



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ecologia

Plasticidade fenotípica de características relacionadas ao valor adaptativo sob diferentes temperaturas em *Drosophila cardini* Sturtevant, 1916

Felipe Alves de Brito Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Tidon

Brasília, 2014



Universidade de Brasília

FELIPE ALVES DE BRITO OLIVEIRA

Plasticidade fenotípica de características relacionadas ao valor adaptativo sob diferentes temperaturas em *Drosophila cardini* Sturtevant, 1916

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Tidon

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Brasília, DF

2014

Dissertação de Mestrado

FELIPE ALVES DE BRITO OLIVEIRA

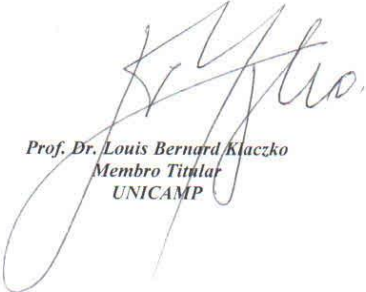
Título:

“Plasticidade fenotípica de características relacionadas ao valor adaptativo
sob diferentes temperaturas em *Drosophila cardini*”


Banca Examinadora:



Profa. Dra. Rosana Tidon
Presidente / Orientadora
GEM/UnB



Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko
Membro Titular
UNICAMP



Prof. Dr. Edson Ryōjiti Sujii
Membro Titular
Embrapa

Profa. Dra. Regina Helena Ferraz Macedo
Membro Suplente
ZOO/UnB

Brasília, 24 de março de 2014.

AGRADECIMENTOS

Como disse John Donne, nenhum homem é uma ilha isolada. Este trabalho é fruto da contribuição direta e indireta de várias pessoas que têm seu espaço na minha história de vida.

Gostaria de agradecer, primeiramente, à minha família. Sem esse alicerce *eu nada seria*. Especialmente aos meus pais, Lourenço e Maria, que sempre me apoiaram em minhas decisões. Pessoas maravilhosas! Meus maiores exemplos, meus heróis. Não há palavras capazes de descrever o amor e admiração que sinto e tenho por vocês.

Aos meus irmãos, Lucas e Rafael, pela convivência e amizade maravilhosas. Vocês são feras! Amo-os!

Ao meu vira-lata e fiel escudeiro, o Tito, que me foi a melhor companhia possível em vários momentos com seu silêncio que preenche.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Rosana Tidon, pelo papel fundamental na minha formação como pesquisador e consultor de assuntos aleatórios. Muito obrigado por ter me aceitado de maneira tão afetuosa, mesmo eu não tendo nenhum vínculo prévio com o laboratório. Agradeço imensamente por ter instigado a minha curiosidade científica, em particular sobre o assunto mais belo e intrigante da Biologia: Evolução.

À Prof.^a Dr.^a Blanche Bitner Mathé e ao Dr. Felipe Rocha Bastos, pelas sugestões e disponibilidade para tirar dúvidas quanto às análises.

Aos meus estimados colegas do laboratório. Foi um prazer ter convivido com vocês. Obrigado pelas amizades que nasceram e pelas amizades que foram fortalecidas. Bárbara, Benjo, Francisco, Henrique, Iago, João Heitor, Jonas, Marcos (Triste), Natália (Diboas),

Profª Nilda, Pedro Henrique (Senseless), Pedro Paulo e Renata. Muito obrigado pela parceria no projeto, Stefânia. Sua colaboração foi essencial.

Aos colegas de mestrado (Alan, Denise, Felipe, Gabriel, Guth, Ingrid, Pablo, Paulo, Pedro, Pietro, Thiago e Vivian) pelas discussões, viagens a campo, risadas e cervejas. Foi bonito, foi!

À minha amiga Isadora Oliveira. Obrigado por ter me inscrito no processo de seleção mesmo quando eu estava em dúvida.

À Prof.ª Dr.ª Ivone Rezende Diniz. Só eu sei o quanto foi importante o tempo em que fui seu aluno.

À Debora Resende e à Lorena Andreoli. Obrigado pela ajuda na coleta dos dados e pelo companheirismo. Ao Krishna Milani, agradeço por ter disponibilizado parte de sua folga para nos ajudar.

Aos amigos Luiz Felipe Lima Silveira, Marcelo Moussallem, Guilherme Rezende Dias e Thiago Silva Soares, que, mesmo a distância, foram pessoas fantásticas no meu processo de formação científica. Muito obrigado pela amizade, acima de qualquer outra coisa.

Ao SCAP (Bocão, Dioja, Elietchenko, Gorduras, Guthera, Dione, Magna, Mamoeiro, Pipi, Radan, Tristubas e Vitão) pela amizade verdadeira e fraternal. Uma bela família vocês são pra mim. Pipapaparopó, I'm a SCAPMAN!

Aos amigos da Biologia e agregados por me proporcionarem discussões tão diversas e enriquecedoras que me ajudaram na minha formação como pesquisador e, sobretudo, pessoa. Pessoal do 'peidarada', muito obrigado – também – pelos artigos, muitos deles foram essenciais para este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da UnB e a todos os professores que proporcionam um ambiente de excelente qualidade para a produção científica do Brasil.

À Reserva Ecológica do IBGE, por permitir a coleta das moscas e pela atenção dedicada sempre quando houve algum empecilho.

Ao CNPq, pela bolsa de estudo a mim concedida e pelos recursos disponibilizados para cursos e custeio de equipamentos utilizados para a realização dos experimentos.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	3
Introdução	5
Teoria evolutiva e plasticidade fenotípica.....	5
<i>Drosophila cardini</i>	9
História de vida.....	10
Objetivos geral e específicos.....	11
Metodologia	12
Coleta dos dados.....	12
Análise dos dados.....	15
Resultados	20
Normas de reação e valores médios.....	20
Efeito da temperatura, genótipo e da interação entre eles.....	24
Variação entre e dentro das linhagens.....	27
Ponto ótimo.....	29
Discussão	31
Normas de reação.....	31
Efeito dos fatores na determinação das características fenotípicas.....	36
Variação entre as linhagens.....	37
Variação dentro das linhagens e <i>stress</i>	38
Temperatura ótima.....	40
Considerações finais.....	41
Referências	43
Material Suplementar	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Casal de *Drosophila cardini*. Macho à esquerda e fêmea à direita.....10
- Figura 2.** Ovários de *Drosophila*. (A) ilustração esquemática dos ovariolos de *Drosophila*. (B) foto de ovários de *D. cardini*.....14
- Figura 3.** Normas de reação do tempo de desenvolvimento de ovo a adulto (dias) em diferentes temperaturas de desenvolvimento. (A) normas de reação das 12 linhagens estudadas. (B) norma de reação média observada (linha tracejada) e ajustada com um polinômio de 2º grau (linha contínua).....20
- Figura 4.** Normas de reação do número de ovariolos em diferentes temperaturas de desenvolvimento. (A) normas de reação das 12 linhagens estudadas. (B) norma de reação média observada (linha tracejada) e ajustada com um polinômio de 2º grau (linha contínua).....21
- Figura 5.** Normas de reação da viabilidade em diferentes temperaturas de desenvolvimento. (A) normas de reação das 12 linhagens estudadas. (B) norma de reação média observada (linha tracejada) e ajustada com um polinômio de 2º grau (linha contínua).....21
- Figura 6.** Coeficientes de variação de três características de *D. cardini* sob diferentes temperaturas de desenvolvimento. (A) tempo de desenvolvimento. (B) número de ovariolos. (C) viabilidade. Todos os coeficientes foram multiplicados por 100. Barras verticais indicam o desvio padrão. As letras representam as divisões dos agrupamentos produzidos em função das diferenças observadas.....28
- Figura 7.** Normas de reação do valor adaptativo potencial (azul) e do tempo de desenvolvimento (vermelho).....29
- Figura 8.** Variação térmica ao longo do ano na área de estudo (RECOR-IBGE). Os dados foram obtidos durante o período de 2010 a 2013. Linha contínua, temperatura média; linhas tracejadas, temperaturas máximas e mínimas.....30

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores médios (\pm erro padrão) de cada característica estudada de acordo com a temperatura de desenvolvimento larval. Foram utilizadas as médias obtidas a partir do agrupamento das 12 linhagens isofêmeas avaliadas.....**22**
- Tabela 2.** Número de normas de reação com ajuste polinomial significativo de três características fenotípicas de *D. cardini*.....**23**
- Tabela 3.** Valores característicos das normas de reação produzidas a partir de polinômios de 2º grau das três características estudadas: tempo de desenvolvimento de ovo a adulto (dias), número de ovariolos e viabilidade (proporção de ovos que atingem a fase adulta). TMV, temperatura de maior ou menor valor; MV, maior ou menor valor; CV, coeficiente de variabilidade.....**24**
- Tabela 4.** Contribuição de cada fator na variância total do tempo de desenvolvimento, número de ovariolos e viabilidade. ns, não significativo; ***, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$**25**
- Tabela 5.** Aumento ou diminuição dos valores de cada característica entre as temperaturas de desenvolvimento larval. Tempo de desenvolvimento (\log_{10} dias), número de ovariolos e viabilidade (arcoseno da raiz quadrada). ns, não significativo; ***, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$**26**
- Tabela 6.** Análise de variância de 2 fatores sobre os coeficientes de variação (CV) do tempo de desenvolvimento, número de ovariolos e viabilidade. ns, não significativo; ***, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$**27**

LISTA DE MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1. Esquema da primeira parte do desenho experimental.....	58
Figura S2. Esquema da segunda parte do desenho experimental.....	59
Receita meio de cultura de fubá.....	60
Receita grupo Jean-David.....	61
Receita meio de cultura simplificado.....	61
Tabela S1. Estatísticas descritivas do tempo de desenvolvimento de ovo a adulto (dias). Todas as linhagens foram agrupadas.....	62
Tabela S2. Estatísticas descritivas do número de ovariolos. Todas as linhagens foram agrupadas.....	62
Tabela S3. Estatísticas descritivas a viabilidade. Todas as linhagens foram agrupadas.....	63
Tabela S4. Anova de 2 fatores do tempo de desenvolvimento.....	63
Tabela S5. Anova de 2 fatores do número de ovariolos.....	64
Tabela S6. Anova de 2 fatores da viabilidade.....	64
Tabela S7. Parâmetros polinomiais das funções que descrevem o tempo de desenvolvimento (dias), número de ovariolos e viabilidade das 12 linhagens isofêmea utilizadas e valores característicos derivados das funções. MV = valor máximo ou mínimo, TMV = Temperatura de valor máximo ou mínimo.....	65
Tabela S8. Parâmetros polinomiais das funções que descrevem valor adaptativo e tempo de desenvolvimento de cada linhagem isofêmea de <i>D. cardini</i> . gif = parâmetros do valor adaptativo; gid = parâmetros tempo de desenvolvimento; TMF = temperatura de maior valor adaptativo potencial; TMT = temperatura de menor tempo de desenvolvimento; TMD = temperatura de maior diferença entre tempo de desenvolvimento e valor adaptativo potencial.....	66

RESUMO

A teoria evolutiva vigente, a Síntese Moderna, tem sido alvo de críticas na atualidade e muitos autores reivindicam uma nova síntese evolutiva, que vem sendo chamada de Síntese Evolutiva Estendida. Dentre os pontos criticados, está o entendimento ainda restrito acerca da relação entre o genótipo e o fenótipo.

