintéticas da variação morfológica do que as medidas lineares tradicionais (Arnqvist & Thornhill, 1998). Pode-se destacar sobretudo a morfometria geométrica considerada uma verdadeira revolução por Rohlf & Marcus (1993). Esta nova morfometria é baseada principalmente na geometria da forma, ao empregar pontos anatômicos em vez de medidas lineares, como se faz em morfometria tradicional. Inicialmente os dados são extraídos sob a forma de coordenadas cartesianas bi ou tridimensionais dos pontos de referência de um objeto.

Em seguida, a análise remove a variação de tamanho antes da análise da forma (Parsons *et al.*, 2003; Klingenberg *et al.*, 2003). A forma é a informação geométrica de um objeto que se mostra invariante à translação, rotação e escalonamento (Bookstein, 1991; Monteiro-Filho *et al.*, 2002). É a partir das coordenadas da forma que as análises das estatísticas multivariadas podem ser empregadas.

Para visualizar as diferenças entre os objetos ou estruturas biológicas, faz-se uso de grades de deformação produzidas a partir da técnica de interpolação “thin-plate spline (TPS)”. Na verdade, estas grades de deformação representam a reformulação matemática das idéias de D’Arcy Thompson (1917), que visualizava as formas biológicas como distorções de um sistema de coordenadas cartesianas.

1.4. Herdabilidade

A variabilidade de um determinado caráter depende de genes dispersos pelo genoma e muitas vezes com efeitos diminutos. A contribuição relativa dos genes para um dado traço é de grande interesse no melhoramento genético de plantas e animais e também em evolução. A evolução de caracteres quantitativos no campo pode ser prevista a partir do conhecimento de parâmetros genéticos e de seleção (Falconer & Mackay, 1996).

Várias medidas se empregam para quantificar a herança desses caracteres. Uma delas é a herdabilidade, que pode ser entendida como a razão da variância genética aditiva pela variância fenotípica. A herdabilidade descreve o grau de semelhança fenotípica entre aparentados devido a causas genéticas. Deve-se notar, ainda, que a resposta à seleção é diretamente proporcional à herdabilidade. Quando a herdabilidade é alta para um dado traço, a seleção pode ser efetiva. Contudo, se ela é baixa a seleção sobre o traço não é uma abordagem promissora. A estimativa da herdabilidade é específica para a população e o ambiente em que se está analisando. Além disso, ela é um parâmetro populacional, não individual (Falconer & Mackay, 1996).

A importância da herdabilidade pode ser percebida quando comparamos as três hipóteses que lidam com a evolução da genitália, as quais têm pressupostos diferentes quanto ao tipo de seleção agindo sobre um traço. Por exemplo, na hipótese de seleção sexual é a seleção direcional o agente que promove mudanças sobre o traço, cuja ação pode eliminar rapidamente a variância genética aditiva, fixando o traço. Entretanto, na prática, há muitos caracteres que estão sob o efeito de seleção sexual forte, mas que ainda exibem considerável herdabilidade (Pomiankowski & Moller, 1995).

1.5. Plasticidade Fenotípica

O fenótipo é o produto do genótipo e do ambiente e é também o foco da seleção natural. Já a plasticidade fenotípica pode ser compreendida como a capacidade de um dado genótipo em produzir mais de um fenótipo em morfologia, fisiologia e comportamento em resposta às condições ambientais (West-Eberhard, 1989). Outras conceituações e abordagens deste fenômeno podem ser encontradas em Via & Lande (1985), Thomas & Barker (1993), Pigliucci & Schlichting (1996) e Debat & David (2001).

Plasticidade fenotípica, canalização e estabilidade do desenvolvimento são termos relacionados. Estes três processos estão envolvidos no controle da variabilidade fenotípica (Debat & David, 2001). Plasticidade fenotípica é um termo intimamente próximo de norma de reação (Pigliucci, 1996). A norma de reação é representada como uma linha ou curva sobre um gráfico que exhibe fenótipos contra um fator ambiental para cada genótipo, clone ou família (Gothard & Nylin, 1995; Pigliucci, 1996). A natureza genética das normas de reação, e como elas evoluem, é controversa e provoca bastante discussão (Turelli *et al.*, 1988; Gottard & Nylin, 1995; Bitner-Mathé & Klaczko, 1999a).

A plasticidade fenotípica pode ser um mecanismo para que uma dada espécie enfrente a variação ambiental. Por isto é de importância crucial compreender a plasticidade fenotípica de

qualquer traço sob investigação (Noach *et al.*, 1997). Para exemplificar, no peixe *Brachyrhaphis episcopi*, examinado por Jennions & Kelly (2002), o comprimento do gonopódio – o órgão intromitente - varia geograficamente e está associado ao tipo de predador. Tudo indica que diferenças genéticas não são requeridas num cenário adaptativo do órgão intromitente, porque a variação da população pode ocorrer em função da plasticidade fenotípica adaptativa.

Em *Drosophila* vários trabalhos que tratam de plasticidade estão concentrados em caracteres morfológicos como o tamanho ou forma da asa (Noach *et al.*, 1997; de Moed *et al.*, 1997; Bitner-Mathé & Klaczko, 1999a; Hoffmann *et al.*, 2005) e tamanho do tórax (Thomas & Barker, 1993; Partridge *et al.*, 1994). Estes traços, de certo modo, mostram associações com componentes do valor adaptativo.

Até agora, nenhum trabalho a respeito de plasticidade foi feito com relação à genitália masculina de *Drosophila*. Uma questão fundamental é saber o quanto e onde o edeago pode variar e, a partir daí, verificar a contrapartida da genitália feminina. Portanto, estudos sobre plasticidade fenotípica do edeago podem ajudar a esclarecer como ele reage não só às variáveis ambientais, mas também à genitália feminina. Ademais, diferentes previsões quanto à plasticidade do edeago podem ser avaliadas, permitindo que as diferentes hipóteses sobre a morfologia da genitália masculina sejam melhor contrastadas. A hipótese chave-e-fechadura prevê pouca plasticidade fenotípica para o órgão, enquanto que a hipótese de pleiotropia admite forte plasticidade. Já para a hipótese de seleção sexual a plasticidade esperada dependeria do modelo de seleção adotado (Arnqvist, 1997).

1.6. Objetivos

O propósito deste trabalho é testar alguns pressupostos essenciais a fim de refutar ou apoiar as hipóteses que lidam com a evolução da genitália masculina de *Drosophila mediopunctata*. Ele também investiga a variação morfológica dos edeagos. Especificamente, os objetivos são:

1. examinar como tamanho e forma do edeago de *Drosophila mediopunctata* se comportam em relação ao efeito de temperatura;
2. caracterizar a variabilidade intrapopulacional dos edeagos e asas, com relação a tamanho e forma, na população da Mata Santa Genebra (Campinas, SP);
3. estimar a herdabilidade natural e no laboratório para medidas lineares, tamanho do centróide e forma do edeago;
4. contrastar os resultados de variação e herdabilidade obtidos para o edeago com dados respectivos da asa;
5. investigar possíveis correlações entre parâmetros do edeago e da asa.

2. PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS

2.1. Dissecção e montagem

A ponta do abdômen (*terminalia*) de cada macho foi extraída com microagulha e transferida para tubinho de vidro com KOH. Após aquecimento por 5 min em KOH, cada peça foi transferida para solução aquecida álcool-ácido acético (15 min). Em seguida, os edeagos foram deixados durante 12h, no mínimo, no corante diluído de Gage. Cada *terminalia* foi transferida para uma lâmina escavada contendo fenol, que ajuda a tirar o excesso de corante. Após passar para o creosoto o edeago foi separado dos demais apêndices, sendo imediatamente introduzido em uma gotícula de bálsamo do Canadá, deixada no centro de uma lâmina. Em torno de cada edeago foram colocados ao seu redor quatro fragmentos de lamínulas. Em seguida, depositou-se uma lamínula sobre ele. As lâminas preparadas foram deixadas horizontalmente sobre tábuas até que o bálsamo endurecesse (para mais pormenores veja Wheeler & Kambysellis, 1966).

2.2. Escolha da posição para tomada das medidas

O edeago é uma estrutura tridimensional, complexa e muito pequena. Devido a sua morfologia rígida é possível, mediante toques suaves na lamínula, posicioná-lo em vista lateral ou frontal. No entanto, correções da posição devem ser feitas cuidadosamente, uma vez que o edeago se desloca no bálsamo, pois ele não tem pontos de apoio. Somado a este problema, não há pontos de referência verdadeiros no órgão.

Assim, num experimento preliminar, utilizando outro material (veja abaixo) para escolher as medidas e a melhor posição para análise, testamos a repetibilidade de medidas lineares tomadas a partir das posições ventral e lateral. Foram feitos 3 desenhos para cada um de um total de 60 animais. Os desenhos de cada espécime foram produzidos em intervalos de pelo menos um mês, com cada espécime sendo tirado de sua posição e recolocado de volta. Calculou-se a

repetibilidade (coeficiente de correlação intraclasse – r_i) de cada traço do edeago em vistas lateral e frontal, com uma análise de variância de um fator (Lessels & Boag, 1987). Verificou-se que a posição lateral do edeago era inadequada, na medida em que a repetibilidade das medidas revelou-se baixa (todas menores que 0,26). Por isto esta abordagem foi descartada. Por outro lado, para a vista frontal várias medidas apresentaram repetibilidade alta (de um total de 45 medidas), por isso selecionamos um conjunto delas que representam duas treliças sobrepostas (veja abaixo), para as quais todas as repetibilidades estimadas foram maiores que 65%. A partir destas estimativas o trabalho pôde avançar.

2.3. Uma digressão: o porquê da repetibilidade

Lessels & Boarg (1987) chamaram a atenção para a importância crucial que a estimativa da repetibilidade tem em trabalhos experimentais. Além disto mostraram que a fórmula dada por Falconer (1981) e utilizada em muitos trabalhos está equivocada. Na verdade só recentemente é que se passou a dar maior ênfase a esta estimativa como um padrão de confiabilidade nos resultados experimentais obtidos.

Um bom exemplo da abordagem tradicional é o trabalho de Andrade (2001), que caracterizou a morfologia da asa e do edeago de *Drosophila mediopunctata* por meio da análise dos componentes principais, a partir de duas populações ($n_1= 60$ machos; $n_2= 52$ machos) coletadas na Serra do Japi. Na asa, os primeiros três componentes principais explicaram 95,3% da variação total. Duas fontes de variação foram caracterizadas: tamanho (CP1) foi responsável por 80,6% e forma (os demais vetores) por 19,4%. Já para o edeago, o tamanho explicou apenas 19,2%, estava representado pela variável latente CP2, e os 80,8% restantes foram devidos à forma; com os 3 primeiros CPs explicando 57,3% da variação total.

Estes resultados suscitavam interesse e curiosidade, pois, normalmente em trabalhos de morfometria, o primeiro componente principal representa tamanho. Curiosamente, ao rever a

literatura, verificou-se que um dos poucos trabalhos, senão o único, que mostrava um padrão semelhante ao do edeago de *Drosophila* foi o de Reyment (1991), o qual apresentou um resultado inusitado no foraminífero *Brizalina mandoroveensis* com relação às propriedades multivariadas de várias amostras por meio dos padrões expostos pelos componentes principais (CP). Em uma das amostras o autor encontrou que o CP2, representando tamanho, foi responsável por apenas 26,5% da variação total, ao passo que o CP1, neste caso representando forma, ficou com 68,3%.

Em nenhum momento o trabalho de Reyment (1991) mencionou o cálculo da repetibilidade, embora os pontos de referência fossem dos tipos 2 e 3 na terminologia de Bookstein (1991), mas veja também Andrade *et al.* (2005). Isso talvez explique a concordância com o trabalho de Andrade (2001) – que, também, não estimou a repetibilidade – na inversão dos componentes principais.

Com resultados tão díspares de outros com morfologia, e com pontos de referência de baixa consistência, não restou outra alternativa a não ser refazer novos desenhos a partir das duas populações da Serra do Japi. Agora, em vez de um desenho, elaboraram-se três de uma amostra aleatória de 60 espécimes da população da Serra do Japi (veja acima para mais informações). As estimativas da repetibilidade para a maioria das distâncias lineares do edeago em vista lateral foram muito baixas, mostrando a baixa confiabilidade dos dados e a importância crucial desta estatística que deve ser levada sempre em consideração.

Desta forma, outras populações (Fazenda Barreiro Rico, Mata Santa Genebra, Morro do Japi e Atibaia), que estavam prontas para ser analisadas, foram deixadas de lado, em função da limitação de tempo estipulado para a execução do doutorado. Deve-se ressaltar, no entanto, que amostras dos edeagos destas populações foram desenhadas em posição lateral, mas tais desenhos não foram usados neste trabalho. Contudo, o material referente às quatro populações já está preparado para o exame em vista ventral.

Como estudo exploratório, resolveu-se concentrar a pesquisa, a princípio, em uma única população. Sem dúvida, muitas das questões fundamentais em genética evolutiva e de populações são iniciadas pelo estudo da variabilidade intrapopulacional. A meta a ser perseguida, portanto, dependia inteiramente da medição de outro posicionamento do órgão e também da elaboração mais refinada de novos desenhos. Este estágio da técnica só se tornou possível após a preparação de dezenas de desenhos dos edeagos. De qualquer modo, ficou postergada a possibilidade de caracterizar a variação do edeago entre populações de *D. mediopunctata*.