Considera-se que a plasticidade fenotípica desempenha um papel de extrema importância na evolução, e que esse fenômeno deve ser investigado a fim de entendermos melhor a relação genótipo-fenótipo. A partir do uso de normas de reação e modelos matemáticos capazes de descrevê-las, é possível interpretar a plasticidade de forma simples e objetiva.

A temperatura é um fator abiótico de extrema relevância na determinação do fenótipo, principalmente, em organismos ectotérmicos. Se considerarmos o cenário das mudanças climáticas, é urgente a compreensão de como esse fator interfere na formação das diferentes características dos organismos.

No presente trabalho, utilizamos *Drosophila cardini* como organismo modelo para investigar a plasticidade de características diretamente relacionadas à história de vida sob diferentes temperaturas de desenvolvimento (14°C, 17°C, 21°C, 25°C e 28°C) em diferentes linhagens. Investigamos como a temperatura, o genótipo e a interação destes influenciam na determinação do tempo de desenvolvimento de ovo a adulto, no número de ovariolos e na viabilidade das moscas.

Os resultados que obtivemos mostram que as normas de reação no contexto estudado são tipicamente não lineares. As normas de reação das características avaliadas foram muito semelhantes entre as linhagens, mas notavelmente específicas para cada

característica. A partir destes resultados, acreditamos que a formação do fenótipo está limitada pelo desenvolvimento.

A temperatura foi o fator mais importante na determinação das características avaliadas. As duas extremas (14°C e 28°C) foram consideradas estressantes para a espécie.

A partir de uma análise conjunta das características obtivemos um ponto ótimo condizente com as condições naturais enfrentadas pela população examinada, mesmo que os pontos ótimos de cada característica, isoladamente, tenham sido bastante diferentes uns dos outros.

ABSTRACT

Current evolutionary theory, known as the Modern Synthesis, has been criticized in recent years. Accordingly, many authors are proposing a new evolutionary synthesis, which has been called the Extended Evolutionary Synthesis. One of the topics criticized is the limited knowledge of the relationship between genotype and phenotype.

Phenotypic plasticity has been considered to play a critical role in evolution, and this phenomenon should be investigated in order to improve the understanding of the genotype-phenotype relationship. By using reaction norms and mathematical models to describe them, it is possible to interpret plasticity in a simple and objective manner.

Temperature is an abiotic factor of utmost importance in determining the phenotype, especially in ectothermic organisms. If we consider the scenario of climate change, we urgently need to understand its effects on the expression of different traits of organisms.

In the present study, we used *Drosophila cardini* as a model to investigate the plasticity of traits directly related to the life history of different strains at different rearing temperatures (14°C, 17°C, 21°C, 25°C and 28°C). We investigated how temperature, genotype and their interaction influence the determination of development time from egg to adult, the number of ovarioles and viability of flies.

Our results show that the reaction norms for these traits in the present context are typically nonlinear and similar between strains, but they were remarkably specific for each trait. From these results, we suggest that their expression is somehow limited by developmental constraints.

Temperature was the most important factor in determining the characteristics evaluated and the extremes (14 ° C and 28 ° C) were considered stressful for the studied species.

The optima temperatures for the three traits we analyzed are in the range of the temperatures observed under natural conditions faced by the population surveyed. Despite this, the optimal temperature for each trait alone was quite different from the others.

INTRODUÇÃO

Teoria evolutiva e plasticidade fenotípica

A teoria evolutiva vigente, conhecida por Síntese Moderna, é o resultado da incorporação das (re)descobertas de Mendel às ideias de Darwin. Esta teoria se encontra balizada nos trabalhos de Fisher, Wright e Haldane que fundamentaram a genética de populações a partir da síntese quantitativa da genética e da seleção natural. Esta teoria é apoiada em um programa centrado no gene (West-Eberhard 2003).

Mayr (1982) defendeu, em uma abordagem histórica, que o estudo focado no gene - em detrimento dos processos do desenvolvimento - foi necessário para a investigação de diversas questões complexas daquela época. O resultado dessa abordagem é que, em estudos experimentais, a sensibilidade ao ambiente passou a ser considerada um viés indesejado ou então ignorada, ao invés de ser investigada como um fator potencialmente importante na evolução (Schlichting & Pigliucci 1998, West-Eberhard 2003).

Pesquisadores de diversas áreas da Biologia criticam alguns aspectos da Síntese Moderna, principalmente a negligência de conceitos que estendem seu escopo original, como a herança epigenética (Jablonka & Lamb 1998, Schlichting & Pigliucci 1998, Morgan et al. 1999, Pigliucci 2001, West-Eberhard 2003, Jablonka & Lamb 2005). Estas críticas ao atual programa evolutivo levaram vários autores a julgar necessário o advento de uma nova síntese, que vem sendo chamada de Síntese Evolutiva Estendida (Pigliucci & Muller 2010).

Para se atingir uma nova síntese coerente, será necessário enfrentar os problemas da teoria atual e explicar suas falhas. West-Eberhard (2003) aponta a existência de seis principais inconsistências. Para ela, o problema mais urgente a ser resolvido é a

centralização de explicações evolutivas nos genes uma vez que o fenômeno que persistimos e estamos interessados em explicar é o fenótipo. A esse problema a autora intitula: “problema fenótipo-genótipo”. Lewontin (1974) já alertava sobre a excessiva preocupação dos estudos de genética de populações alegando que “no entusiasmo deles [pesquisadores de genética de populações] em lidar com mudanças na frequência gênica por trás das mudanças evolutivas, acabam esquecendo que o que deve ser explicado em última análise são as inumeráveis e sutis mudanças no tamanho, forma, comportamento e interações com outras espécies que constituem o verdadeiro material da evolução”¹. Pode-se dizer então que a síntese atual incorporou de maneira incompleta e inadequada o contexto ecológico, em particular as diversas ramificações das interações genótipo-ambiente (Schlichting & Pigliucci 1998).

Ao longo da história, o papel do ambiente nas teorias evolutivas mudou bastante à medida que estas eram formuladas. Para Lamarck, o ambiente tinha a função de moldar as diferentes formas animais, através do uso e desuso, e as mudanças ocasionadas por esse processo eram passadas para as gerações seguintes, pela herança dos caracteres adquiridos. No contexto do lamarckismo, à medida que o ambiente vai “moldando” as linhagens evolutivas, elas progredem em direção ao aumento da complexidade (Ridley 2006). Para Darwin, por outro lado, o ambiente era um agente selecionador de variações (também surgidas por uso e desuso de características diferenciais), não a causa proximal dessas variantes. Na teoria darwinista, as variantes selecionadas pelo ambiente seriam transmitidas à prole pela herança dos caracteres adquiridos. No modelo da síntese moderna, onde as teorias de Mendel foram incorporadas, apesar do entendimento de que

¹ Population geneticists, in their enthusiasm to deal with the changes in genotype frequencies that underlie evolutionary changes, have often forgotten that what are ultimately to be explained are the myriad and subtle changes in size, shape, behavior, and interactions with other species that constitute the real stuff of evolution

o ambiente desempenha um papel importante na determinação das características, as pesquisas foram centradas no fator genético. O ambiente deixa de ter um papel fundamental na origem das variações sobre as quais a seleção (conjuntamente com outros mecanismos evolutivos) atua.

Nesse modelo o ambiente é entendido como um causador de ruído, o qual interfere no fenótipo, atuando sobre o que estaria pré-determinado pelo genótipo. Isso fica evidente nos cálculos de herdabilidade, por exemplo, em que o fator não genético é desconsiderado, sendo definida como a proporção genética da variação fenotípica total. (Falconer et al. 1996, Hartl & Clark 1997).

O conceito de plasticidade fenotípica foi proposto por Bradshaw na década de 1960, e desde então tem sido reformulado e é objeto de discussão até os dias de hoje. Neste estudo, a plasticidade fenotípica está sendo definida como a propriedade de um determinado genótipo produzir diferentes fenótipos em resposta a diferentes condições ambientais (Schlichting & Pigliucci 1998, Pigliucci 2001). Várias outras definições existem e uma outra maneira de pensar em plasticidade fenotípica é a expressão do fenótipo induzida pelo ambiente (DeWitt & Scheiner 2004). Estudar a plasticidade, entendendo a complexidade das respostas dos organismos devido a mudanças em seu ambiente, é extremamente relevante, sobretudo considerando o atual panorama de mudanças climáticas (Chown et al. 2007, Hoffmann & Sgro 2011, Merilä & Hendry 2014).

A plasticidade, como paradigma, tem um significado tão amplo e apelativo que, provavelmente, engloba toda a Biologia (genética, ecologia, evolução, biologia do desenvolvimento, fisiologia etc.) (Schlichting & Pigliucci 1998). Por muito tempo a plasticidade foi ignorada ou até mesmo entendida como um efeito não desejado, como

um “erro” no processo de desenvolvimento. Hoje, entretanto, o foco é entender como e por que a plasticidade ocorre. Essa mudança de abordagem reflete o nosso entendimento de que a plasticidade é um poderoso mecanismo de adaptação (Moczek et al. 2011). Os impactos da plasticidade fenotípica na evolução são diversos, de forma que é necessário investigar evidências que indiquem se a plasticidade influencia a evolução, de que maneira e sob quais circunstâncias (Wund 2012).

O termo norma de reação refere-se ao conjunto de fenótipos produzidos por um genótipo, quando exposto a diferentes condições ambientais. É a curva que descreve a resposta do genótipo em função do ambiente, a representação gráfica da plasticidade fenotípica. O conceito de norma de reação consegue ser ainda mais amplo que o conceito de plasticidade fenotípica, já que abrange todas as possibilidades de resposta, inclusive a não alteração no fenótipo mesmo que haja mudança no ambiente, ou seja, mesmo quando não há plasticidade. A expressão foi originalmente cunhada pelo alemão Woltereck em 1909, revitalizada pelo russo Schmalhaussen em 1946, e posteriormente traduzida por Dobzhansky em 1949 do russo para o inglês (Schlichting & Pigliucci 1998, Pigliucci 2001, DeWitt & Scheiner 2004). Apesar desse conceito ser relativamente antigo, o interesse em estudos de plasticidade fenotípica e normas de reação pode ser traçado a partir dos trabalhos de Levins e Bradshaw nos anos 1960 e 1970 (Bradshaw 1965, Schlichting & Pigliucci 1998, DeWitt & Scheiner 2004).

Gavrilets & Scheiner (1993) sugeriram que as normas de reação não lineares poderiam ser descritas por modelos matemáticos. Desde então, com o intuito de caracterizar as normas de reação, foram feitas algumas abordagens com o uso de curvas logísticas (Gibert et al. 1998), derivadas empíricas e ajustes polinomiais (David et al. 1997).

Drosophila cardini

Muitos organismos são utilizados como modelos biológicos, e dentre eles as moscas do gênero *Drosophila* tem se destacado em várias áreas de estudo (Powell 1997). Isso se deve ao seu curto ciclo de vida, tamanho reduzido, facilidade de amostragem e manipulação em laboratório, além de uma vasta literatura com técnicas laboratoriais voltadas para este organismo (Markow & O'Grady 2005).

O grupo *D. cardini*, pertencente ao subgênero *Drosophila*, é composto por dezesseis espécies, todas elas com distribuição predominantemente Neotropical (Markow & O'Grady 2006). Apesar de sua alta representatividade nessa região, ainda são relativamente poucos os estudos referenciando este grupo, conforme afirmado por Val et al. (1981) há mais de três décadas atrás. Os principais estudos com este grupo são relativos à filogenia, pigmentação e distribuição (Hollocher et al. 2000, Brisson et al. 2006, Cenzi De Ré et al. 2010, Emerich et al. 2012). Até onde sabemos, este é o primeiro estudo sobre a plasticidade fenotípica de uma espécie desse grupo.

Drosophila cardini é uma espécie de ampla distribuição, ocupando a América do Sul, as ilhas do Caribe e parte da América do Norte (Bächli, 2013), além de haver registros para o arquipélago havaiano (Leblanc et al. 2009). No Cerrado, esta espécie se encontra associada a regiões savânicas (Ferreira & Tidon 2005, Tidon 2006, Mata et al. 2008) e apresenta uma grande amplitude de dieta em relação aos frutos que utiliza como sítio de criação (Oliveira 2013).



Figura 1. Casal de *Drosophila cardini*. Macho à esquerda e fêmea à direita.

História de vida

“A história de vida se encontra no cerne da Biologia; nenhum outro campo de estudo nos aproxima mais das simplicidades fundamentais que unem e explicam a diversidade das criaturas vivas e a complexidade de seus ciclos de vida” (Stearns 1992)².

Características relacionadas à história de vida são de especial interesse para estudos evolutivos pois são alvos diretos da seleção natural. As características relacionadas a história de vida são todas aquelas que estão diretamente relacionadas a sobrevivência e reprodução (Stearns 1992). É a história de vida que constitui a interface entre o fenótipo e o valor adaptativo (Charlesworth 1994). Vários aspectos adaptativos do fenótipo devem ser filtrados através da história de vida antes de serem contabilizados

² Life histories lie at the heart of biology; no other field brings you closer to the underlying simplicities that unite and explain the diversity of living things and the complexities of their life cycles

como moeda de valor adaptativo, por isso que a evolução da história de vida ocupa um papel central na Biologia (Prasad & Joshi 2003).

A temperatura é um fator abiótico crucial que afeta todos os processos biológicos e tem efeitos significativos na fisiologia e no valor adaptativo de ectotérmicos. A compreensão de como os organismos respondem a diferentes temperaturas são de interesse particular para melhor entendimento de como variam os caracteres relacionados à história de vida nestes organismos (Angiletta 2009).

Objetivo

O objetivo geral deste estudo é analisar a plasticidade fenotípica de características relacionadas ao valor adaptativo de *Drosophila cardini*, em diferentes temperaturas de desenvolvimento.

Os objetivos específicos são:

- 1) Investigar o comportamento (forma e valores característicos) das normas de reação de três características fenotípicas: o tempo de desenvolvimento ovo – adulto, o número de ovariolos e a viabilidade (adultos/ovos).
- 2) Estimar o efeito da temperatura, do genótipo e da interação entre eles na determinação das características fenotípicas.
- 3) Investigar a variação entre e dentro das linhagens.
- 4) Estimar uma temperatura ótima a partir das três características analisadas.

METODOLOGIA

Coleta dos dados

Realizamos o experimento de plasticidade fenotípica através de uma técnica largamente empregada para estudos do tipo, a técnica de linhagem isofêmea (Moreteau et al. 1995, David et al. 2005b), cujo princípio básico é fundar linhagens a partir de uma única fêmea no intuito de amostrar diferenças de origem genotípica entre elas (figuras A1 e A2). Coletamos os drosofilídeos no mês de abril de 2013, em populações naturais da Reserva Ecológica do IBGE, localizada 26 km ao sul de Brasília (15°56'S, 47°53'W). Usamos armadilhas (Roque et al. 2011) com isca de banana fermentada, em áreas de cerrado *sensu stricto* perturbado, locais onde previamente havíamos coletado um grande número de indivíduos da espécie de interesse, *Drosophila cardini*. Triamos os espécimes sob um microscópio estereoscópico e colocamos os indivíduos pertencentes ao grupo *cardini* em frascos com meio de fubá, a 25°C, por três dias, para aclimação às condições de laboratório. Foram testados três tipos de meio de cultura, e o meio de fubá foi escolhido por ter apresentado a maior viabilidade (receitas em anexo).

Após este período, fundamos as linhagens isofêmeas distribuindo casais, aleatoriamente, em outros tubos com meio de cultura novo (anexo). Posteriormente, com o estabelecimento da segunda geração de laboratório (F2), analisamos as terminálias de machos da geração F1 de cada linhagem para a identificação precisa das espécies crípticas *D. cardini* e *D. cardinoides* (Vilela et al. 2002), espécies do grupo muito comuns na região (Mata et al. 2008)

A partir da geração F2, selecionamos 12 linhagens de *D. cardini*, que apresentaram 20 casais ou mais, para a realizar o ensaio. De cada uma dessas linhagens, separamos aleatoriamente dois conjuntos (réplicas) de 10 casais. Esses foram os

fundadores das populações a serem analisadas quanto à plasticidade das características fenotípicas. Colocamos cada grupo (réplica) em um frasco de boca larga (50 ml), contendo uma placa de Petri, com meio de cultura de fubá colorido para oviposição, a 25°C (Figura A2). A cada 24h substituímos as placas de Petri contendo ovos por outras com meio fresco, para continuidade da coleta de ovos.

De cada linhagem e réplica, transferimos vinte ovos viáveis (túrgidos e com coloração branca brilhante) para um tubo (40 ml) contendo 20 ml de meio de cultura de fubá (densidade larval máxima = 1 larva/ml). Deste modo, os indivíduos experimentais correspondem à terceira geração laboratorial (F3). Depositamos três tubos (60 ovos) por réplica de cada linhagem em cada estufa *biochemical oxygen demand* (BOD) totalizando assim 300 ovos (por linhagem e réplica) distribuídos entre as diferentes temperaturas.

Levamos os tubos com ovos para as estufas BOD reguladas nas temperaturas experimentais ($14\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, $17\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, $21\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, $25\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ou $28\pm 0.5^{\circ}\text{C}$). Escolhemos essas temperaturas com base nas informações disponíveis para a localidade de ocorrência da população estudada, para a tolerância de outras espécies, e visando proporcionar intervalos regulares ao longo da amplitude térmica. Regulamos as estufas para fotoperíodo de 12h (12D:12N).

Transferimos todos os adultos (F3) diariamente, à medida que emergiam, para recipientes com meio novo e os mantivemos a 21 °C por no mínimo sete e no máximo quatorze dias para amadurecimento conveniente dos ovários (Delpuech et al. 1995, Hodin 2009) (Figura A2). Descartamos os vidros após 15 dias sem emergência de novos adultos.

As características que analisamos nas moscas foram:

- a) Tempo de desenvolvimento de ovo a adulto, medido em dias a partir da data em que os ovos foram submetidos aos tratamentos térmicos até o dia da emergência dos adultos. Somente os tubos em que os 20 ovos foram colocados em um período de 24h foram utilizados para esse dado.
- b) Número de ovaríolos (figura 2), obtido mediante dissecção de ambos ovários das fêmeas (Wong & Schedl 2006). O número máximo de ovaríolos em *Drosophila*, assim como na maior parte dos insetos, é fixado no estágio pré-pupal e está correlacionado com a fecundidade (Cohet & David 1978, Boulétreau-Merle et al. 1982)
- c) Viabilidade, a razão entre o número de adultos que emergiram e o número de ovos inicialmente levados às estufas BOD (David et al. 2004).
- d) Valor adaptativo potencial, estimado como o produto entre a viabilidade e o número de ovaríolos.