2.4. Obtenção dos dados e repetibilidade

Depois de colocar cuidadosamente os edeagos em posição ventral, fizemos o desenho de seus contornos usando uma *camera lucida* conectada a um microscópio ótico Zeiss. Para o trabalho “Phenotypic Plasticity of the Aedeagus of *Drosophila mediopunctata*: Effect of the Temperature” (2005), tendo em vista as fontes de erro mencionadas acima e com o objetivo de aumentar a precisão das medidas, cada um dos 110 espécimes foi desenhado duas vezes, com intervalo de pelo menos um mês, quando as peças foram recolocadas em posição. A concordância dos desenhos foi examinada visualmente antes de tomar as medidas. Em apenas três casos, dentre 110 espécimes desenhados, houve discordância evidente. Para estes um terceiro desenho foi preparado de forma totalmente independente, sendo a seguir comparado aos desenhos anteriores, e o desenho discordante foi descartado. Os dois desenhos de cada edeago foram "escaneados" e armazenados como arquivos jpg. Em seguida, tomaram-se as coordenadas cartesianas de um total de 10 pontos de referência (474X de aumento, figura 1), usando o programa *tpsDIG* versão 1.20 (Rohlf, 1998). Bookstein (1991) dividiu os marcos anatômicos em três tipos. O primeiro tipo inclui justaposições discretas de tecidos (os verdadeiros marcos); o segundo tipo corresponde ao máximo da curvatura; e, o terceiro tipo, especifica pontos externos. Nesta investigação, todos os marcos empregados são de tipos 2 e 3. Doze medidas foram tomadas, unindo oito marcos e

formando duas treliças sobrepostas, a saber: (AD, DF, FH, AH, AF, DH e CE, EG, GI, CI, CG e EI). Dois marcos (B e J) não foram usados para tomar as medidas lineares, porque se mostraram redundantes (veja Fig. 1, no Capítulo 3).

Após a obtenção das coordenadas cartesianas, usamos o programa *Distance 2.0* (R. E. Strauss, 1988), para obter os valores de cada uma das medidas lineares. Para todas as variáveis foram consideradas as médias dos dois desenhos. Como tínhamos dois desenhos de cada espécime foi possível calcular as repetibilidades finais totais dos dados deste trabalho, usando o procedimento de Lessels e Boag (1987).

Inicialmente, fizemos uma análise morfométrica tradicional que revelou padrão consistente com a maioria dos trabalhos de morfometria publicados. Os 3 primeiros componentes principais explicaram 95% da variação total da asa, ao passo que nos edeagos eles explicaram 89.0%. A variável latente tamanho da asa esteve associada com CP1, sendo responsável por 86.5% da variação total. Para tamanho do edeago CP1 explicou 55.7% da variação total. Uma correlação fenotípica significativa e alta ($r= 0.565$) foi detectada entre CP1 da asa e CP1 do edeago. Outras correlações significativas também foram obtidas entre os CPs do edeago e asa: CP1asa x CP2edeago e CP2asa x CP2edeago. Seguindo a mesma tendência, houve correlação positiva e significativa entre tamanho do centróide do edeago e asa para pais do campo e seus filhos criados em laboratório. Isto validou a principal conclusão de Andrade (2001), a saber, a existência de correlação positiva e significativa entre o tamanho do edeago e da asa. Porém permite interpretar a baixa contribuição do tamanho para a variação total como sendo devido à baixa repetibilidade no trabalho de Andrade (2001); e por extensão, talvez, no de Reyment (1991).

Todavia, optamos por uma análise com a morfometria geométrica por ser mais informativa (Monteiro *et al.*, 2002, 2005). Com o sucesso desta abordagem, usamo-la para o artigo sobre herdabilidade.

2.5. Organização da Tese

Nesta tese são apresentados: uma introdução geral e dois manuscritos – que correspondem aos trabalhos: “Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopuncta*: Effect of temperature” (publicado na revista “Journal of Thermal Biology”) e “Evolution of the male genitalia: morphological variation of the aedeagi in a natural population of *Drosophila mediopunctata*” (a ser submetido); seguidos de uma conclusão geral.

A coleta de ovos e criação das moscas em diferentes temperaturas (manuscrito 1) foi realizada por Luciane Mendes Hatadani; a preparação, digitalização e tomada de coordenadas Cartesianas das asas de *Drosophila mediopuncta* foram executados por meu colega de laboratório Roberto Donizete Vieira; ambos sob a supervisão do Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko.

**3. “Phenotypic Plasticity of the aedeagus of *Drosophila*
mediopunctata: Effect of the temperature”**

Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*: Effect of the temperature

Carlos A.C. Andrade^{a,b}, Luciane M. Hatadani^a, Louis B. Klaczko^{a,*}

^a*Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Cx. Postal 6109, Campinas 13083-070 SP, Brazil*

^b*Departamento de Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil*

Received 27 January 2005; accepted 28 May 2005

Abstract

In this study, we analyzed the phenotypic plasticity of the male intromittent organ (aedeagus) of *Drosophila mediopunctata* genitalia in response to temperature. Size and shape of the aedeagus were examined with univariate statistics and geometric morphometrics. The following results emerged: firstly, flies raised at 16.5 °C had bigger aedeagi than those raised at 20 °C; secondly, significant differences in shape were also found between the two groups of flies, mainly in the apical area, located using the thin-plate spline interpolating function; thirdly, the coefficients of variation for the traits of the aedeagus were comparable to other traits in *Drosophila* and likewise to genital traits in other organisms. These findings were analyzed in an evolutionary context.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Sexual selection; Male genitalia evaluation; Geometric morphometrics; Genetic biodiversity

1. Introduction

In several groups of animals with internal fertilization, the male genitalia have a fast and divergent evolution. This permits male genitalia traits to be frequently used as characters for defining species, as in *Drosophila*. In this genus the most utilized traits for species identification are on the male genitalia, especially in the intromittent organ, the aedeagus that show diagnosable differences (Vilela and Bachli, 1990). In the past two decades, the evolution of male genitalia has been studied in many groups of animals with internal fertilization (Eberhard, 1993, 1998; Arnqvist, 1997, 1998; Arnqvist and Thornhill, 1998; House and Simmons, 2003;

Hosken and Stockley, 2004). There are three hypotheses, which attempt to explain the rapid and diverse evolution of this structure: lock-and-key (Shapiro and Porter, 1989; Arnqvist, 1997), pleiotropy (Mayr, 1963) and sexual selection (Eberhard, 1993; Arnqvist, 1997). The lock-and-key hypothesis deserves special attention since it predicts that genital traits should present relatively limited plasticity due to the nearly perfect adjustment between male and female genitalia (Shapiro and Porter, 1989; Arnqvist, 1997, 1998).

Temperature is an abiotic factor, which affects several morphological characters of insects. In *Drosophila*, it has been repeatedly shown that it acts upon many traits, such as: length of the thorax and wing, and pigmentation in *Drosophila melanogaster* (Bitner-Mathé and Klaczko, 1999; Debat et al., 2003; Gibert et al., 2004; Hoffmann et al., 2003; Imasheva et al., 1996; Partridge et al., 1994) as well as in *D. mediopunctata*

*Corresponding author. Tel.: +5519 37881150;

fax: +5519 37886235.

E-mail address: lbk@unicamp.br (L.B. Klaczko).

(Bitner-Mathé et al., 1995; Hatadani et al., 2004). In other organisms, such as in the chironomid *Procladius choreus* and in the mosquito *Anopheles albimanus*, a variation in the structure of the male genitalia has been detected, respectively, due to seasonality (Kobayashi, 1998) and the development temperature of the larvae (Hribar, 1996). Surprisingly, however, as far as we know, there are no papers on the effect of temperature on the aedeagus morphology of *Drosophila*. *D. mediopunctata* is a species belonging to the *tripunctata* group. It is a Neotropical species with a wide-geographical distribution. It has a long-maturation time, low fecundity and extended longevity (Klaczko, 1995).

In this investigation, the main interest was in examining how the aedeagus of *D. mediopunctata* reacts with regard to two different temperatures. Due to the fact that we are dealing with a complex structure, small in size and with few anatomical points, we used not only univariate statistics but also geometric morphometrics to analyze the variation in size and shape of the aedeagus. A better understanding of this topic may contribute to support, or not, hypotheses that explain the evolution of male genitalia.

2. Materials and methods

2.1. Collection of flies, data gathering and repeatability

Flies were collected in the Mata Santa Genebra (22°44'45"S, 47°06'33"W) (Santa Genebra Woods) in September of 2000. This is a semi-deciduous forest in the city of Campinas, São Paulo, Brazil (Morelato and Leitão-Filho, 1995).

Each female was individually deposited in a tube with culture medium. From the progeny of each female, equal numbers of male and virgin females were set aside (about six couples from each progeny), and, after 10 days were placed in the same vial, from which first stage larvae were later collected. These larvae were distributed in tubes containing 10 ml of culture medium (8% yeast, 2% sugar, 2.5% agar, 0.003% nipagin), in a density of 10 larvae per tube, which were placed in two temperatures (16.5 and 20 °C). Males born from these tubes were separated and kept in wells of microtitration plates, having obtained 110 males (59 males at 16.5 °C and 51 males at 20 °C) at the end of the experiment.

The aedeagus was isolated and prepared following the procedure outlined by Wheeler and Kambysellis (1966). The aedeagus is a very small, complex and three-dimensional structure. Due to its rigid morphology it is possible, by means of gentle touches on the cover slip, to position it in a lateral or frontal view. However, corrections to the positioning must be made cautiously, since the aedeagus moves about in the balsam, for it has no support. In addition to this problem, there are no real

anatomical points on the organ. In a preliminary experiment we determined the best position for the analysis of the aedeagus testing the repeatability of measures taken in lateral and frontal positions. We found that measurement error was too big when the lateral position was used (repeatabilities <0.26) and this approach was abandoned, since the frontal position gave reliable measures.

After carefully placing the aedeagus in a frontal position, we sketched its outline using a *camera lucida* connected to a Zeiss optical microscope. For this study, having in mind the sources of error mentioned above and with the objective of raising precision in the measures, each specimen was drawn twice, with an interval of at least 1 month, after placing them put back into position. The concurrence of drawings was visually examined before taking the measurements. In only three cases, among 110 drawn specimens, was there evident discordance. For these, a third drawing was prepared in a totally independent way, and then compared to the prior drawings, and the discordant one was discarded. Both drawings of each aedeagus were scanned and saved to file. Next, Cartesian coordinates were taken from a total of 10 anatomical points (474 × magnification, Fig. 1), using *tpsDIG* v1.20 (Rohlf, 1998); all points used represent maximums of curvatures or external points (types 2 and 3 of Bookstein, 1991). Twelve linear measures were taken, joining eight points, making up two superimposed trusses (AD, DF, FH, AH, AF, DH and CE, EG, GI, CI, CG, EI). To avoid redundancy, two points (B and J) were not used to obtain linear measures.

The values of the linear measures were obtained from the Cartesian coordinates (using the software *Distance* 2.0, by Strauss, 1988). The averages of both drawings were used for all variables. Since we have two drawings for each specimen, it is possible to calculate the total final repeatability of the data in this work (Lessels and Boag, 1987). These values are shown in Table 1, and are all above 70%.

2.2. Geometric morphometrics and statistical tests

Since the Cartesian coordinates of the landmarks are distributed in a Kendall's space and their analysis is carried out in a linear space tangent to it (Bookstein, 1991), we tested the adequacy of this approximation with the *tpsSmall* v1.20 program (Rohlf, 2003). Next, using the program *tpsRegr* v1.25 (Rohlf, 1999), the anatomical points of the aedeagus were superposed with the Procrustes superposition technique. Thus, the anatomical points were translated, scaled, and rotated so as to minimize the squared and summed distances between the corresponding anatomical points (Bookstein, 1991; Slice, 1996). With this, the size factor was excluded, obtaining only the shape information. The variation of the shape of the aedeagus was analyzed,

0.3 mm

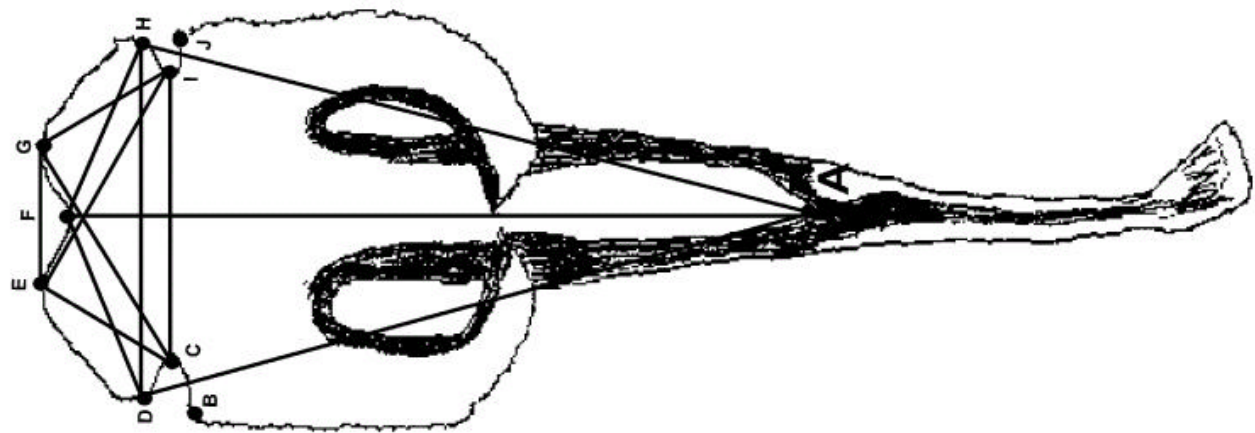


Fig. 1. Frontal view of the aedeagus of *D. mediopunctata*, lines show the linear measures taken.

Table 1
Repeatability of the analyzed variables of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*

Variable	Repeatability
AD	0.85
AF	0.87
AH	0.86
CE	0.86
CG	0.83
CI	0.94
DF	0.81
DH	0.96
EG	0.71
EI	0.77
FH	0.83
GI	0.87
Centroid size	0.91
Relative warp 1	0.92
Relative warp 2	0.91

therefore, for deformation patterns using the thin-plate spline method. To estimate the size of the aedeagus, the centroid size was calculated, which is defined as the square root of the sum of the squares of the distances between each anatomical point and the centroid (Bookstein, 1991).

To test the effect of the temperature for the univariate measures and for the centroid size *t*-tests were carried out. For the global shape of the aedeagus, Goodall's *F*-test (Goodall, 1991) was used, as recommended by Rohlf (2000), as well as a non-parametric permutation test based on Goodall's *F* statistic with 100,000 permutations. This test is independent of the restrictive

assumptions of Goodall's *F*-test. Finally, to visualize the temperature effect on shape, we used the *tpsRegr* program obtaining figures for the mean configuration and for the two temperatures (with the respective shape changes exaggerated three times).

All statistical analyses were carried out using the program Systat 8.0 or programs of the *tps* series (Rohlf, 1998, 2003).

3. Results

3.1. Univariate statistics

Table 2 shows the averages with their standard errors and coefficients of variation for the 12 linear measures and centroid size of the aedeagus of *D. mediopunctata*. When comparing the variables in both temperatures, applying the *t*-test, statistically significant differences are noted for 10 measures (out of 14), which showed higher averages for the lower temperature (16.5 °C) than for the high temperature (20 °C), with the exception of EG.

Another important information was the variation observed in each temperature that can be assessed by the coefficients of variation. Their averages were $7.1 \pm 3\%$ and $7.7 \pm 3\%$ for 16.5 and 20 °C, respectively, which are not significantly different (*t*-test = -0.508 ; *df* = 22; *P* = 0.62).

3.2. Geometric morphometrics

We found a positive correlation ($r = 1.00$) between the tangent and Kendall's shape spaces. This allowed us to use statistical tests based on the measures in the linear tangent space.

Table 2

Averages (in mm), standard errors (SE), and coefficients of variation (CV) for the linear measures and centroid size of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata* in two temperatures (16.5 and 20 °C)

Variable	16.5 °C		20 °C	
	$\bar{x} \pm SE$	CV	$\bar{x} \pm SE$	CV
AD	0.173 ± 0.0008	0.036	0.174 ± 0.0008	0.034
AF***	0.197 ± 0.0009	0.036	0.189 ± 0.0009	0.035
AH	0.175 ± 0.0009	0.037	0.176 ± 0.0009	0.034
CE***	0.046 ± 0.0007	0.119	0.038 ± 0.0006	0.113
CG***	0.075 ± 0.0006	0.057	0.071 ± 0.0008	0.075
CI	0.079 ± 0.0006	0.059	0.077 ± 0.0009	0.079
DF***	0.061 ± 0.0006	0.081	0.055 ± 0.0007	0.096
DH**	0.102 ± 0.0008	0.056	0.098 ± 0.0010	0.073
EG*	0.043 ± 0.0006	0.105	0.046 ± 0.0007	0.106
EI***	0.074 ± 0.0006	0.059	0.070 ± 0.0006	0.064
FH***	0.059 ± 0.0007	0.090	0.053 ± 0.0006	0.087
GI***	0.046 ± 0.0007	0.111	0.038 ± 0.0007	0.126
Centroid size***	0.214 ± 0.0008	0.032	0.207 ± 0.0010	0.033

t-test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

Regarding centroid size, we observed it was significantly larger at 16.5 °C than at 20 °C (Table 2). This reiterates the observation with univariate statistics: flies raised at lower temperatures have larger aedeagi.

Analyzing the global shape difference between both temperatures with Goodall's F -test and its permutation version, we obtained highly statistically significant differences (Goodall's F -test = 25.40; $df = 16, 1728$; $P < 0.0001$; $P_{\text{permutation}} < 0.0001$). Fig. 2 shows the shape variation, exaggerated three times, as well as the mean configuration, using the thin-plate spline function. It is worthy mentioning that the important deformations are in the most apical region of the aedeagus (see points C, E, G, and I).

4. Discussion

4.1. Plasticity of the size and shape of the aedeagus

The aedeagus of *D. mediopunctata* presented phenotypic plasticity regarding size. Flies raised at a lower temperature (16.5 °C) had larger aedeagi than those raised at a higher temperature (20 °C), this was shown by both the analysis of centroid size and univariate statistics.

We also carried out a principal components analysis (data not shown) using the distance measures, which revealed the very same pattern found with geometric morphometrics. There were statistically significant differences in the first three components. The first principal component (PC1), which represents the latent variable size and was responsible for 51.5% of the total variation, was highly correlated with centroid size ($r = 0.84$;

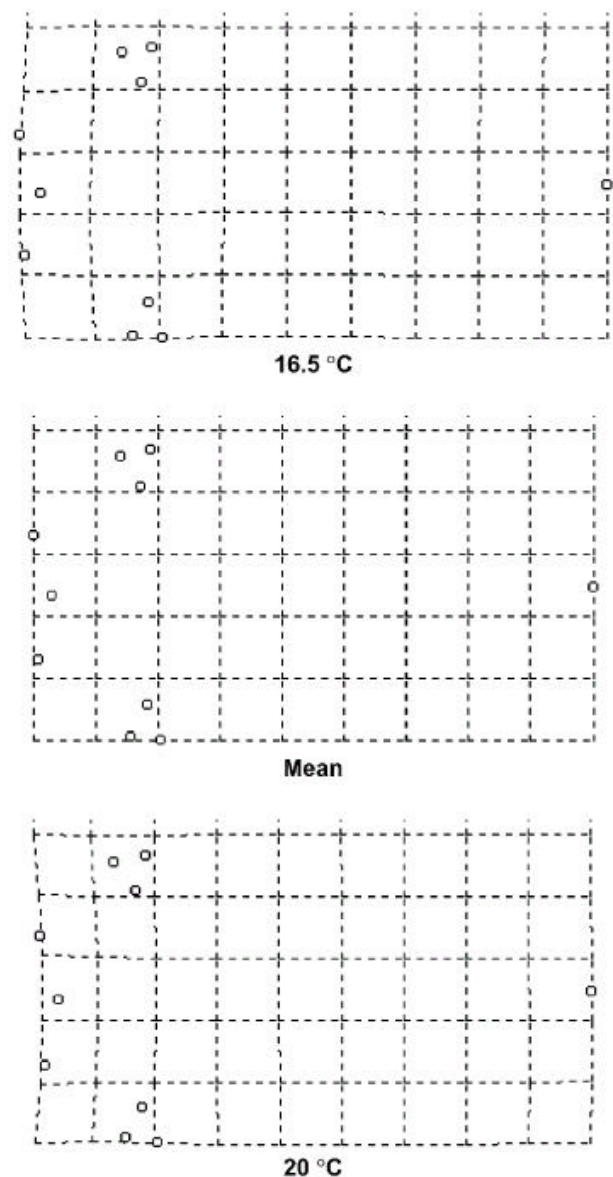


Fig. 2. Shape changes in the aedeagus of *D. mediopunctata* in two temperatures (16.5 and 20 °C). The mean configuration is shown in the center. Shape changes were exaggerated three times to make them more visible.

$P < 0.0001$). The PC1 averages for flies raised at 16.5 °C were larger than those raised at 20 °C. Similarly, there were significant differences for the second and third principal components (shape variables). This reiterates the presence of size and shape differences.

4.2. Implications of the variation of traits of the male genitalia

To characterize variability between species, Tidon-Sklorz and Sene (1995) investigated the morphological

variation of the aedeagus of the superspecies *D. serido*. They demonstrated that a certain region of the aedeagus contributes more to the variation of shape than the remaining measures, which contributed to distinguish three groups of flies. In another group of species, applying morphometric analysis, Kulikov et al. (2004) described the shape of the aedeagus among 11 morphologically similar species of the group of *D. virilis*. Thus, a fundamental step to understand the evolution of the male genitalia is to connect the intraspecific variation process with the interspecific diversification. Although the different hypotheses on the genitalia evolution attempt to explain the driving forces of this process, the effective causes have not yet been totally clarified (see Discussion in Arnqvist, 1997; Eberhard, 1993; Hosken and Stockley, 2004).

We found that the aedeagus traits have levels of phenotypic variation ($CV = 7.05\%$ and 7.68% for 16.5 and 20°C, respectively) comparable to non-genital traits in this same species. For example, Bitner-Mathé et al. (1995) detected CVs of about 8% in a study with this species for the lengths of the femur, tibia, and wing. Moreover, our results are also comparable with those found in various studies on genital traits in other organisms (Arnqvist and Thornhill, 1998; Eberhard et al., 1998; Jennions and Kelly, 2002; House and Simmons, 2003).

In the water strider *G. incognitus*, Arnqvist and Thornhill (1998) found that traits of the morphology of the genitalia are plastic and are sensitive to conditions of feeding stress. This finding, among others (e.g. the morphology of the genitalia was genetically correlated to measures of the size of the body and length of the leg), led them to reject the lock-and-key hypothesis. As a consequence, the pleiotropy and sexual selection hypotheses were both maintained. Our data show that the traits of the aedeagus suffered the influence of temperature, in other words, there is phenotypic plasticity for size as well as for shape, therefore reinforcing the evidence against the lock-and-key hypothesis.

Finally, we can conclude that size and shape of the aedeagus of *D. mediopunctata* suffered a clear influence of temperature. However, the shape of the aedeagus presented an interesting result: in a specific sector (the most apical area), there was change impinged by the temperature. Such change was captured by the morphometric methods. Since the male genitalia operates inside that of the female, it is necessary to search for more information regarding shape and function of the mating structures of the female. This step is essential to better understand how the male genitalia evolve.

Acknowledgments

It is a pleasure to thank Wilma N. de Souza for technical assistance, and Edward R. Hogan for review-

ing the English version of the manuscript. This work was supported by Grants from: Programa Institucional de Capacitação Docente e Técnica (PICDT/Capes); Conselho Nacional de Desenvolvimento Técnico e Científico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP); and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Arnqvist, G., 1997. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. *Biol. J. Linn. Soc.* 60, 365–379.
- Arnqvist, G., 1998. Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. *Nature* 393, 784–786.
- Arnqvist, G., Thornhill, R., 1998. Evolution of animal genitalia: patterns of phenotypic and genotypic variation and condition dependence of genital and non-genital morphology in water strider. *Genet. Res. Camb.* 71, 193–212.
- Bitner-Mathé, B.C., Klaczko, L.B., 1999. Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. *Genetica* 105, 203–210.
- Bitner-Mathé, B.C., Peixoto, A.A., Klaczko, L.B., 1995. Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. *Heredity* 75, 54–61.
- Bookstein, F.L., 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Debat, V., Begin, M., Legout, H., David, J.R., 2003. Allometric and non allometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. *Evolution* 57, 2773–2784.
- Eberhard, W.G., 1993. Evaluating models of sexual selection: genitalia as a test case. *Am. Nat.* 142, 564–571.
- Eberhard, W.G., Huber, B.A., Rodriguez, R.L., Briceño, R.D., Salas, I., Rodriguez, V., 1998. One size fits all? Relationships between the size and degree of variations in genitalia and other body parts in twenty species of insects and spiders. *Evolution* 52, 415–431.
- Gibert, P., Moreteau, B., David, J.R., 2004. Phenotypic plasticity of body pigmentation in *Drosophila melanogaster*. Genetic repeatability of quantitative parameters in two successive generations. *Heredity* 92, 499–507.
- Goodall, C.R., 1991. Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *J. R. Statist. Soc. B*, 53, 285–339.
- Hatadani, L.M., Baptista, J.C.R., Souza, W.N., Klaczko, L.B., 2004. Colour polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: genetic (chromosomal) analysis and nonrandom association with chromosome inversions. *Heredity* 93, 525–534.
- Hoffmann, A.A., Sorensen, J.G., Loeschcke, V., 2003. Adaptation of *Drosophila* to temperatures extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *J. Therm. Biol.* 28, 175–216.
- Hosken, D.J., Stockley, P., 2004. Sexual selection and genital evolution. *Trends Ecol. Evol.* 19, 87–93.