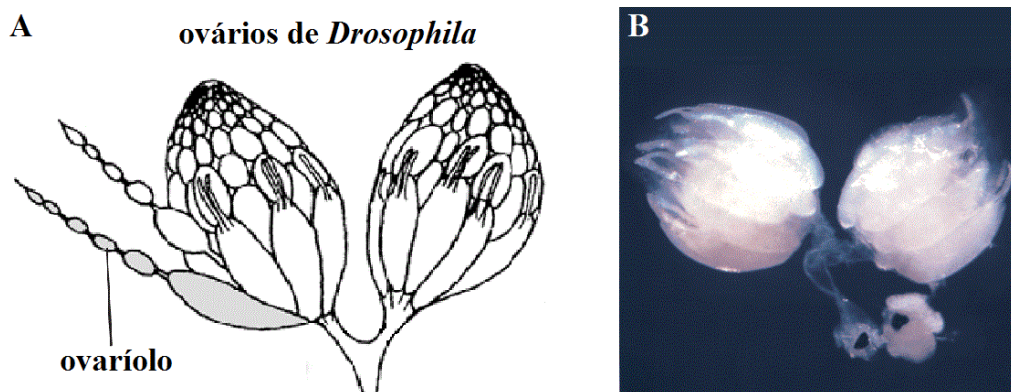


Figura 2. Ovários de *Drosophila*. (A) Ilustração esquemática dos ovaríolos de *Drosophila*. (B) Foto de ovários de *D. cardini*

Análises dos dados

Em geral, as funções que descrevem normas de reação para características de *Drosophila* não são lineares (David et al. 2005b, Rocha & Klaczko 2012). Com o propósito de comparar normas de reação das diferentes características estudadas e das linhagens, utilizamos o ajuste polinomial (Sokal & Rohlf 1995, Zar 2010) que segue a seguinte fórmula:

$$f = g_0 + g_1t + g_2t^2 + \dots + g_nt^n$$

Onde:

f = Característica fenotípica;

t = temperatura

g_i = parâmetros (coeficientes) polinomiais

Este procedimento consiste em testar polinômios de ordem crescente, ou seja, para cada característica e linhagem, iniciamos com uma regressão linear ($p = g_0 + g_1t$). Em seguida ajustamos o modelo quadrático ($p = g_0 + g_1t + g_2t^2$), o modelo cúbico ($p = g_0 + g_1t + g_2t^2 + g_3t^3$) e assim por diante. O objetivo desta metodologia é determinar qual modelo apresenta melhor adequação aos dados e é feito através do poder de explicação (R^2) de cada polinômio produzido. Como via de regra, à medida que se eleva o grau do polinômio, o mesmo acontece com o valor do coeficiente de determinação (R^2) (David et al. 1997). Por essa razão, para decidir se houve um incremento significativo em R^2 com o acréscimo de um novo termo ao polinômio, utilizamos uma medida de F segundo a fórmula retirada de Zar (2010) e sugerida por Rocha & Klaczko (2012). O cálculo de F é realizado a partir da soma dos quadrados e quadrados médios obtidos a partir das regressões múltiplas.

$$F = \frac{(\text{SQ da regressão do modelo de grau } m) - (\text{SQ da regressão de grau } m - 1)}{\text{QM do resíduo do modelo de grau } m}$$

Onde:

SQ = a soma dos quadrados

QM = o quadrado médio

O número de graus de liberdade do numerador é sempre 1 e do denominador corresponde aos graus de liberdade residuais do modelo de maior grau (Rocha & Klaczko 2012).

Segundo David et al. (1997), uma forma eficiente de discriminar normas de reação, ao invés do uso dos parâmetros g_i que, em geral, apresentam alta correlação, é através dos valores característicos das funções (obtidas a partir dos ajustes polinomiais) que as descrevem, os valores de máximo e mínimo (MV) e as temperaturas de ocorrência destes valores máximos e mínimos (TMV).

Polinômio de segundo grau

$$TMV = -\frac{g_1}{2g_2}$$

$$MV = g_0 \pm \frac{g_1}{4g_2}$$

Polinômio de terceiro grau

$$TMV = \frac{g_2 \pm \sqrt{g_2^2 \pm 3g_1g_3}}{-3g_3}$$

$$MV = g_0 + g_1TMV + g_2TMV^2 + g_3TMV^3$$

Visto que ajustes polinomiais realizados a partir da matriz total de dados costumam ter um baixo ajuste aos dados, e as médias tendem a apresentar distribuição

normal (Dr. Louis Klazcko, com. pess.), utilizamos uma matriz das médias de cada réplica em cada temperatura para produzir as funções que descrevem as normas de reação de cada linhagem; e uma a partir da média da amostra total por temperatura para descrever uma norma de reação média da população.

O conceito de normas de reação e suas representações gráficas em um plano cartesiano cujos eixos são ambiente e fenótipo está intimamente vinculado ao conceito de análise de variância como modelo estatístico em experimentos de plasticidade fenotípica (Lewontin 1974, Pigliucci 2001). Sendo assim, é possível particionar as variâncias utilizando os valores do coeficiente de determinação (R^2) calculados a partir da análise de variância (Legendre & Legendre 1998, Pigliucci 2001, DeWitt & Scheiner 2004, Peres-Neto et al. 2006). Portanto, realizamos análises de variância fatorial a fim de avaliar a influência do ambiente, do genótipo e da interação entre eles. As proporções explicadas por cada fator da variância total é dada pela equação:

$$V_p = V_g + V_e + V_{gxe} + V_{erro}$$

Onde:

V_p = Variância total da plasticidade da característica;

V_g = Parcela da variância atribuída às diferenças entre os genótipos;

V_e = Parcela da variância atribuída às diferenças ambientais;

V_{gxe} = Parcela da variância atribuída a interação entre o ambiente e o genótipo; a variação devido ao fato de genótipos diferentes poderem responder às variações ambientais de maneira diferente;

V_{erro} = Parcela do resíduo.

Conduzimos o teste de Levene (Fox et al. 2009) para avaliar a homogeneidade de variâncias das amostras e determinar qual teste *a posteriori* deveria ser empregado. Aplicamos o teste *post hoc* de Tukey HSD quando as premissas de homogeneidade do tamanho amostral e variâncias foram atendidas, caso contrário, usamos o teste *post hoc* Games-Howell (Games & Howell 1976, Day & Quinn 1989), indicado para amostras de tamanho e/ou variâncias diferentes.

Utilizando a técnica de linhagem isofêmea, a variação fenotípica total pode ser separada em dois componentes: entre linhagens e dentro das linhagens (David et al. 2005b). Analisamos o segundo componente mediante uso do coeficiente de variação (Capy et al. 1993, David et al. 1994, David et al. 2006). Adaptamos o teste de Levene para produzir valores individuais de CV segundo Van Valen (2005) e em seguida aplicamos uma análise de variância fatorial sobre os dados de tempo de desenvolvimento logaritmizados (base 10) e dados de viabilidade submetidos à transformação angular, arco seno da raiz quadrada (Quinn & Keough 2002, Soto et al. 2007, Soto et al. 2011).

$$CV_{ift} = \frac{|y_{ift} - \bar{y}_{ft}|}{\bar{y}_{ft}}$$

Onde:

CV_{ift} = Coeficiente de variabilidade do indivíduo i , linhagem f e temperatura t ;

y_{ift} = Valor observado do indivíduo i , linhagem f e temperatura t ;

\bar{y}_{ft} = Média da linhagem f e temperatura t

No intuito de estimar a temperatura ótima (Parker & Smith 1990) para o desenvolvimento larval, a partir dos parâmetros estimados neste trabalho, o seguinte procedimento foi aplicado:

- a) Obtivemos as médias de cada linhagem, em cada temperatura, do tempo de desenvolvimento, número de ovariolos e viabilidade.
- b) Produzimos uma estimativa de valor adaptativo potencial, a partir da multiplicação das médias do número de ovariolos pela viabilidade.
- c) Transformamos todos os valores em uma escala de 0 – 1 a partir da divisão de cada medida pelo maior valor obtido (Zuur et al. 2007). Esta operação foi realizada por linhagem.
- d) Realizamos os ajustes polinomiais para determinar as funções das normas de reação obtidas pelos valores médios (letra ‘a’).
- e) Criamos uma função diferença, $d(x)$, entre as funções do valor adaptativo, $f(x)$ e tempo de desenvolvimento, $t(x)$, ou seja, $d(x) = f(x) - t(x)$.
- f) Determinamos como temperatura ótima aquela em que há a maior distância entre $f(x)$ e $t(x)$, ou seja, onde a derivada de $d(x)$ é igual a zero.

Conduzimos as análises do trabalho no programa R (ver. 3.0.21; R Development Core 2013), disponível gratuitamente em <http://cran.r-project.org>, com auxílios dos pacotes `car` (Fox et al. 2009) para realizar análises exploratórias e `ggplot2` (Wickham 2009) para produzir gráficos.

RESULTADOS

Normas de reação: forma e valores característicos

As normas de reação obtidas a partir das médias de cada uma das 12 linhagens e do agrupamento delas são exibidas nas figuras 3, 4 e 5. O tempo de desenvolvimento foi mais curto em temperaturas mais elevadas, enquanto a viabilidade e o número de ovariolos apresentaram valores maiores em temperaturas intermediárias (tabelas 1, S1, S2 e S3). É importante ressaltar, entretanto, que as linhagens apresentaram maior número de ovariolos nas temperaturas intermediárias baixas, 17°C e 21°C (Figura 4), diferentemente, da viabilidade, que exibiu maiores valores em temperaturas intermediárias superiores, 21°C e 25°C (Figura 5).