- House, C.M., Simmons, L.W., 2003. Genital morphology and fertilization success in the dung beetle *Onthophagus taurus*: an example of sexually selected male genitalia. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270, 447–455.
- Hribar, L.J., 1996. Larval rearing temperature affects morphology of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) male genitalia. *J. Am. Mosquito Control Assoc.* 12, 295–297.
- Imasheva, A.G., Loeschcke, V., Zhivotovsky, L.A., Lazebny, O.E., 1996. Effects of extreme temperatures on the phenotypic variation and developmental stability in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila buzzatii*. *Biol. J. Linn. Soc.* 61, 117–126.
- Jennions, M.D., Kelly, C.D., 2002. Geographical variation in male genitalia in *Brachyrhaphis episcopi* (Poeciliidae): is it sexually or naturally selected? *Oikos* 97, 79–86.
- Klaczko, L.B., 1995. Population genetics of *D. mediopunctata*. In: Levine, L.I. (Ed.), *Genetics of Natural Populations: The Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky*. Columbia University Press, New York, pp. 140–153.
- Kobayashi, T., 1998. Seasonal changes in body size and male genital structures of *Procladius choreus*. (Diptera: Chironomidae: Tanypodinae). *Aquatic Insects* 20, 165–172.
- Kulikov, A.M., Melnikov, A.I., Gornostaev, N.G., Lazebny, O.E., Mitrofanov, V.G., 2004. Morphological analysis of male mating organ in the *Drosophila virilis* species group: a multivariate approach. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 42, 135–144.
- Lessels, C.M., Boag, P.T., 1987. Unrepeatable repeatibilities: a common mistake. *Auk* 104, 116–121.
- Mayr, E., 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Morelato, P.C., Leitão-Filho, H.F. (Eds.), 1995. *Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra*. Unicamp, Campinas.
- Partridge, L., Barrie, B., Fowler, K., French, V., 1994. Evolution and development of body size and cell size in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. *Evolution* 48, 1269–1276.
- Rohlf, F.J., 1998. TpsDig, version 1.20. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, Available from <http://life.bio.sunysb.edu/morph>.
- Rohlf, F.J., 1999. TpsRegr, version 1.25. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, Available from <http://life.bio.sunysb.edu/morph>.
- Rohlf, F.J., 2000. Statistical power comparisons among alternative morphometric methods. *Am. J. Phys. Anthropol.* 111, 463–478.
- Rohlf, F.J., 2003. TpsSmall, version 1.20. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, Available from <http://life.bio.sunysb.edu/morph>.
- Shapiro, A.M., Porter, A.H., 1989. The lock-and-key hypothesis evolutionary and biosystematic interpretation of insect genitalia. *Ann. Rev. Entomol.* 34, 231–245.
- Slice, D.E., 1996. Three-dimensional generalized resistant fitting and the comparison of least squares and resistant fit residuals. In: Marcus, L.F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G., Slice, D.E. (Eds.), *Advances in Morphometrics*. Plenum, New York, pp. 179–200.
- Tidon-Sklorz, R., Sene, F.M., 1995. Evolution of the Buzzatii cluster (*Drosophila repleta* species group) in middle South America. *Evol. Biol.* 8y9, 71–85.
- Vilela, C.R., Bachli, G., 1990. Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Mitt. Schweiz. Ent. Ges.* 63 (Supp.), 1–332.
- Wheeler, M.R., Kambyzellis, M.P., 1966. Notes on the Drosophilidae (Diptera) of Samoa. *Univ. Texas Pubs.* 6615, 533–565.

4. “Evolution of the male genitalia: morphological variation of the aedeagi in a natural population of *Drosophila mediopunctata*”

(a ser submetido)

Evolution of the male genitalia: morphological variation of the aedeagi in a natural population of *Drosophila mediopunctata*

Abstract

To investigate the size and shape of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*, we have used basic statistics and geometric morphometrics. We have estimated the level of phenotypic variation, natural and laboratory heritability as well as their phenotypic correlations. The wing is used as an indicator for both body size and shape. Positive significant correlation was obtained for centroid size of aedeagus and wing for field fathers and their sons reared in the laboratory. Many positive significant phenotypic correlations were found among linear measures of both organs. The phenotypic correlations were few for aedeagus and wing shape. Coefficients of variation of the measures were on average larger in the aedeagus than in the wing for sons reared in laboratory, but not for flies coming from the field. Significant “natural” heritabilities were found for five linear measures of the aedeagus (CG_a , CI_a , DH_a , EG_a , and EI_a) and only one for the wing (CD_w). Few significant heritabilities were found for aedeagus and wing shape, mostly ones concerning the uniform components. Our data are discussed with regard to three main hypotheses that provide explanations for the evolution of male genitalia. Our results do not support the lock-and-key hypothesis, but cannot refute the sexual selection and pleiotropy hypotheses.

Key words: intraespecific variability – lock-and-key – pleiotropy – sexual selection – shape – size – wing – aedeagus – *Drosophila mediopunctata*

Introduction

In several groups of the genus *Drosophila*, the great differentiation in male genital traits is not accompanied by a comparable differentiation in the morphology of the rest of the body (Breuer & Pavan, 1950, 1954; Vilela, 1983). In fact, the traits most commonly used for species identification in this genus are in the male genitalia, which show marked differences in various appendages, especially in the intromittent organ, the aedeagus (Vilela, 1983; Vilela & Pereira, 1985; Vilela & Bachli, 1990). In several groups, this organ allows one to distinguish even cryptic species, with little or no overlapping. For instance, in the *repleta* group *D. serido* and *D. borborema* are morphologically similar species, but Tidon-Sklorz (1992) and Tidon-Sklorz & Sene (1995) distinguished each other based on measurements extracted of the aedeagus outline, applying “traditional” multivariate morphometric techniques. Recently, Kulikov et al. (2004) described the phallus shape, using multivariate analyses of variation, for various closely related species of the *Drosophila virilis* group.

Eberhard (1990, 1996, 2001) and Arnqvist & Thornhill (1998) have suggested that male genitalia undergo rapid and divergent evolution in animals with internal fertilization, but the causes for this evolutionary trend are not known. Several hypotheses for explaining the evolution of male genitalia exist (Eberhard, 1990, 2004; Lüpold *et al.*, 2004; Hosken & Stockley). However, Eberhard (1990) and specifically Arnqvist (1997) and Arnqvist & Thornhill (1998) have concentrated their attention basically on three main hypotheses: lock-and-key (cited in Scudder, 1971 and in Shapiro & Porter, 1989; Ohno *et al.*, 2003; Sirot, 2003), pleiotropy, and sexual selection (Eberhard, 1990, 1993; Rowe *et al.*, 1994; Arnqvist, 1997; Arnqvist & Thornhill, 1998; Bond *et al.*, 2003).

Arnqvist (1997) has presented some predictions that are to be expected for each of these hypotheses. Although they seem elucidating and well defined, they are actually difficult to

distinguish, because their predictions are not mutually exclusive. Experimental data may help to corroborate or refute one or more of these hypotheses – as studies of morphological correlations of genitalic traits with traits of other organs or the extent of phenotypical genitalic variation within populations.

Another issue of interest is the search for information on heritable variation of traits involved with male genitalia. Estimating heritability is a very important step to describe the degree of phenotypic resemblance between parent-offspring due to genes shared by the individuals (Falconer & Mackay, 1996; Roff, 1997). Moreover, it is the critical parameter that predicts the response to selection. For instance, in males of the seaweed fly (*Coelopa frigida*), Wilcockson *et al.* (1995) have reported that adult size has enormous additive genetic variance. Several authors (Thomas & Barker, 1993; Bitner-Mathé *et al.*, 1995; Norry *et al.*, 1997; Bitner-Mathé & Klaczko, 1999b) have shown that wing and thorax traits are correlated, both directly related to the insect size. What calls attention in these works and in other more recent ones (Gilchrist & Partridge, 2001; Hoffmann & Shirriffs, 2002; Matta & Bitner-Mathé, 2004; Moraes *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2005) is the use of different methodologies to quantify the morphological variation of complex structures.

This work describes the morphological variation of aedeagus and wing, as well as their phenotypic correlations, in a population of *D. mediopunctata*. We also estimate both natural and laboratory heritabilities for linear measures, centroid size, and aedeagus and wing shapes. We analyzed the wing morphology to contrast it with both size and shape of aedeagus. Because aedeagus and wing are complex structures, we have opted for using geometric morphometrics as a method for improving the quantification and description of their shape variation.

Material and methods

Collection and crosses - *Drosophila mediopunctata* (Dobzhansky & Pavan 1943) is a species belonging to the *tripunctata* group of the subgenus *Drosophila* (Val *et al.*, 1981). Klaczko (1995) has called attention to the long maturation time, low fecundity and extended longevity of this species.

We made two collections - using bananas fermented with baking yeast as bait - at Mata Santa Genebra, a forest fragment located in Campinas (São Paulo State, Brazil, 22° 53` S, 47° 04` W). On the first collection (9-11 August 2000), we identified and isolated individually several wild inseminated females in small vials. On the second collection (27-29 September 2000) we identified and isolated 81 males.

Each field male of the second collection was crossed to three F₁ virgin females derived from field females of the first collection. These flies were placed in shell vials in a fresh culture medium and kept at constant room temperature (16.5 °C). Species identification was checked by the analysis of polytene chromosomes (Coyne & Beecham, 1987).

After mating, each inseminated F₁ female was transferred to a new vial (replicated 3 times), in order to ensure near optimal conditions for larval development, avoid overcrowding, and prevent the effects of common environment. When the offspring emerged, three sons from each F₁ female were randomly chosen and kept in 70% ethyl alcohol. Wild males of each mating were also placed in 70% ethyl alcohol.

Heritability - Heritability in nature was calculated from the regression of flies caught in the field and their male offspring reared in the laboratory (Coyne & Beecham, 1987; Falconer & Mackay, 1996). From the regression coefficient (b), heritabilities ($h_n^2 = 2b$) were estimated for aedeagus traits.

Heritability in the laboratory was calculated from full sibs raised in the laboratory. According to Falconer & Mackay (1996), the intraclass correlation coefficient (t) for full sibs provides an estimate of the heritability ($h^2_{\text{lab}} = 2t$).

Fifty-three families were employed to estimate the heritability in nature and 53 full sib families for heritability in laboratory.

Preparation of aedeagi – The tip of the abdomen (*terminalia*) was extracted from each male and placed in KOH, which was then replaced by diluted Gage’s Stain. The *terminalia* was dissected and transferred to phenol, and the aedeagus was separated from other appendages. It was then mounted on a slide, in a small drop of Canada balsam, and four pieces of glass were placed around it and a cover slip on top (for more details see Wheeler & Kambysellis, 1966).

Aedeagus and wing measurements - Each aedeagus was carefully positioned in ventral view. Its outline was drawn on paper, using a *camera lucida* attached to a Zeiss optical microscope (474 X magnification, figure 1). Drawings were scanned and Cartesian coordinates obtained from a total of 10 points using a program *tpsDig* version 1.20 (Rohlf, 1998). Twelve measurements were taken joining eight points (Andrade *et al.*, 2005). Here we used points as “landmarks type 2 and 3” (*cf.* nomenclature in Bookstein, 1991).

Bitner-Mathé *et al.* (1995) described the wing of *D. mediopunctata*, identifying eleven measurements among six “landmarks” (points O, A, B, C, D, and E). In the present work, we employed the same procedure as Bitner-Mathé *et al.* (1995) to dissect and mount the right wing (figure 2) on a slide, as well as to digitize and take the Cartesian coordinates of the wing.

Repeatability – Because the identifiable points on aedeagi are not well defined and it is a very small organ, we calculated the repeatability (intraclass correlation coefficient) for each measurement, using a one-way analyses of variance. Estimation of repeatability was based on the procedure described by Lessels & Boag (1987).

In order to estimate the consistency of the measurements taken of the aedeagi of *D. mediopunctata*, two drawings of each specimen were made in two months intervals for the whole group (fathers plus sons = 454 drawings), with each aedeagus being moved and placed back again in the same position. Then, the two drawings for each aedeagus were superimposed one on top of another so that their outlines could be aligned and observed on a transilluminator, permitting the identification of obvious discrepancies. In these few cases, new drawings were made (*cf.* Andrade *et al.*, 2005). Data on the repeatability of centroid size and uniform and non-uniform components are shown in table 1. All final statistical estimates were calculated employing either average (for linear measures and centroid size) or consensus of the Cartesian coordinates (for shape) taken two times from each specimen.

Geometric morphometrics – The Cartesian coordinates of the landmarks are distributed in a Kendall's shape space; however, their analysis is carried out in a linear space tangent to it (Bookstein, 1991). To verify if this approximation is adequate for the data, we examined the regression and the correlation between the Procrustes distances and the Euclidean distances in the respective spaces.

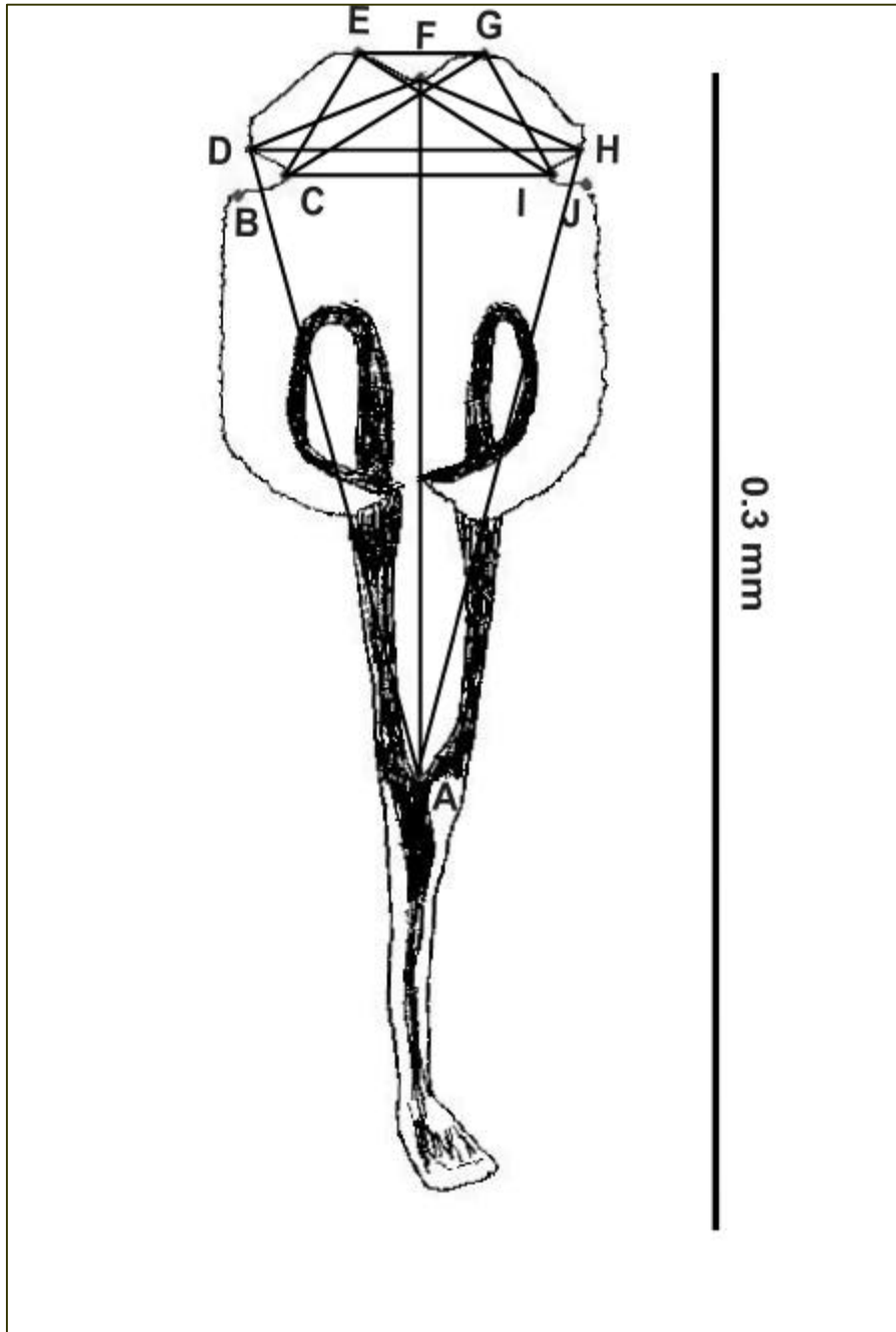


Fig 1. Frontal view of the aedeagus of *D. mediopunctata*. Dots show the landmarks used and the lines the linear measures taken.

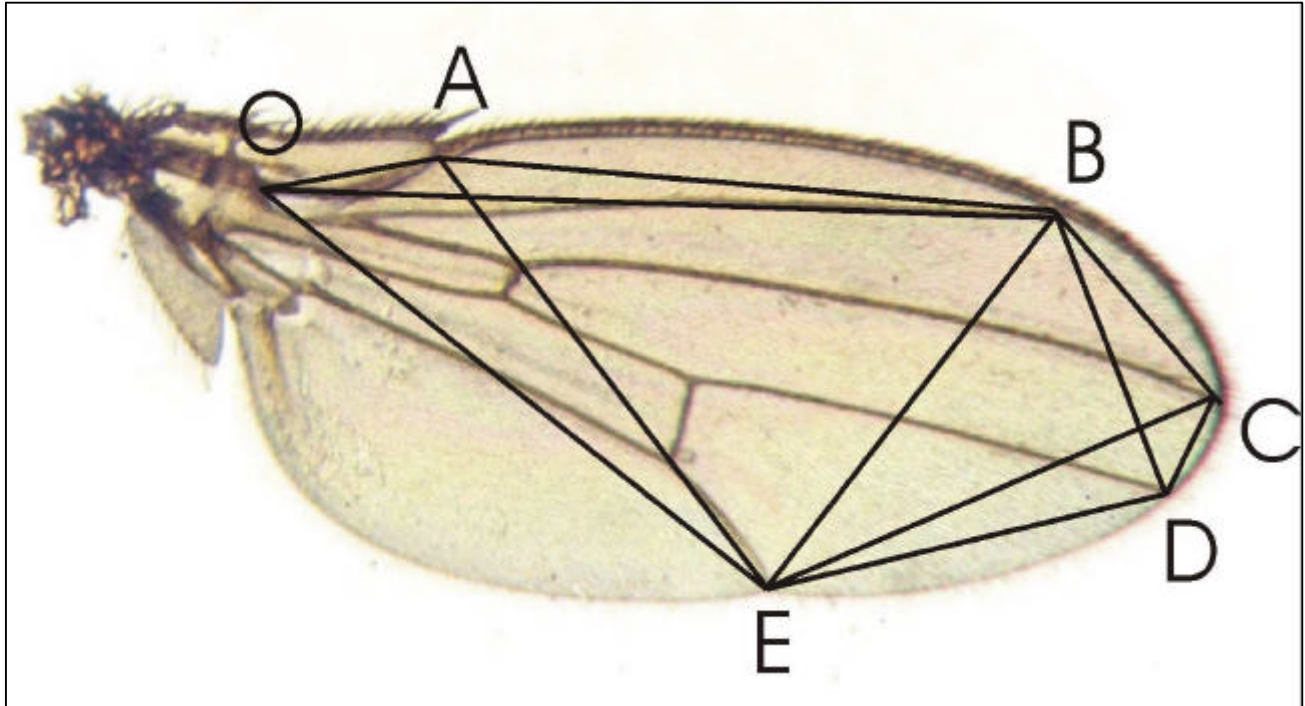


Fig 2. Wing of *Drosophila*, the landmarks used are indicated by the letters and the the lines show the linear measures taken.

Table 1. Repeatability of the linear measures, centroid size (Cs) and of the relative warps (RW) and uniform (U1 eU2) components of the aedeagus of *D. mediopunctata* (n= 454).

Variables	r
AD	0.88
AF	0.91
AH	0.90
CE	0.79
CG	0.83
CI	0.94
DF	0.78
DH	0.96
EG	0.79
EI	0.84
FH	0.77
GI	0.83
Centroid size	0.95
RW1	0.85
RW2	0.90
RW3	0.28
RW4	0.76
RW5	0,77
RW6	0.71
U1	0.89
U2	0.65

Next, the anatomical points of the aedeagus were superimposed with the Procrustes superposition technique. Thus, the anatomical points were translated, scaled, and rotated so as to minimize the squared and summed distances between the corresponding anatomical points (Bookstein, 1991; Rohlf & Slice, 1990; Slice, 1996; Monteiro *et al.*, 2005). With this, the size factor was removed, obtaining only the shape information. According to Pretorius & Scholtz (2001) and Rohlf & Bookstein (2003) a relative warp analysis is a principal components analysis of the covariance matrix of the partial warp scores. We deliberately chose the first six relative warps, because they retained the most important total shape variation (global and localized). We also analyzed the two uniform components, which capture only global shape variation.

To estimate the size of the aedeagus, the centroid size was calculated, which is defined as the square root of the sum of the squares of the distances between each anatomical point and the centroid (Bookstein, 1991; Bond *et al.*, 2003).

All statistical analyses were carried out using the program Systat 8.0 or programs of the *tps* series (Rohlf, 1998, 2003, 2004).

Results

Phenotypic variation

Table 2 shows the averages, standard errors, and coefficients of variation of the wing and aedeagus measurements of *D. mediopunctata* calculated from flies caught in the field and their male offspring reared in the laboratory. The averages of variables of the wing and aedeagus are bigger in flies reared in the laboratory than in their wild-caught fathers. However, the variation of the wing is smaller in flies reared in the laboratory than in their wild-caught fathers ($t = 6.91$, d.f. = 20, $P < 0.0001$). For the aedeagus, sons reared in the laboratory are bigger than their field fathers, but their coefficients of variation are similar ($t = 0.20$, d.f. = 22, $P = 0.84$).

It is possible to compare the coefficients of variation of aedeagus measures with those of the wing to evaluate the extent of phenotypic variability in these organs. Both were of similar magnitude among the fathers ($t = 0.98$, d.f. = 21, $P = 0.34$), thus indicating that the degrees of phenotypic variation of these organs are the same. However, when the sons were compared, the coefficients of variation were bigger for the aedeagus than for the wing ($t = 3.53$, d.f. = 21, $P = 0.002$), suggesting that these two organs have different norms of reaction.

Heritability of the aedeagus

The results of natural and laboratory heritabilities for the aedeagus variables are given in table 3. A positive significant estimate of natural and laboratory heritability were observed for the variables CG_a , CI_a , DH_a , EG_a , and EI_a , indicating a high level of additive genetic variance. The heritability for AH_a was also significant in the laboratory. It is also worth noting that the estimates of laboratory heritabilities were larger (range 0.62-0.92) than the estimates of natural heritability (range 0.53-0.70).

Data on natural and laboratory heritability with regard to shape of aedeagus can be seen in table 4. A significant natural heritability was found only for relative warp 2 (RW2). In the laboratory, however, centroid size, RW1, RW2, RW3, RW5, and uniform component 1 showed significant values. In general, estimates of shape were larger for the laboratory heritability than natural heritability.

Table 2. Average (in mm) with standard error and coefficient of variation of the variables of the wing (n=74) and aedeagus (n=65) from field fathers and laboratory sons (n=114).

Variables	X ± s.e. (Father)	CV (Father)	X ± s.e. (Son)	CV (Son)
AB _w	1.827 ± 0.0148	0.070	2.125 ± 0.0060	0.030
AE _w	1.451 ± 0.0111	0.066	1.681 ± 0.0045	0.029
AO _w	0.314 ± 0.0030	0.083	0.352 ± 0.0021	0.065
BC _w	0.441 ± 0.0035	0.068	0.491 ± 0.0020	0.044
BD _w	0.587 ± 0.0042	0.062	0.666 ± 0.0023	0.037
BE _w	1.185 ± 0.0092	0.067	1.372 ± 0.0039	0.031
BO _w	2.064 ± 0.0167	0.070	2.401 ± 0.0064	0.029
CD _w	0.233 ± 0.0025	0.089	0.273 ± 0.0015	0.060
CE _w	1.171 ± 0.0086	0.064	1.339 ± 0.0040	0.032
DE _w	0.995 ± 0.0077	0.066	1.128 ± 0.0039	0.037
EO _w	1.514 ± 0.0119	0.067	1.769 ± 0.0049	0.030
Average wing		0.070		0.039
AD _a	0.166 ± 0.0010	0.048	0.172 ± 0.0006	0.034
AF _a	0.188 ± 0.0013	0.056	0.198 ± 0.0007	0.035
AH _a	0.167 ± 0.0010	0.047	0.174 ± 0.0007	0.035
CE _a	0.043 ± 0.0006	0.118	0.047 ± 0.0005	0.109
CG _a	0.073 ± 0.0007	0.072	0.077 ± 0.0006	0.073
CI _a	0.074 ± 0.0006	0.065	0.079 ± 0.0006	0.071
DF _a	0.058 ± 0.0006	0.089	0.062 ± 0.0006	0.089
DH _a	0.101 ± 0.0007	0.059	0.105 ± 0.0008	0.065
EG _a	0.046 ± 0.0007	0.117	0.046 ± 0.0008	0.139
EI _a	0.073 ± 0.0007	0.072	0.077 ± 0.0006	0.067
FH _a	0.058 ± 0.0006	0.081	0.062 ± 0.0006	0.083
GI _a	0.044 ± 0.0006	0.116	0.048 ± 0.0006	0.111
Average aedeagus		0.078		0.076

(a)= aedeagus (w)= wing

Table 3. Natural (h^2_{nat}) and laboratory (h^2_{lab}) heritability of the variables (linear measures) of the aedeagus of *D. mediopunctata*.

Variables	$h^2_{\text{nat}} \pm \text{s.e.}$	$h^2_{\text{lab}} \pm \text{s.e.}$
AD _a	0.14 ± 0.15	0.42 ± 0.26
AF _a	0.09 ± 0.14	0.21 ± 0.27
AH _a	0.21 ± 0.16	0.73 ± 0.24**
CE _a	0.04 ± 0.23	- 0.11 ± 0.28
CG _a	0.68 ± 0.24**	0.67 ± 0.25**
CI _a	0.57 ± 0.24*	0.79 ± 0.23**
DF _a	0.32 ± 0.25	0.45 ± 0.26
DH _a	0.54 ± 0.25*	0.79 ± 0.23**
EG _a	0.70 ± 0.26*	0.92 ± 0.22***
EI _a	0.53 ± 0.22*	0.62 ± 0.25**
FH _a	0.24 ± 0.24	0.15 ± 0.27
GI _a	0.16 ± 0.24	0.30 ± 0.27

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; (a)= aedeagus

Table 4. Natural (h^2_{nat}) and laboratory (h^2_{lab}) heritability for centroid size (Cs) and aedeagus shape, measured across the scores of relative warps (RW) and uniform components (U1 and U2) of *D. mediopunctata*.

Variables	h^2_{nat}	h^2_{lab}
Centroid size	0.07 ± 0.18	0.70 ± 0.24*
RW1	-0.47 ± 0.36	0.48 ± 0.26*
RW2	0.79 ± 0.39*	0.80 ± 0.23**
RW3	-0.32 ± 0.31	0.58 ± 0.25*
RW4	0.08 ± 0.26	0.24 ± 0.27
RW5	0.20 ± 0.27	0.63 ± 0.25*
RW6	0.33 ± 0.65	0.21 ± 0.27
U1	0.66 ± 0.39	0.83 ± 0.23***
U2	-0.05 ± 0.25	0.39 ± 0.27

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001;

Heritability of the wing

Table 5 shows the heritabilities of eleven linear measures (variables) of the wing. Only one single measure (CD_w) had a significant value for the natural heritability, contrasting with six measures with significant values in the laboratory.

Table 5. Heritability in nature (h^2_{nat}) and laboratory (h^2_{lab}) with standard errors of the variables (linear measures) of the wing of *D. mediopunctata*.

Variables	$h^2_{nat} \pm s.e.$	$h^2_{lab} \pm s.e.$
AB_w	0.06 ± 0.10	$0.57 \pm 0.28^*$
AE_w	0.09 ± 0.10	$0.57 \pm 0.28^*$
AO_w	0.31 ± 0.20	$0.63 \pm 0.27^*$
BC_w	0.17 ± 0.17	0.27 ± 0.30
BD_w	0.16 ± 0.16	0.45 ± 0.29
BE_w	0.00 ± 0.11	0.45 ± 0.29
BO_w	0.06 ± 0.10	0.36 ± 0.29
CD_w	$0.44 \pm 0.18^*$	$0.63 \pm 0.27^*$
CE_w	0.09 ± 0.11	$0.76 \pm 0.26^{**}$
DE_w	0.09 ± 0.12	$0.96 \pm 0.23^{***}$
EO_w	0.08 ± 0.10	0.43 ± 0.29

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$: (w)= wing

Table 6 shows the heritabilities of centroid size (Cs) and wing morphometric measures. Two highly significant results were found for natural heritability (relative warps 2 and 4), while laboratory heritability presented high significant estimates for centroid size and RW1, RW2, RW3, and RW6, as well as for the first uniform component (U1). As with the aedeagus, laboratory estimates are larger than natural estimates.