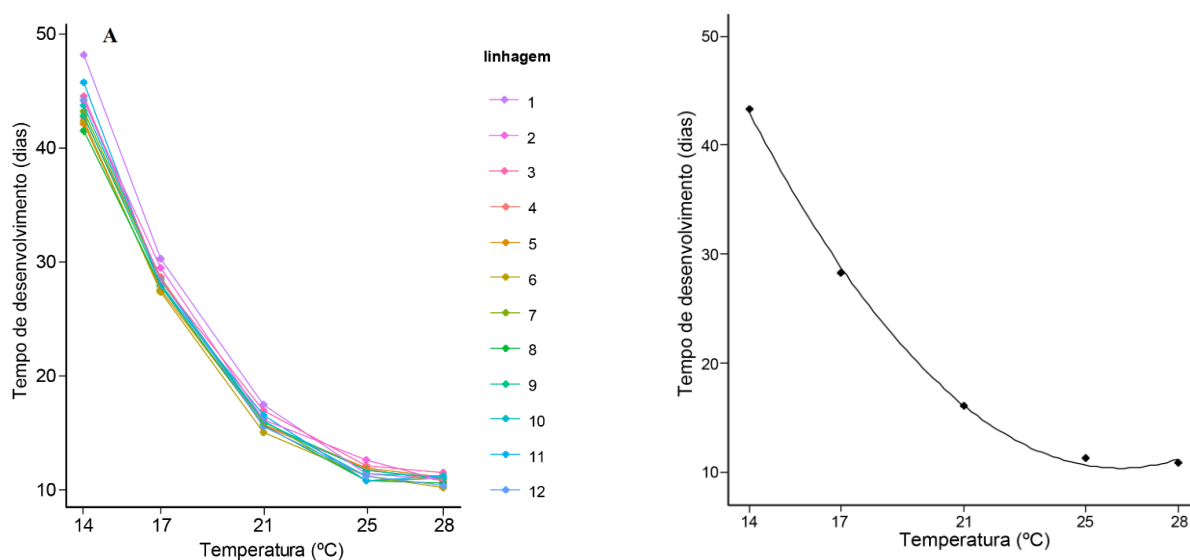


Figura 3. Normas de reação do tempo de desenvolvimento de ovo a adulto (dias) em diferentes temperaturas de desenvolvimento. (A) normas de reação das 12 linhagens estudadas. (B) norma de reação média observada (linha tracejada) e ajustada com um polinômio de 2º grau (linha contínua).

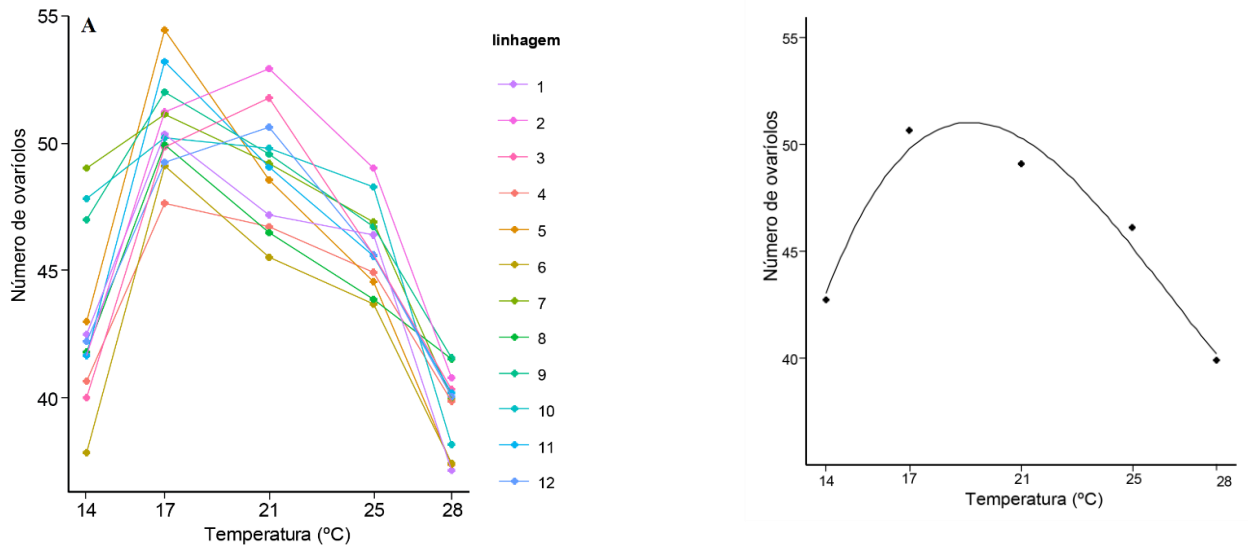


Figura 4. Normas de reação do número de ovariolos em diferentes temperaturas de desenvolvimento. (A) normas de reação das 12 linhagens estudadas. (B) norma de reação média observada (linha tracejada) e ajustada com um polinômio de 2º grau (linha contínua).

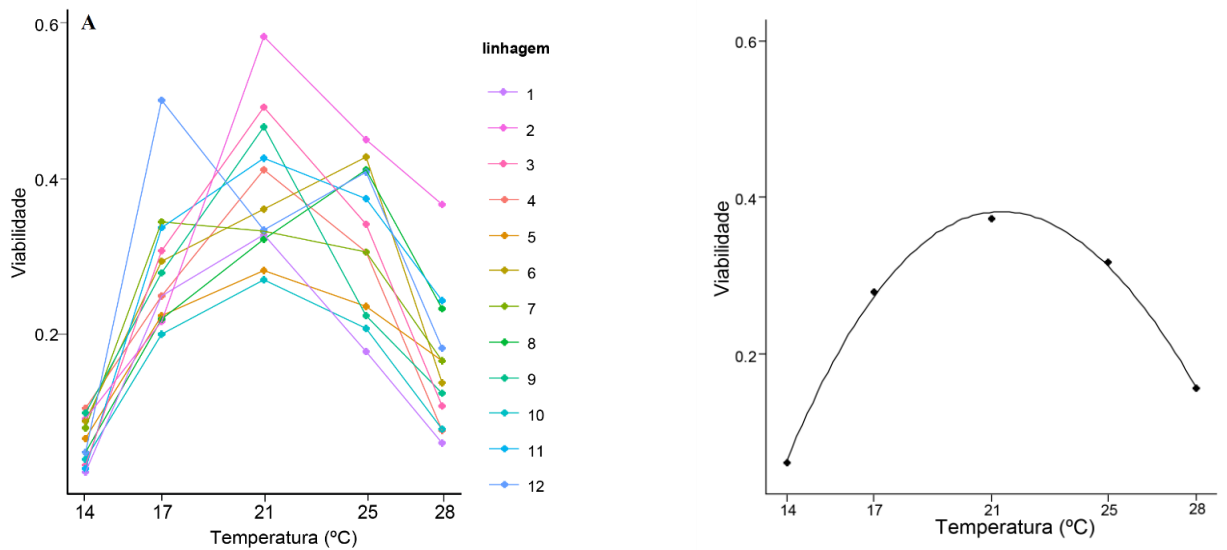


Figura 5 Normas de reação da viabilidade em diferentes temperaturas de desenvolvimento. (A) normas de reação das 12 linhagens estudadas. (B) norma de reação média observada (linha tracejada) e ajustada com um polinômio de 2º grau (linha contínua).

Tabela 1. Valores médios (\pm erro padrão) de cada característica estudada de acordo com a temperatura de desenvolvimento larval. Foram utilizadas as médias obtidas a partir do agrupamento das 12 linhagens isofêmeas avaliadas.

Característica	14 °C	17 °C	21°C	25 °C	28 °C
Tempo de desenvolvimento (dias)	43,26 \pm 0,21	28,38 \pm 0,08	16,11 \pm 0,05	11,29 \pm 0,05	10,79 \pm 0,05
Número de ovariolos	42,71 \pm 1,1	50,66 \pm 0,4	49,06 \pm 0,3	46,07 \pm 0,3	39,89 \pm 0,4
Viabilidade	0,05 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02

Encontramos polinômios com ajuste significativo para todas as normas de reação produzidas pelas 12 linhagens (tabela 2). Em apenas dois casos o ajuste não linear não foi estatisticamente melhor que a regressão linear, porém seus coeficientes de determinação foram baixos ($R^2 < 0,4$). O ajuste quadrático revelou valores de F significativos na maior parte das normas de reação (83%) para as três características (tabela 2), com coeficientes de determinação superiores a 0,8 em pouco mais de 50% dos casos. Essa baixa proporção se deveu às normas de reação referentes a viabilidade das linhagens, nas quais os coeficientes de determinação foram em média de $0,54 \pm 0,05$ (média \pm erro padrão). Entre as 34 normas de reação não-lineares, três delas apresentaram ajustes significativamente melhores com polinômios cúbicos e uma com polinômio de 4º grau. Não obstante, os modelos quadráticos dessas situações também foram significativos e com coeficiente de determinação superiores a 80%, podendo portanto ser satisfatoriamente utilizados para descrever as normas de reação.

Tabela 2. Número de normas de reação com ajuste polinomial significativo de três características fenotípicas de *D. cardini*.

	Linear	Quadrática	Cúbica	Quártica	R ² > 0.8
Tempo de desenvolvimento	0	10	2	0	12 (100%)
Número de ovariolos	1	9	1	1	8 (67%)
Viabilidade	1	11	0	0	0 (0%)
Total	2	30	3	1	20 (56%)
R ² > 0.8	0 (0%)	16 (53%)	3 (100%)	1 (100%)	

Os valores característicos obtidos a partir dos ajustes polinomiais variaram pouco. Cada característica avaliada apresentou um TMV específico. A temperatura de maior valor (TMV) do número de ovariolos foi a mais baixa entre as três estimativas, seguida pelas temperatura de maior valor da viabilidade e temperatura de menor valor do tempo de desenvolvimento (tabela 3). Os valores de máximo e mínimo (MVs) variaram mais que as TMVs entre as linhagens.