Table 6. Natural (h^2_{nat}) and laboratory (h^2_{lab}) heritability for centroid size (Cs) and wing shape, measured across the scores of relative warps (RW) and uniform components (U1 and U2) of *D. mediopunctata*.

Variables	h^2_{nat}	h^2_{lab}
Cs	0.07 ± 0.11	0.93 ± 0.21***
RW1	0.34 ± 0.32	1.00 ± 0.20***
RW2	0.94 ± 0.27**	0.78 ± 0.24**
RW3	0.37 ± 0.37	0.80 ± 0.23**
RW4	0.83 ± 0.28**	0.30 ± 0.27
RW5	0.08 ± 0.36	0.26 ± 0.27
RW6	0.23 ± 0.25	1.07 ± 0.20***
U1	0.35 ± 0.32	0.77 ± 0.24**
U2	0.68 ± 0.36	0.33 ± 0.27

*P<0.05; ** P<0.01; *** P< 0.001

Phenotypic correlations between the aedeagus and the wing

Tables 7 and 8 show phenotypic correlations between the wing and aedeagus variables for field males and their sons reared in laboratory. From one hundred thirty-two phenotypic correlations only sixteen showed non-significant results. There are several significant phenotypic correlations (range 0.43-0.65), after applying the Bonferroni correction. Other significant correlations (range 0.26-0.65) can be seen without applying a Bonferroni correction. A different scenario emerged for flies reared in laboratory. Table 8 shows that only a few of variables had significant correlation values (range 0.19-0.31), but after applying the Bonferroni correction none was significant.

Table 7. Phenotypic correlations between wing and aedeagus linear variables (n=64) of wild caught fathers of *D. mediopunctata*.

Variable	AB _w	AE _w	AO _w	BC _w	BD _w	BE _w	BO _w	CD _w	CE _w	DE _w	EO _w
AD _a	<u>0.61</u> ***	<u>0.61</u> ***	<u>0.62</u> ***	0.26*	<u>0.43</u> ***	<u>0.59</u> ***	<u>0.63</u> ***	0.41***	<u>0.58</u> ***	<u>0.56</u> ***	<u>0.62</u> ***
AF _a	<u>0.59</u> ***	<u>0.62</u> ***	<u>0.55</u> ***	0.26*	<u>0.45</u> ***	<u>0.58</u> ***	<u>0.60</u> ***	<u>0.43</u> ***	<u>0.55</u> ***	<u>0.52</u> ***	<u>0.61</u> ***
AH _a	<u>0.64</u> ***	<u>0.63</u> ***	<u>0.62</u> ***	0.27*	<u>0.44</u> ***	<u>0.61</u> ***	<u>0.65</u> ***	0.41***	<u>0.60</u> ***	<u>0.58</u> ***	<u>0.63</u> ***
CE _a	0.33**	0.39**	0.32*	0.17 ^{ns}	0.33**	0.35**	0.33**	0.32**	0.30*	0.26*	0.37**
CG _a	<u>0.54</u> ***	<u>0.58</u> ***	<u>0.54</u> ***	0.18 ^{ns}	0.40**	<u>0.54</u> ***	<u>0.56</u> ***	<u>0.43</u> ***	<u>0.49</u> ***	<u>0.45</u> ***	<u>0.59</u> ***
CI _a	<u>0.50</u> ***	<u>0.52</u> ***	<u>0.49</u> ***	0.21 ^{ns}	0.37**	<u>0.49</u> ***	<u>0.53</u> ***	0.39**	<u>0.46</u> ***	0.43***	<u>0.55</u> ***
DF _a	0.42***	<u>0.47</u> ***	0.42***	0.17 ^{ns}	0.33**	0.41***	<u>0.43</u> ***	0.34**	0.36**	0.32**	<u>0.46</u> ***
DH _a	<u>0.49</u> ***	<u>0.55</u> ***	<u>0.59</u> ***	0.23 ^{ns}	0.37**	<u>0.48</u> ***	<u>0.53</u> ***	0.32*	<u>0.44</u> ***	0.41***	<u>0.58</u> ***
EG _a	0.39**	0.40*	<u>0.43</u> ***	0.08 ^{ns}	0.21 ^{ns}	0.37**	0.41***	0.22 ^{ns}	0.35**	0.35**	0.42***
EI _a	<u>0.50</u> ***	<u>0.56</u> ***	<u>0.57</u> ***	0.23 ^{ns}	0.40**	<u>0.50</u> ***	<u>0.53</u> ***	0.41***	<u>0.46</u> ***	0.41***	<u>0.58</u> ***
FH _a	0.37**	0.45***	0.40**	0.18 ^{ns}	0.32*	0.35**	0.38**	0.28*	0.31*	0.28*	<u>0.44</u> ***
GI _a	0.21 ^{ns}	0.30*	0.28*	0.19 ^{ns}	0.29*	0.23 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.30*	0.19 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.29*

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns= not-significant. Underlined values were significant to sequential Bonferroni test. Asterisks show the significant values (without applying a Bonferroni technique). (a)= aedeagus (w)= wing

Correlations between wing and aedeagus morphometric measures are given in table 9. When the Bonferroni correction is applied, highly significant cases can only be observed for centroid size for both fathers and sons, indicating that wing and aedeagus size are positively related. However, some interesting correlations (without Bonferroni correction) were observed between aedeagus uniform component (U2) and scores of RW1 and RW5 of the wing. Since data are not simultaneously consistent for fathers and sons, this may be taken as evidence that aedeagus and the wing shapes are independent.

Table 8. Phenotypic correlation between the wing and aedeagus variables of sons of *D. mediopunctata* (n=104).

Variable	AB _w	AE _w	AO _w	BC _w	BD _w	BE _w	BO _w	CD _w	CE _w	DE _w	EO _w
AD _a	-0.03 ^{ns}	0.31 ^{**}	0.13 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.20 [*]	-0.01 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.20 [*]	0.21 [*]	0.31 ^{**}
AF _a	0.07 ^{ns}	0.28 ^{**}	0.20 [*]	0.02 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.20 [*]	0.09 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.29 ^{**}
AH _a	-0.07 ^{ns}	0.25 [*]	0.08 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.17 ^{ns}	0.23 [*]	-0.06 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.22 [*]	0.20 [*]	0.25 [*]
CE _a	0.16 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.22 [*]	-0.14 ^{ns}	-0.12 ^{ns}	0.15 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.08 ^{ns}
CG _a	0.10 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.27 [*]	-0.05 ^{ns}	-0.03 ^{ns}	0.26 [*]	0.12 ^{ns}	0.22 [*]	0.27 [*]	0.20 [*]	0.05 ^{ns}
CI _a	0.09 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.16 ^{ns}	-0.05 ^{ns}	-0.04 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.17 ^{ns}	0.20 [*]	0.15 ^{ns}	0.12 ^{ns}
DF _a	0.14 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.21 [*]	-0.09 ^{ns}	-0.07 ^{ns}	0.21 [*]	0.15 ^{ns}	0.23 [*]	0.19 [*]	0.11 ^{ns}	0.13 ^{ns}
DH _a	0.05 ^{ns}	0.26 [*]	0.17 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.29 ^{**}	0.06 ^{ns}	0.27 [*]	0.27 [*]	0.18 ^{ns}	0.16 ^{ns}
EG _a	-0.07 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.21 [*]	-0.07 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.22 [*]	0.18 ^{ns}	-0.06 ^{ns}
EI _a	0.05 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.25 [*]	0.00 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.22 [*]	0.07 ^{ns}	0.14 ^{ns}	0.23 [*]	0.18 ^{ns}	0.07 ^{ns}
FH _a	0.05 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.17 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.11 ^{ns}
GI _a	0.14 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.23 [*]	-0.12 ^{ns}	-0.11 ^{ns}	0.09 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.12 ^{ns}

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0,001; ns= not-significant. Asterisks show the significant values (without applying a Bonferroni technique). (a)= aedeagus (w)= wing

Table 9. Correlations between morphometric measurements of the wing and aedeagus for fathers and their sons of *Drosophila mediopunctata*.

Wild-caught father									
	RW1_a	RW2_a	RW3_a	RW4_a	RW5_a	RW6_a	U1_a	U2_a	Cs_a
RW1_w	0.12	0.12	-0.16	0.12	0.08	-0.11	0.12	-0.07	0.32*
RW2_w	-0.03	-0.04	0.07	0.04	-0.07	-0.11	-0.03	-0.14	0.17
RW3_w	0.19	-0.25*	-0.07	-0.30*	0.12	0.34*	-0.18	0.39**	-0.19
RW4_w	-0.08	-0.14	0.03	-0.13	0.15	-0.03	-0.14	0.07	-0.19
RW5_w	0.08	-0.01	0.24	0.12	-0.10	-0.01	0.02	-0.10	-0.29*
RW6_w	0.10	0.07	-0.03	0.23	0.01	-0.13	0.10	-0.15	0.03
U1_w	-0.12	0.19	0.15	0.28*	-0.09	-0.25*	0.15	-0.31*	0.03
U2_w	-0.17	0.05	-0.11	-0.08	0.12	-0.03	0.00	0.06	0.02
Cs_w	-0.04	0.04	-0.17	0.15	-0.05	-0.04	0.00	-0.08	<u>0.66***</u>
Laboratory sons									
	RW1_a	RW2_a	RW3_a	RW4_a	RW5_a	RW6_a	U1_a	U2_a	Cs_a
RW1_w	-0.10	-0.14	-0.09	0.00	0.07	-0.13	-0.14	-0.02	0.01
RW2_w	0.05	-0.09	0.06	-0.03	-0.12	-0.02	-0.10	-0.08	-0.12
RW3_w	0.19	-0.11	-0.14	0.15	-0.11	-0.15	-0.08	-0.07	-0.06
RW4_w	0.13	-0.06	-0.17	0.08	-0.12	-0.06	-0.09	-0.01	-0.24*
RW5_w	0.00	-0.12	-0.14	0.17	0.13	0.11	-0.11	0.11	-0.08
RW6_w	0.18	-0.24	0.26*	-0.06	-0.06	0.08	-0.14	-0.03	-0.12
U1_w	-0.08	-0.07	-0.02	-0.04	0.11	0.08	-0.08	0.07	-0.09
U2_w	-0.13	0.21	-0.08	-0.05	0.05	-0.03	0.16	0.03	0.08
Cs_w	-0.05	0.07	-0.06	-0.07	-0.03	-0.03	0.06	0.02	<u>0.42**</u>

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; N= 64 for fathers and n= 99 for sons. Underlined values are significant to sequential Bonferroni test (P<0.05). Asterisks show the significant values (without applying a Bonferroni technique) (a)= aedeagus (w)= wing

Discussion

Wing and aedeagus variation

Phenotypic variation of aedeagus and wing of *D. mediopunctata* were compared. For both organs, flies raised in the laboratory were bigger than those from the field. Morphological variation had a different pattern: flies from the field showed a similar degree of morphological variation for both organs. However, the same did not occur for their sons, which showed less variation than their fathers, particularly for wing traits. A possible explanation cause for this is a differential response to the reduction in environmental variation in the laboratory as reported by Bitner-Mathé & Klaczko (1999c). Thus, our data agree, in part, with that of Arnqvist & Thornhill (1998), in which they reported that genital traits were phenotypically as variable as non-genital traits in the water strider *G. incognitus*.

Another important issue is the phenotypic correlations. Field flies showed a positive significant correlation for aedeagus and wing greater than their sons. This feature was found for linear measures and size, but no clear aspect could be seen for shape.

Heritability

It is not an easy task to explain variation within a species when the genetic basis and the evolutionary forces are not known. For the Santa Genebra population, we identified five traits (CG_a , CI_a , DH_a , EG_a , and EI_a), among twelve aedeagus linear variables, which showed significant natural heritabilities (ranging 0.53-0.68). Nonetheless, in the laboratory, a less variable environment, it was possible to detect significant genetic variation for six linear measures. Similar results were found for morphometric measurements. For the wing, we identified only one trait with a significant natural heritability (CD_w) and six in the laboratory.

It is worth noting that the wing is considered an indicator of fly size. Wing linear measures found in this work showed a pattern of variation rather consistent with previous works. For instance, Bitner-Mathé & Klaczko (1995, 1999a, b) noted that the points which determine the position of the apices of the third, fourth and fifth longitudinal wing veins exhibit high heritability in nature. In other species (Haas & Tolley, 1998; Bitner-Mathé & Klaczko, 1999c; Hoffmann & Shirriffs, 2002), even using a different methodology, the same phenomenon was demonstrated, with highlights to the positioning of the wing veins relative to the wing border (Bitner-Mathé & Klaczko, 1995, 1999a; Gilchrist & Partridge, 2001; Matta & Bitner-Mathé, 2004).

Our investigation also revealed high natural heritabilities for wing (RW2 and RW4) and aedeagus shape variation (RW2). However, significant results for centroid size and for wing and aedeagus uniform component were only found from estimates of laboratory heritabilities. Heritability estimates indicate how the wing and aedeagus traits will respond to selection. Therefore, if the amount of additive genetic variance – a genetic component of heritability – is high, the adaptation process can be accelerated (Imasheva *et al.*, 2001). It is known that heritability estimates are valid only for populations and circumstances in which they are being examined (Falconer & Mackay, 1996; Orengo & Prevosti, 1999). For example, Arnqvist & Thornhill (1998) found significant estimates only for scores of relative warps 5 and 6 on heritabilities for the shape of the genital capsule in the water strider. In the dung beetle *Onthophagus taurus*, House & Simmons (2005) described low heritabilities for genital sclerites.

Our data reveal that some aedeagus traits and aedeagus shape and size have high heritability. This information is rather valuable, especially because the wing, the reference system, also showed heritable variation. In any case, descriptions of complex structures within species can detect main areas in which important evolutionary changes can occur (Kullikov *et al.*,

2004; Andrade *et al.*, 2005). Moreover, relationships between wing and aedeagus permit us to illuminate some crucial premises on the hypotheses for evolution of male genitalia. With regard to the *D. mediopunctata* aedeagus, it is necessary to assess these same estimates in other populations.

Hypotheses for the evolution of male genitalia

Eberhard (1985, 1993, 1996), Arnqvist (1997, 1998), Arnqvist & Thornhill (1998), and House & Simmons (2005) have discussed the three main hypotheses for the diversification and evolution of male genitalia.

Our data present some results that are relevant to support or falsify them:

1. aedeagus centroid size (Cs_a) showed a positive significant correlation with wing centroid size (Cs_w);
2. the aedeagus showed a pattern of morphological variation slightly different from the wing pattern;
3. aedeagus centroid size showed a few correlations with wing shape ($RW1_w$ and $RW5_w$), although not consistent;
4. many phenotypic correlations were found among measurements in both organs.

The lock-and-key hypothesis postulates that the appendages of male and female genitalia, are strictly adjusted each other. Development of the genitalia should be highly canalized. Arnqvist (1997) listed predictions and assumptions of this hypothesis:

- a) all morphological variation in genitalic traits must be relatively independent of condition-dependent typical traits, such as body size; in other words, one should expect low phenotypic correlations between them;
- b) genitalic traits should show low degrees of phenotypic variation within populations.

The lock-and-key hypothesis is not supported by our data, which is clear when we confront predictions (a) and (b) with (1) the high positive correlation of aedeagus centroid size with wing centroid size; and (3) the correlation (positive or negative) of aedeagus centroid size with wing shape.

The pleiotropy hypothesis proposes that genital variation in males and females is essentially neutral (Mayr, 1963) and predicts that (Arnqvist, 1997):

a) morphological variation in genital traits should be phenotypically correlated with other traits;

b) genital traits should show phenotypic variability comparable to, or even greater than, other similar calibrated traits.

In the present work we obtained positive significant correlation between aedeagus centroid size (C_{s_a}) and wing centroid size (C_{s_w}) supporting the pleiotropy hypothesis to the extent that aedeagus size is correlated with each one of its measures, the same being true for the wing.

In addition, the variation observed in the aedeagi was larger than that for the wing (only for the sons) and significant. Thus, variation patterns are wholly similar, which agrees with the pleiotropy hypothesis. Therefore, our data do not allow us to reject the pleiotropy hypothesis, even if they do not seem to adjust precisely to its predictions.

According to the sexual selection hypothesis, the variation in intromittent genitalic traits would be related to the male's fertilization success. Arnqvist (1997) states that

a) traits under sexual selection show high phenotypic variability;

b) depending on what type of sexual selection is acting, genitalic traits may or may not evolve towards correlation with other morphological traits.

Our data are in partial agreement with this hypothesis, since we obtained higher coefficients of variation (CVs) for the aedeagus in the laboratory than in the field, but we did not

obtain sharp differences in CVs for the aedeagus compared to the wing in the field and aedeagus and wing sizes are correlated. In spite of this, we cannot point this hypothesis as the most appropriate to explain our data, since it is highly permissive. In other words, each one of the great number of sexual selection models makes different predictions about a same topic and so, the general hypothesis can be hardly falsified. In order to test for sexual selection it is necessary to conduct specifically designed experiments. However, our investigation showed a level of phenotypic variation rather similar to those found by several authors (Arnqvist & Thornhill, 1998; Kelly *et al.*, 2000; Jennions & Kelly, 2002; House & Simmons, 2003, 2005; Andrade *et al.*, 2005), who examined genital traits in different organisms. Although levels of phenotypic variation ranged from 3% to 13%, the authors admitted the genital morphology to be influenced by sexual selection.

In conclusion, our findings revealed that some linear measures, mainly wing and aedeagus shape, are heritable. Moreover, there was a significant positive correlation between sizes for both organs. On the other hand, aedeagus centroid size showed a few correlations with wing shape. Due to these, we concluded that among the three major hypotheses, the lock-and-key hypothesis can not be supported by our data. However, studies of the female genitalia are needed to further understand animal genitalia evolution.

Literature Cited

- Andrade, C. A. C., Hatadani, L. M. & L. B. Klaczko. 2005. Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*. *J. Therm. Biol.* 30: 518-523.
- Arnqvist, G. & R. Thornhill. 1998. Evolution of animal genitalia: patterns of phenotypic and genotypic variation and condition dependence of genital and non-genital morphology in water strider. *Genet. Res. Camb.* 71: 193-212.

- Arnqvist, G. 1997. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. *Biol. J. Linn. Soc.* 60: 365-379.
- Arnqvist, G. 1998. Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. *Nature* 393: 784-786.
- Bitner-Mathé, B. C. & L. B. Klaczko. 1999a. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal, microgeographical variation. *Genetica* 105: 35-42.
- Bitner-Mathé, B. C. & L. B. Klaczko. 1999b. Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. *Heredity* 83: 688-696.
- Bitner-Mathé, B. C. & L. B. Klaczko. 1999c. Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. *Genetica* 105: 203-210.
- Bitner-Mathé, B. C., Peixoto, A. A. & L. B. Klaczko. 1995. Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. *Heredity* 75: 54-61.
- Bond, J. E., Beamer, D. A., Hedin, M. C. & P. Sierwald. 2003. Gradual evolution of male genitalia in a sibling species complex of millipedes (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae: *Anadenobolus*). *Invert. Syst.* 17: 711-717.
- Bookstein, F.L. 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data. Geometry and Biology*. Cambridge University Press: New York.
- Breuer, M. E. & C. Pavan. 1950. Genitalia masculina de *Drosophila* (Diptera): grupo *annulimana*. *Rev. Bras. Biol.* 10(4): 469-488.
- Breuer, M. E. & C. Pavan. 1954. Genitalia masculina de *Drosophila* do grupo *dreyfusi* (Diptera). *Rev. Bras. Biol.* 14(4): 465-475.

- Coyne, J. A. & E. Beecham. 1987. Heritability of Two Morphological Characters Within and Among Natural Populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117: 727-737.
- Dobzhansky, Th. & C. Pavan. 1943. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. *Bol. Facult. Fil. Ciên. Letr. S. Paulo* 36: 7-72
- Eberhard, W. G. 1985. *Sexual selection and animal genitalia*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Eberhard, W. G. 1990. Animal Genitalia and Female Choice. *Amer. Sci.* 78: 134-141.
- Eberhard, W. G. 1993. Evaluating models of sexual selection: genitalia as a test case. *Am. Nat.* 142: 564-571.
- Eberhard, W. G. 2001. Species-specific genitalic copulatory courtship in sepsid flies (Diptera, Sepsidae, *Microsepsis*). *Evolution* 55: 93-102.
- Eberhard, W. G. 2004. Rapid divergent evolution of sexual morphology: comparative tests of antagonistic coevolution and traditional female choice. *Evolution* 58(9): 1947-1970.
- Falconer, D. S. & T. F. C. Mackay. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. Essex, Longman.
- Gilchrist, A. A. & L. Partridge. 2001. The contrasting genetic architecture of wing size and shape in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 86: 144-152.
- Haas, H. L. & K. A. Tolley. 1998. Geographic variation of wing morphology in three Eurasian populations of the fruit fly, *Drosophila lummei*. *J. Zool. (London)* 245: 197-203.
- Hoffmann, A. A. & J. Shirriffs. 2002. Geographic variation for wing shape in *Drosophila serrata*. *Evolution* 56(5): 1068-1073.
- Hosken, D. J. & P. Stockley. 2004. Sexual selection and genital evolution. *Trends Ecol. Evol.* 19: 87-93.

- House, C. M. & L. W. Simmons. 2003. Genital morphology and fertilization success in the dung beetle *Onthophagus taurus*: an example of sexually selected male genitalia. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 447-455.
- House, C. M. & L. W. Simmons. 2005. The evolution of male genitalia: patterns of genetic variation and covariation in the genital sclerites of the dung beetle *Onthophagus taurus*. *J. Evol. Biol.* 18(5): 1281-1292.
- Imasheva, A. G., Moreteau, B. & J. R. David. 2001. Growth temperature and genetic variability of wing dimensions in *Drosophila*: opposite trends in two sibling species. *Genet. Res. Camb.* 76: 237-247.
- Jennions, M. D. & C. D. Kelly. 2002. Geographical variation in male genitalia in *Brachyrhaphis episcopi* (Poeciliidae): is it sexually or naturally selected? *Oikos* 97: 79-86.
- Kelly, C. D., Godin, J.-G. J. & G. Abdallah. 2000. Geographic variation in the male intromittent organ of the Trinidadian guppy (*Poecilia reticulata*). *Can J. Zool.* 78: 1674-1680.
- Klaczko, L. B. 1995. Population genetics of *D. mediopunctata*. In: L. I. Levine, *Genetics of Natural Populations: The Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky*: 140-153. Columbia Univ. Press. New York.
- Kulikov, A. M., Melnikov, A. I., Gornostaev, N. G., Lazebny, O. E. & V. G. Mitrofanov. 2004. Morphological analysis of male mating organ in the *Drosophila virilis* species group: a multivariate approach. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 42: 135-144.
- Lessells, C. M. & P. T. Boag. 1987. Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *The Auk* 104: 116-121.
- Lüpold, S., Mcelligott, A. G. & D. J. Hosken. 2004. Bat genitalia: allometry, variation and good genes. *Biol. J. Linn. Soc.* 83: 497-507.

- Matta, B. P. & B. C. Bitner-Mathé. 2004. Genetic architecture of wing morphology in *Drosophila simulans* and an analysis of temperature effects on genetic parameter estimates. *Heredity* 93: 330-341.
- Mayr, E. 1963. *Animal species and evolution*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Monteiro, L. R., Vinícius, B. & S. F. Reis. Evolutionary integration and morphological diversification in complex morphological structures: mandible shape divergence in spiny rats (Rodentia, Echimyidae). *Evol. Dev.* 7 (5): 429-439.
- Moraes, E. M., Manfrin, M. H., Laus, A. C., Rosada, R. S., Bomfin, S. C. & F. M. Sene. 2004. Wing shape heritability and morphological divergence of the sibling species *Drosophila mercatorum* and *Drosophila paranaensis*. *Heredity* 92(5): 466-473.
- Norry, F. M., Vilaridi, J. C. & E. Hasson. 1997. Correlations among size-related traits are affected by chromosome inversions in an adaptative polymorphism in *Drosophila buzzatii*. *Heredity* 79: 585-590.
- Ohno, S., Hoshizaki, S., Ishikawa, Y., Tatsuki, S. & S. Akimoto. 2003. Allometry of male genitalia in a lepidopteran species, *Ostrinia latipennis* (Lepidoptera: Crambidae). *Appl. Entomol. Zool.* 38(3): 313-319.
- Orengo, D. J. & A. Prevosti. 1999. Wing-size heritability in a natural population of *Drosophila subobscura*. *Heredity* 82: 100-106.
- Pretorius, E. & C. H. Scholtz. 2001. Geometric morphometrics and the analysis of higher taxa: a case study based on the metendosternite of the Scarabaeoidea (Coleoptera). *Biol. J. Linn. Soc.* 74: 35-50.
- Roff, D. A. 1997. *Evolutionary Quantitative Genetics*. Chapman & Hall, New York.

- Rohlf, F. J. & D. E. Slice. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst. Zool.* 39: 40-59.
- Rohlf, F. J. & F. L. Bookstein. 2003. Computing the Uniform Component of Shape Variation. *Syst. Biol.* 52(1): 66-69.
- Rohlf, F. J. 1998. TpsDig, version 1.20. Department of Ecology and Evolution. State University of New York at Stony Brook. Available from <http://life.bio.sunysb.edu/morph>.
- Rohlf, F. J. 2004. TpsRelw, version 1.39. Department of Ecology and Evolution. State University of New York at Stony Brook. Available from <http://life.bio.sunysb.edu/morph>.
- Rohlf, F. J. 2003. TpsSmall, version 1.20. Department of Ecology and Evolution. State University of New York at Stony Brook. Available from <http://life.bio.sunysb.edu/morph>.
- Rowe, L., Arnqvist, G. Sih, A. & J. J. Krupa. 1994. Sexual conflict and the evolutionary ecology of mating patterns: water striders as a model system. *Tree* 9(8): 289-293.
- Scudder, G. G. E. 1971. Comparative morphology of insect genitalia. *Annu. Rev. Ent.* 16: 379-406.
- Shapiro, A. M. & A. H. Porter. 1989. The lock-and-key hypothesis evolutionary and biosystematic interpretation of insect genitalia. *Ann. Rev. Entomol.* 34: 231-245.
- Sirota, L. K. 2003. The evolution of insect mating structures through sexual selection. *Florida Entomol.* 86(2): 124-133.
- Slice, D. E. 1996. Three-dimensional generalized resistant fitting and the comparison of least squares and resistant fit residuals. In: *Advances in Morphometrics*: 179-200 (Marcus, L. F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G., & D. E. Slice, eds.). Plenum, New York.
- Thomas, R. H. & J. S. F. Barker. 1993. Quantitative genetic analysis of the body size and shape of *Drosophila buzzatii*. *Theor. Appl. Genet.* 85: 598-608.