Tabela 3. Valores característicos das normas de reação produzidas a partir de polinômios de 2º grau das três características estudadas: tempo de desenvolvimento de ovo a adulto (dias), número de ovariolos e viabilidade (proporção de ovos que atingem a fase adulta). TMV, temperatura de maior ou menor valor; MV, maior ou menor valor; CV, coeficiente de variabilidade.

	Valor característico	Média	Erro Padrão	CV
Tempo de desenvolvimento	TMV (°C)	26,05	0,05	0,01
	MV	10,36	0,08	0,03
Número de ovariolos	TMV (°C)	19,96	0,23	0,04
	MV	50,47	0,52	0,04
Viabilidade	TMV (°C)	21,93	0,39	0,06
	MV	0,44	0,04	0,34

Efeitos da temperatura, do genótipo e da interação entre eles

A análise de variância fatorial revelou que tanto a temperatura como linhagem afetaram todas as características avaliadas (tabela 4, S4, S5 e S6). A interação entre esses dois fatores foi significativa para o tempo de desenvolvimento e número de ovariolos.

Tabela 4. Contribuição dos fatores temperatura e linhagem na variância total do tempo de desenvolvimento, número de ovariolos e viabilidade. ns, não significativo; ***, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

	Tempo de desenvolvimento (dias)	Número de ovariolos	Viabilidade
(1) Temperatura	0,945***	0,386***	0,458***
(2) Linhagem	0,003***	0,047***	0,05*
(1) x (2)	0,016***	0,003***	0,039 ^{ns}
Resíduo	0,036	0,564	0,453

A temperatura apresentou o maior efeito sobre todas as características estudadas, principalmente sobre o tempo de desenvolvimento. Em contraposição, o efeito da linhagem e da interação entre esses fatores, quando significativo, foi menor que 5% (tabela 4). O tempo de desenvolvimento foi a característica melhor explicada a partir dos dois fatores utilizados, linhagem e temperatura, ($R^2 = 0.97$), seguido pela viabilidade ($R^2 = 0.5$) e número de ovariolos ($R^2 = 0.49$).

Os testes *post hoc* com as temperaturas (tabela 5) revelaram tempos de desenvolvimento significativamente diferentes entre todos os pares de temperatura comparadas, seguindo a regra de quanto maior a temperatura, menor o tempo de desenvolvimento. O número de ovariolos, por outro lado, diferiu apenas entre as temperaturas extremas: 14°C e 28°C. Por fim, com relação à viabilidade, não há diferença entre as temperaturas intermediárias (17°C, 21°C e 25°C).

Tabela 5. Aumento ou diminuição dos valores de cada característica entre as temperaturas de desenvolvimento larval. Tempo de desenvolvimento (log10 dias), número de ovariolos e viabilidade (arcoseno da raiz quadrada). ns, não significativo; ***, p<0.01; *, p<0.05.

Temperatura (°C)	Diferença ± intervalo de confiança		
	Tempo de desenvolvimento (dias)	Número de ovariolos	Viabilidade
14 → 17	- 0,188 ± 0,008***	7,757 ± 3,154***	0,332 ± 0,116***
14 → 21	- 0,436 ± 0,008***	6,018 ± 3,109***	0,442 ± 0,116***
14 → 25	- 0,584 ± 0,009***	2,998 ± 3,111*	0,37 ± 0,116***
14 → 28	- 0,607 ± 0,009***	- 3,383 ± 3,209 ^{ns}	0,166 ± 0,116***
17 → 21	- 0,248 ± 0,005***	- 1,739 ± 1,238***	0,11 ± 0,117 ^{ns}
17 → 25	- 0,396 ± 0,007***	- 4,76 ± 1,243***	0,038 ± 0,116 ^{ns}
17 → 28	- 0,418 ± 0,008***	- 11,14 ± 1,486***	- 0,166 ± 0,116***
21 → 25	- 0,148 ± 0,007***	- 3,020 ± 1,113***	- 0,072 ± 0,116 ^{ns}
21 → 28	- 0,170 ± 0,008***	- 9,401 ± 1,379***	0,276 ± 0,116***
25 → 28	- 0,023 ± 0,008***	- 6,381 ± 1,384***	0,204 ± 0,116***

Varição entre e dentro das linhagens

A Figura 6 ilustra a amplitude das variações das linhagens sob as diferentes temperaturas. O tempo de desenvolvimento foi significativamente mais variável nas temperaturas mais elevadas; o número de ovariolos nas temperaturas extremas; e as taxas de viabilidade foram significativamente mais variáveis a 14 °C.

A temperatura foi o fator com maior efeito sobre a variação intra-linhagem para todas as características avaliadas (tabela 6), mostrando que a variabilidade muda de acordo com a temperatura. As estatísticas F para esse fator sempre foram significativas, e com valores de 4 a 7 vezes superiores aos valores de F da linhagem e da interação. Houve diferença na variação entre as linhagens para tempo de desenvolvimento e viabilidade, ou seja, algumas linhagens são mais plásticas que outras para essas características. A interação foi uma fonte de variabilidade significativa para todas as características avaliadas.

Tabela 6. Análise de variância de 2 fatores sobre os coeficientes de variação (CV) do tempo de desenvolvimento, número de ovariolos e viabilidade. ns, não significativo; ***, p<0.01; *, p<0.05

	Tempo de desenvolvimento (dias)			Número de Ovariolos			Viabilidade		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
(1) Temperatura	4	361,268	11,981***	4	250,679	8,066***	4	6260,821	9,875***
(2) Linhagem	11	55,039	1,825*	11	55,116	1,774 ^{ns}	11	1403,688	2,214*
1 x 2	44	53,266	1,766***	44	63,77	2,052***	44	1163,289	1,835***
Resíduo	1816	30,154		740	31,078		100	634,018	

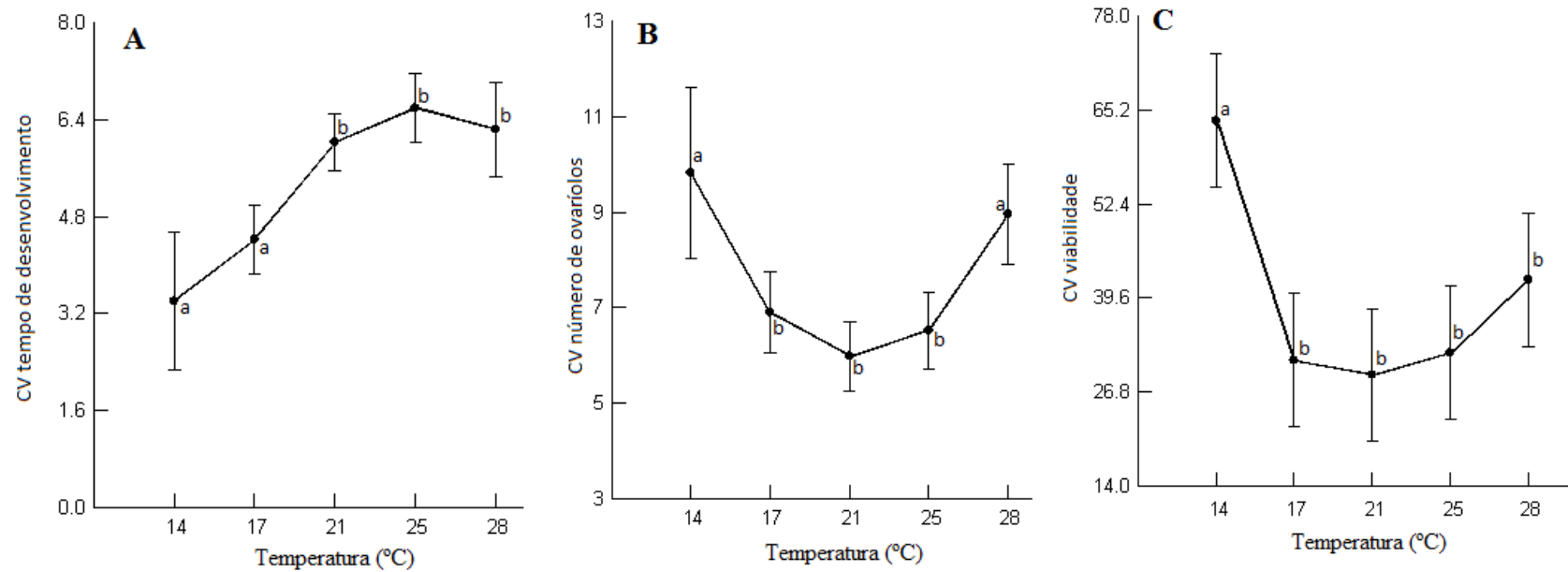


Figura 6. Coeficientes de variação de três características de história de *D. cardini*, sob diferentes temperaturas de desenvolvimento. (A) tempo de desenvolvimento; (B) número de ovariolos; (C) viabilidade. Todos os coeficientes foram multiplicados por 100. Barras verticais indicam o desvio padrão. As letras representam as divisões dos agrupamentos produzidos em função das diferenças observadas.

Ponto ótimo

A distância entre as curvas geradas a partir dos ajuste polinomiais (Figura 7) foi diferente para cada linhagem (não exibido), porém a temperatura em que essa maior distância foi atingida foi muito semelhante para todas ($22.48 \pm 0.12^{\circ}\text{C}$). A tabela S15 (em anexo) apresenta os coeficientes polinomiais estimados para valor adaptativo e tempo de desenvolvimento de cada linhagem. Notamos, também, que os parâmetros entre os polinômios que descrevem as normas de reação (tabela S15) são muito semelhantes entre as linhagens, ou seja, apesar de haver diferença na plasticidade exibida pelas linhagens e nos valores de máximo (MVs), a temperatura em que o maior (ou menor) valor é atingido (TMVs) é bastante conservada e está dentro da amplitude encontrada pela população estudada (Figura 8).