- Tidon-Sklorz, R. & F. M. Sene. 1995. Evolution of the *buzzatii* cluster (*Drosophila repleta* species group) in middle South America. *Evolución Biológica* 8 y 9: 71-85.
- Tidon-Sklorz, R. 1992. Identificação da fauna de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) da Cadeia do Espinhaço, e análise morfométrica das populações da espécie politípica *D. serido*. Ph.D Thesis, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- Val, F. C., Vilela, C. R. & M. D. Marques. 1981. Drosophilidae of neotropical region. In: M. Ashburner, Carson, H. C. & J. N. Thompson, Jr. (eds), *The genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3a. London: Academic Press.
- Vilela, C. R. & G. Bachli. 1990. Taxonomic studies on Neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Mitt. Schweiz. Ent. Ges.* 63: 1-332 (Suppl.).
- Vilela, C. R. 1983. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Revta Bras. Ent.* 27: 1-114.
- Vilela, R. C. & M. A. Q. P. Pereira. 1985. On the male genitalia of five species of the *tripunctata* group of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Ent.* 29(3/4): 453-461.
- Wheeler, M. R. & M. P. Kambysellis. 1966. Notes on the Drosophilidae (Diptera) of Samoa. *Univ. Texas Publs.* 6615: 533-565.
- Wilcockson, R. W., Crean, C. S. & T. H. Day. 1995. Heritability of a sexually selected character expressed in both sexes. *Nature* 374: 158-159.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho descrevemos a morfologia do edeago e da asa de *D. mediopunctata* para uma única população (Mata Santa Genebra), empregando estatística básica e morfometria geométrica. Testamos o comportamento de medidas lineares e do tamanho do centróide e forma do edeago em duas temperaturas. Também fornecemos estimativas das herdabilidades natural e do laboratório para medidas lineares, tamanho do centróide e escores das deformações relativas (“RW”) de ambos os órgãos.

Os resultados obtidos foram analisados e discutidos com relação a três hipóteses principais que tratam da evolução da genitália (chave-e-fechadura, pleiotropia e seleção sexual), com o propósito de corroborá-las ou refutá-las. A seguir, estão enumerados os resultados fundamentais:

1. Moscas criadas a 16.5°C tiveram os edeagos maiores do que as criadas a 20°C.
2. A área apical do edeago foi responsável pela maior parte da variação em forma. Esta área foi localizada empregando a função interpolante “thin-plate spline”.
3. Várias correlações fenotípicas positivas foram encontradas entre as medidas de ambos os órgãos. Contudo, herdabilidades efetivas foram encontradas para cinco medidas do edeago (BF, CE, CG, EH, and GH) e uma para a asa (CD). Para a forma do edeago e asa, herdabilidade efetiva foi encontrada em um dos componentes não-uniforme.
4. Os coeficientes de variação das medidas foram, em média, maiores no edeago do que na asa.

Por fim, duas conclusões podem ser extraídas a partir destes achados: primeira, a metodologia utilizada permitiu obter resultados consistentes e confiáveis para analisar o tamanho

e forma do edeago; segunda, nossos resultados não apóiam a hipótese chave-e-fechadura, mas não nos permitem refutar as hipóteses da pleiotropia e seleção sexual. Embora este estudo tenha se concentrado exclusivamente no órgão intromitente, é recomendável analisar a contrapartida na genitália feminina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, C.A.C. 2001. Variação morfológica nos edeagos de *Drosophila mediopunctata*. Tese de Mestrado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Estadual de Campinas.
- Andrade, C.A.C., Hatadani, L. M. & L. B. Klaczko. 2005. Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*: Effect of the temperature. *J. Therm. Biol.* 30: 518-523.
- Arnqvist, G. 1997. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. *Biol. J. Linn. Soc.* 60: 365-379.
- Arnqvist, G. & R. Thornhill. 1998. Evolution of animal genitalia: patterns of phenotypic and genotypic variation and condition dependence of genital and non-genital morphology in water strider. *Genet. Res. Camb.* 71: 193-212.
- Bitner-Mathé, B. C. & L.B. Klaczko. 1999a. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal, microgeographical variation. *Genetica* 105(1): 35-42.
- Bitner-Mathé, B. C. & L. B. Klaczko. 1999b. Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. *Genetica* 105: 203-210.
- Bitner-Mathé, B. C., Peixoto, A. A. & L. B. Klaczko. 1995. Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. *Heredity* 75: 54-61.
- Bookstein, F. L. 1978. The measurement of biological shape and shape change. *Lecture notes in biomathematics*, vol. 24, Springer-Verlag, New York, 191 pp.
- Bookstein, F.L. 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data. Geometry and Biology.* Cambridge University Press: New York.

- Bookstein, F.L., Chernoff., Elder, R.L., Humphries, J.M., Smith, G.R. & R. E. Strauss. 1985. *Morphometrics in Evolutionary Biology*. Academy of Natural Sciences, Philadelphia, PA.
- Breuer, M. E. & C. Pavan. 1950. Genitalia masculina de *Drosophila* (Diptera): grupo *annulimana*. *Rev. Bras. Biol.* 10(4): 469-488.
- Breuer, M. E. & C. Pavan. 1954. Genitalia masculina de *Drosophila* do grupo *dreyfusi* (Diptera). *Rev. Bras. Biol.* 14(4): 465-475.
- De Moed, G. H., de Jong, G. & W. Scharloo. 1997. The phenotypic plasticity of wing size in *Drosophila melanogaster*: the cellular basis of its genetic variation. *Heredity* 79: 260-267.
- Debat, V. & P. David. 2001. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends Ecol. Evol.* 16(10): 555-561.
- Eberhard, W. G. & N. Ramirez. 2004. Functional morphology of the male genitalia of four species of *Drosophila*: Failure to confirm both lock and key and male-female conflict. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97(5): 1007-1017.
- Eberhard, W. G. 1990. Animal Genitalia and Female Choice. *Amer. Sci.* 78: 134-141.
- Eberhard, W. G. 2001. Species-specific genitalic copulatory courtship in sepsid flies (Diptera, Sepsidae, *Microsepsis*). *Evolution* 55: 93-102.
- Eberhard, W. G. 1993. Evaluating models of sexual selection: genitalia as a test case. *Am. Nat.* 142: 564-571.
- Falconer, D. S. & T. F. C. Mackay. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. Essex, Longman.
- Falconer, D. S. 1981. *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman, New York.

- Gothard, K. & S. Nylin, 1995. Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation: a selective review of plasticity in animal morphology and life history. *Oikos* 74: 3-17.
- Hoffmann, A. A., Woods, R. E. Collins, E., Wallin, K., White, A. & J. A. McKenzie. 2005. Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insects. *Australian J. Entomol.* 44: 233-243.
- Horton, D. R. & T. M. & Lewis. 2005. Size and shape differences in genitalia of males from sympatric and reproductively isolated populations of *Anthocoris antevolens* White (Heteroptera: Anthocoridae) in the Yakima Valley, Washington. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98(4): 527-535.
- Hosken, D.J. & P. Stockley. 2004. Sexual selection and genital evolution. *Trends Ecol. Evol.* 19: 87-93.
- House, C. M. & L. W. Simmons. 2005. The evolution of male genitalia: patterns of genetic variation and covariation in the genital sclerites of the dung beetle *Onthophagus taurus*. *J. Evol. Biol.* 18(5): 1281-1292.
- Huber. B. A., Rheims, C. A., & A. D. Brescovit. 2005. Two new species of litter-dwelling Metagonia spiders (Araneae, Pholcidae) document both rapid and slow genital evolution. *Acta Zool. (Stockholm)* 86: 33-40.
- Jennions, M. D. & C. D. Kelly. 2002. Geographical variation in male genitalia in *Brachyrhaphis episcopi* (Poeciliidae): is it sexually or naturally selected? *Oikos* 97: 79-86.
- Klingenberg, C. P., Barluenga, M. & A. Meyer. 2003. Body shape variation in cichlid fishes of the *Amphilophus citrinellus* species complex. *Biol. J. Linn. Soc.* 80: 397-408.
- Kulikov , A. M., Melnikov, A. I., Gornostaev, N. G., Lazebny, O. E. & V. G. Mitrofanov. 2004. Morphological analysis of male mating organ in the *Drosophila virilis* species group: a multivariate approach. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 42: 135-144.

- Lessels, C. M. & P. T. Boag. 1987. Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk* 104: 116-121.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Cambridge, Mass.: Harvard University Press.
- Monteiro, L. R. 1997. Allometric growth and functional integration in the skull of the black caiman *Melanosuchus niger* (Crocodylia: Alligatoridae). A Jackknife approach. *Rev. Bras. Biol.* 57(1): 31-37.
- Monteiro, L. R., Diniz-Filho J. A. F., Reis, S. F. & E. D. Araújo. 2002. Geometric estimates of heritability in biological shape. *Evolution* 56: 563-572.
- Monteiro-Filho, E. L. A., Monteiro, L. R. & S. F. Reis. 2002. Skull shape and size divergence in dolphins of the genus *Sotalia*: a tridimensional morphometric analysis. *J. Mamm.* 83(1): 125-134.
- Monteiro, L. R., Bonato, V. & S. F. Reis. 2005. Evolutionary integration and morphological diversification in complex morphological structures: mandible shape divergence in spiny rats (Rodentia, Echimyidae). *Evol. Dev.* 7(5): 429-439.
- Moraes, E. M., Manfrin, M. H., Laus, A. C. Rosada, R. S. Bomfin, S. C. & F. M. Sene. 2004. Wing shape heritability and morphological divergence of the sibling species *Drosophila mercatorum* and *Drosophila paranaensis*. *Heredity* 92(5): 466-473.
- Neff, N. A. & L. F. Marcus. 1980. A survey of multivariate methods for systematics. Privately published, N. Y.
- Noach, E. J. K., de Jong, G. & W. Scharloo. 1997. Phenotypic plasticity of wings in selection lines. *Heredity* 79: 1-9.
- Parsons, K. J., Robinson, B. W. & T. Hrbek. 2003. Getting into shape: An empirical comparison of traditional truss-based morphometric methods with a newer geometric method applied New World cichlids. *Environm. Biol. Fishes* 67: 417-431.

- Partridge, L., Barrie, B., Fowler, K. & V. French. 1994. Evolution and development of body size and cell size in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. *Evolution* 48(4): 1269-1276.
- Pigliucci, M. & C. R. Schlichting. 1996. Reaction norms of Arabidopsis. IV. Relationships between plasticity and fitness. *Heredity* 76: 427-436.
- Pigliucci, M. 1996. Modelling phenotypic plasticity. II. Do genetic correlations matter? *Heredity* 77: 453-460.
- Pomiankowski, A. & A. P. Moller. 1995. A resolution of the lek paradox. *Proc. R. Soc. Lond. B* 260: 21-29.
- Reis, S. F. 1988. Morfologia e estatística multivariada em Biologia Evolutiva. *Rev. Bras. Zool.* 5(4): 571-580.
- Reis, S. F., Cunha, R. A., Garavello, J. C. & A. A. Abe. 1987. Discriminação pela forma em relação ao tamanho: um exemplo com peixes do gênero *Leporinus*. *Ciência e Cultura* 39(8): 757-761.
- Reyment, R. A. 1991. *Multidimensional palaeobiology*. Pergamon Press.
- Reyment, R. A. 1996. An idiosyncratic history of early morphometric. In: Marcus, L., Corti, M., Loy, A., Naylor, G., Slice, D. E. (eds.), *Advances in Morphometrics*. NATO ASI Series A: Life Sciences, vol. 284. Plenum Publishing Corp., New York.
- Rohlf, F. J. 1998. TpsDig, version 1.20. Department of Ecology and Evolution. State University of New York at Stony Brook. Available from <http://life.bio.sunysb.edu/morph>.
- Rohlf, F.J. & L.F. Marcus. 1993. A revolution in morphometrics. *Tree* 8: 129-132.
- Rowe, L., Arnqvist, G. Sih, A. & J. J. Krupa. 1994. Sexual conflict and the evolutionary ecology of mating patterns: water striders as a model system. *Tree* 9(8): 289-293.

- Scudder, G. G. E. 1971. Comparative morphology of insect genitalia. *Ann. Rev. Ent.* 16: 379-406.
- Shapiro, A. M. & A. H. Porter. 1989. The lock-and-key hypothesis evolutionary and biosystematic interpretation of insect genitalia. *Ann. Rev. Entomol.* 34: 231-245.
- Silva, A. F. G. & F. M. Sene. 1991. Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Ent.* 35: 455-468.
- Sota, T. & K. Kubota. 1998. Genital lock-and-key as a selective agent against hybridization. *Evolution* 52: 1507-1513.
- Strauss, R. E. & F. L. Bookstein. 1982. The truss: body form reconstructions in morphometrics. *Syst. Zool.* 31: 113-135.
- Strauss, R. E. 1988. Programa "Distance 2.0" escrito e cedido pelo autor.
- Tatsuda, H., Mizota, K. & S. Akimoto. 2001. Allometric Patterns of Heads and Genitalia in the Stag Beetle *Lucanus maculifemoratus* (Coleoptera: Lucanidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94(3): 462-466.
- Thomas, R. H. & J. S. F. Barker. 1993. Quantitative genetic analysis of the body size and shape of *Drosophila buzzatii*. *Theor. Appl. Genet.* 85: 598-608.
- Thompson, D. W. 1917. On Growth and Form. Cambridge University Press.
- Turelli, M. 1988. Phenotypic plasticity, constant covariances, and the maintenance of additive variance. *Evolution* 42: 1342-1347.
- Via, S. & R. Lande. 1985. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39: 505-522.
- West-Eberhard, M. J. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Ann. Rev. Syst.* 20: 249-278.
- Wheeler, M. R. & M. P. Kambyzellis. 1966. Notes on the Drosophilidae (Diptera) of Samoa. *Univ. Texas Publs.* 6615: 533-565.