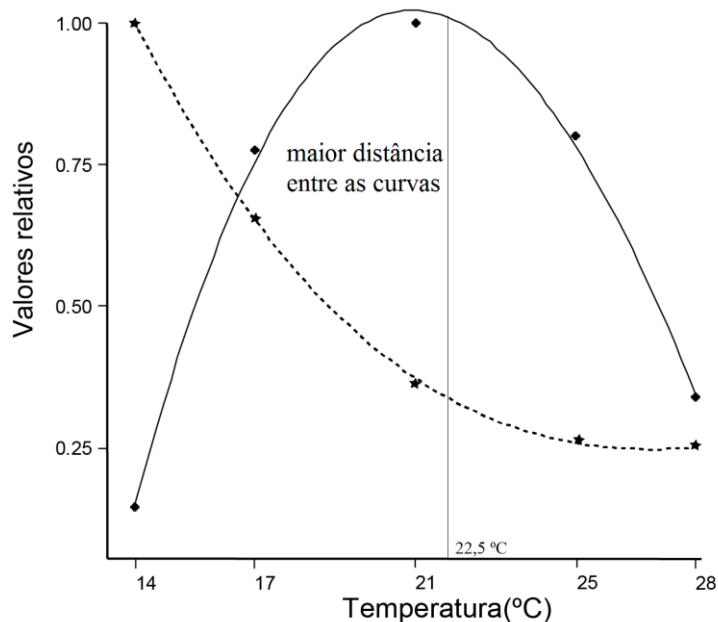


Figura 7. Normas de reação do valor adaptativo potencial (tracejada) e do tempo de desenvolvimento (contínua).

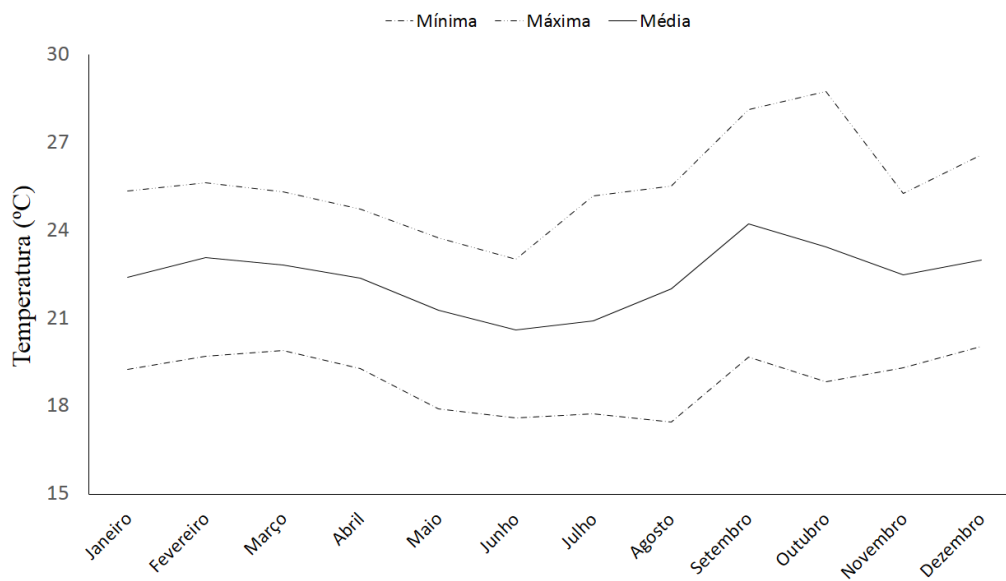


Figura 8. Variação térmica ao longo do ano na área de estudo (RECOR-IBGE). Os dados foram obtidos durante o período de 2010 a 2013. Linha contínua, temperatura média; linhas tracejadas, temperaturas máximas e mínimas.

DISCUSSÃO

Normas de reação

Questões metodológicas

Este estudo revelou plasticidade fenotípica em todas as características analisadas, pois as normas de reação obtidas não estão paralelas ao eixo 'x'. Utilizando ajustes polinomiais, nossos dados mostram que, assim como encontrado em *Drosophila* (David et al. 1994, Karan et al. 1999, David et al. 2005a, Rocha et al. 2009, Rocha & Klaczko 2012) e outros organismos (Moczek & Nijhout 2003, Kingsolver et al. 2004, Valladares et al. 2006, Bernardo et al. 2007), as normas de reação de *Drosophila cardini* são melhores descritas como funções não-lineares (6% linear e 94% não-linear). Se considerarmos somente as normas de reação que obtiveram bom coeficiente de determinação ($R^2 > 80\%$), os ajustes não lineares representam a totalidade das 20 normas de reação que atenderam a essa condição (tabela 2).

Nossos dados sugerem que o melhor ajuste para as características estudadas é o quadrático. Conforme ao observado por Rocha & Klaczko (2012), para todas as características que analisamos o incremento do poder de explicação (R^2) foi maior quando do ajuste de primeiro para segundo grau (de 0,39 para 0,76), enquanto que o acréscimo do segundo para terceiro grau foi de somente 0,03. Nossos dados sugerem que os ajustes polinomiais são mais eficientes para algumas características do que outras. Somente o tempo de desenvolvimento apresentou 100% dos ajustes com o coeficiente de determinação superior a 0,8, seguido pelo número de ovariolos (67%) e, por fim, a viabilidade que não obteve nenhum ajuste com coeficiente de determinação superior a 0,8, apesar de responder claramente de maneira não-linear à temperatura (figura 3). Esses resultados nos levam a crer que a resposta em função da temperatura é mais previsível

para tempo de desenvolvimento do que o número de ovariolos, e que a viabilidade é a variável resposta menos previsível dentre as três avaliadas. É importante ressaltar, entretanto, que podem haver outros fatores (não analisados neste estudo) que também são importantes na determinação das características, principalmente nas menos ajustadas aos modelos.

Grande parte dos trabalhos de plasticidade fenotípica utiliza dois ou três tratamentos representando ambientes (Barker & Krebs 1995, Huey et al. 1995, Nunney & Cheung 1997, Bitner-Mathe & Klaczko 1999, Gutteling et al. 2007, Ellers & Driessen 2011, Carreira et al. 2013). Esse procedimento pode enviesar os resultados obtidos, pois os ajustes produzidos nesse cenário são geralmente muito baixos. Por exemplo, quando utilizamos somente três temperaturas (14°C, 21°C, 25°C) para realizar os ajustes os coeficientes de determinação foram sempre muito inferiores (dados não apresentados).

A questão da análise de normas de reação não lineares foi abordada por Rocha & Klaczko (2012), que apresentaram didaticamente dois pontos de vista extremos e a partir deles propuseram uma alternativa intermediária - com elementos dos dois extremos - viável para proceder às análises supra citadas. Os autores apresentam um conflito existente nos estudos de plasticidade fenotípica a partir de dois pontos de vista. O primeiro deles (“otimista”), busca o entendimento da relação genótipo e ambiente através de modelos simples para descrever as normas de reação (modelos lineares), enquanto que o segundo ponto de vista (“pessimista”) define que as normas de reação são tão variáveis e de uma maneira tão complexa que é impossível modelar e generalizar essa relação entre genótipo e ambiente. O terceiro ponto de vista (“intermediário”), defendido pelos autores, utiliza modelos não lineares de baixa complexidade (funções de 2º ou 3º grau), atrelados ao uso de pelo menos cinco níveis para o fator ambiental (e.g. temperatura, densidade etc). Dessa forma é possível descrever normas de reação sem desprezar a complexidade

produzida pela interação entre genótipo e ambiente. O uso de cinco níveis ambientais é importante para se obter bons ajustes. Dessa forma, podemos reduzir o conflito que existe na literatura sobre plasticidade em que se reconhece a relevância do estudo de normas de reação, mas na maior parte dos trabalhos publicados apenas dois ou no máximo três tratamentos são utilizados. Possivelmente, por essa razão seja inviável avaliar a complexidade da plasticidade fenotípica necessária para a importância dada ao fenômeno.

Implicações biológicas

Avaliar como um organismo responde a diferentes ambientes é uma maneira de compreender como se dá a plasticidade fenotípica. As normas de reação das linhagens de *Drosophila cardini* aqui investigadas revelaram dois padrões básicos: o tempo de desenvolvimento foi mais curto em temperaturas mais elevadas, enquanto a viabilidade e o número de ovariolos apresentaram valores maiores em temperaturas intermediárias. Estes resultados corroboram estudos anteriores, realizados com outras espécies de drosofilídeos (Cohet & David 1978, Delpuech et al. 1995, Morin et al. 1997, Imasheva et al. 1998, Karan et al. 1999, Petavy et al. 2001, Sisodia & Singh 2002, David et al. 2004, Hoffmann 2010, Rocha & Klaczko 2012, Klepsatel et al. 2013). A explicação mais aceita para esses dados é de base fisiológica em função dos mecanismos enzimáticos. Em temperaturas mais elevadas, a taxa metabólica se torna mais acelerada e como consequência disso a taxa de desenvolvimento aumenta resultando em um menor tempo de desenvolvimento (Gebhardt & Stearns 1988, Nylin & Gotthard 1998). O número de ovariolos e a viabilidade, entretanto, apresentam curvas que são, possivelmente, resultados adaptativos e passíveis de mudanças evolutivas em seus valores ótimos e forma (David et al. 2005a, Hoffmann 2010).

A literatura da área aponta para um consenso de que a seleção natural atua sobre a forma da norma de reação (Pigliucci & Müller 2010, Rocha & Klaczko 2012). Powell et al. (2010) concluíram, a partir de características morfológicas de seis espécies de *Drosophila*, que a maneira como esses organismos respondem à temperatura é “de alguma forma surpreendentemente semelhante”³. Da mesma forma, Klepsatel et al. (2013) analisaram a plasticidade fenotípica de características relacionadas ao valor adaptativo em seis populações de *D. melanogaster* e chegaram à conclusão de que a temperatura de maior (ou menor) valor (TMV) foi “notavelmente invariável entre as populações”³. Os nossos dados, obtidos a partir de diferentes linhagens de uma mesma população *D. cardini*, corroboram essas afirmações.

Duas explicações são possíveis para justificar a semelhança entre as normas de reação de diferentes genótipos. A primeira é que os indivíduos avaliados, por serem procedentes de uma mesma população local, estão adaptados às mesmas condições e respondem de maneira plasticamente semelhante. Esse argumento apoia a visão adaptacionista, a exemplo do que foi sugerido por Wright na década de 30 (Schlichting & Pigliucci 1998). A segunda explicação é que - por pertencerem a um mesmo táxon - os indivíduos respondem de maneira semelhante devido às limitações impostas pelo desenvolvimento (Gould & Lewontin 1979). Uma forma de elucidar essas questões é analisar a plasticidade de diferentes populações.

Delpuech et al. (1995) compararam as normas de reação do número de ovariólos de três populações de *D. melanogaster*: uma de região temperada (França) e duas de região tropical (Congo). Eles esperavam que a temperatura onde ocorre maior número de ovariólos (TMV) fosse maior para as populações tropicais, em função das temperaturas

³ All species have sexual dimorphism of the same sort and all attain larger size when reared at lower temperature. This is somewhat surprising given the long evolutionary history of these species

médias mais elevadas enfrentadas por essas populações. Entretanto, as TMVs foram muito semelhantes entre as três populações. O que ficou evidentemente diferente entre estas populações foram os valores máximos (MV): populações tropicais apresentaram menos ovariolos que as populações temperadas em todas as temperaturas testadas. Mais recentemente, Klepsatel et al. (2013) investigaram a fecundidade, número de ovariolos e tamanho do tórax e da asa de seis populações de *D. melanogaster*, e os resultados obtidos para as diferentes populações foram muito semelhantes. Esses dois grupos de pesquisadores, entretanto, chegaram a conclusões diferentes. Klepsatel et al. (2013) concluíram que a semelhança entre as normas de reação das diferentes populações se deve à limitações impostas pelo desenvolvimento. Delpuech et al. (1995), por outro lado, utilizaram uma abordagem adaptacionista, através de interações com outros caracteres, para explicar esses resultados.

No nosso entendimento, a abordagem assumida Klepsatel et al. (2013) é mais coerente com os resultados que ambos os grupos obtiveram, e por esse motivo nós não concordamos com a abordagem adotada por Delpuech et al. (1995), que também é criticada por Gould & Lewontin (1979). Para West-Eberhard (2003) essa interpretação possui um caráter histórico e é um dos seis problemas existentes na síntese moderna, o problema da “adaptação unimodal e os produtos multimodais do desenvolvimento e da plasticidade”. Existe uma tendência em se trabalhar com caracteres de maneira gradual em função do gradualismo de Darwin. O pensamento populacional passou a ser traduzido em variações quantitativas e mudanças no valor métrico dos caracteres. Dessa forma populações diferentes, sob condições diferentes, apresentariam ótimos diferentes através do deslocamento da norma de reação para atender às demandas locais.

Todas as TMVs estão dentro da amplitude térmica que ocorre no ambiente natural da população estudada (figura 8). Entretanto, vale ressaltar que a temperatura de maior

número de ovariolos (TMV) em *Drosophila cardini* foi relativamente mais baixa (19,9°C) do que as TMVs encontradas em outras espécies. *Drosophila melanogaster*, por exemplo, tem como temperatura de valor máximo aproximadamente de 22,2 °C (Delpuech et al. 1995, Morin et al. 1997), *D. ananassae*, 24,6 °C (Morin et al. 1997) e *Zaprionus indianus*, 25,1°C (Karan et al. 1999). Como *D. cardini* é um espécie de origem neotropical e a população estudada ocorre em um ambiente com temperaturas médias altas (figura 8), esperávamos encontrar resultados semelhantes aos obtidos para as outras espécies tropicais. Não foi o que observamos, e com os dados atualmente disponíveis ainda não é possível explicar as razões dessa diferença.

Efeito dos fatores na determinação das características fenotípicas

A temperatura de desenvolvimento foi o fator com maior relevância na determinação das características estudadas, principalmente no tempo de desenvolvimento de ovo a adulto (94,5%). Este resultado é um fato bem conhecido, e provavelmente explicado pelos processos fisiológicos que resultam da cinética enzimática (David et al. 1983). Adicionalmente, o fator linhagem também apresentou diferenças nas respostas fenotípicas, evidenciando que há variabilidade genética significativa dentro da população estudada para as três características em questão. Para a interação entre os dois fatores, houve diferença significativa para o tempo de desenvolvimento e número de ovariolos, sugerindo diferenças na plasticidade das diferentes linhagens com relação a essas duas características, mas não para a viabilidade.

No presente trabalho, a viabilidade das moscas foi relativamente baixa, em todas as temperaturas, quando comparada com os resultados obtidos para outras espécies (Imasheva et al. 1998, Soto et al. 2007). Imasheva (1998), por exemplo, encontrou

viabilidades muito superiores às nossas (37,3 em 21°C e 31,8 em 25°C) e, ainda assim, argumenta que foram baixas (0,66 em 21°C e 0,74 em 25°C). Uma hipótese que ela levanta é a possibilidade de depressão por endogamia, viés que evitamos já que utilizamos a 3ª geração de laboratório.

As baixas viabilidades encontradas no presente trabalho sugerem que as condições em que nossas moscas se desenvolveram foram estressantes em todas as temperaturas. É provável que, além da temperatura, existam outros fatores importantes na determinação da viabilidade das moscas. Como eliminamos o viés da densidade populacional e da umidade, acreditamos que o recurso utilizado pelas moscas pode ser um fator importante para explicar esse resultado. É possível que a viabilidade *D. cardini* seja muito sensível ao tipo de recurso alimentar, assim como apontado para outras espécies (Soto et al. 2007, 2008). Outra possibilidade é que a composição de leveduras utilizadas como recurso seja um fator importante na determinação da viabilidade de *D. cardini*. No laboratório, drosofilídeos normalmente são cultivados utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, uma espécie de levedura que não está entre as mais comuns nos ambientes naturais do Cerrado (Sperandio 2012). Além disso, devemos ponderar o fato de *D. cardini* ser uma espécie sensível a etanol (Colon-Parrilla & Perez-Chiesa 1999), subproduto metabólico produzido em grandes quantidades por *S. cerevisiae*. Para testar essas hipóteses, são necessárias mais investigações sobre a interação entre drosofilídeos e seus recursos *in natura*, tendo em vista que estudos com esse enfoque ainda são escassos (Oliveira 2013).

Variação entre as linhagens

Além da observação visual das normas de reação, onde as linhas se cruzam em vários pontos, a diferença entre as linhagens - principalmente para a determinação do

número de ovariolos e a viabilidade - foi evidenciada pela análise de variância (tabela 4) e dos parâmetros polinomiais e seus valores característicos (tabela A7). A diferença entre as linhagens é mais evidente em faixas específicas de temperatura, as quais por sua vez são específicas para as características. Por exemplo, o número de ovariolos é mais variável entre as diferentes linhagens sob 14°C, enquanto que essa diferença para viabilidade é maior em 28°C.

Por fim, as linhagens diferiram entre si também pela forma em que reagiram às temperaturas, ou seja, quanto à plasticidade fenotípica. Assim, pode-se dizer que os diferentes genótipos reagiram de maneira diferente ao gradiente térmico. O fato de que linhagens diferentes respondem diferencialmente às condições ambientais corrobora o que Lewontin (2001) argumenta contra uma falácia permeada na sociedade, de que teoricamente um genótipo está predestinado a ser “melhor” que outros em qualquer condição ambiental. Esta falácia parte do pressuposto de que a contribuição ambiental está em permitir que o genótipo consiga expressar seu *potencial* preexistente, o que ele chama de metáfora do “balde vazio”. Os genes determinam o tamanho do balde e o ambiente determina o volume que ele conterá. Nossos dados dão mais suporte à vasta literatura que combate essa ideia (Lewontin 2001, Jablonka & Lamb 2005).

Variação dentro das linhagens e *stress*

Detectamos diferenças na variação do tempo de desenvolvimento e da viabilidade, dentro das linhagens distribuídas nas diferentes temperaturas. Esses dados corroboram observações anteriores, de que características diretamente relacionadas à história de vida, em geral, apresentam baixa herdabilidade quando comparadas a características morfológicas (Falconer 1981, Hartl & Clark 1997).

Existe uma tendência geral de que, sob situações de estresse, aumente a variação na expressão do fenótipo (Hoffmann & Parsons 1997, Imasheva et al. 1998). Nesse contexto, os coeficientes de variação (CV) podem ser utilizados como medidas de estresse, tendo em vista que eles quantificam a variação dentro de uma mesma linhagem.

O aumento na variação da plasticidade em populações de *Drosophila* que se desenvolvem sob condições ambientais adversas pode ser um resultado da disruptura da homeostase do desenvolvimento (canalização), de causas genéticas, ou de ambas. Cada característica apresentou um comportamento específico quanto à variabilidade (CV) ao invés de seguir a regra geral “temperaturas intermediárias apresentam menor variabilidade”. Existem muitos trabalhos na literatura que corroboram essa tendência, mas há uma variação quanto à característica analisada, à espécie utilizada e às temperaturas empregadas (Gebhardt & Stearns 1992, David et al. 1994, Delpuech et al. 1995, Imasheva et al. 1998, Bublly & Loeschcke 2000, Imasheva et al. 2000).

As características avaliadas neste trabalho apresentaram temperaturas estressantes específicas. O tempo de desenvolvimento, por exemplo, variou mais nas temperaturas mais altas, enquanto que a viabilidade variou mais a 14 °C e o número de ovariolos foi mais variável nas duas temperaturas extremas, diferentemente do que foi encontrado por Delpuech et al. (1995). A viabilidade maior na temperatura mais alta, se comparada à temperatura mais baixa, também foi encontrada para *D. melanogaster* (Imasheva et al. 1998). Isto indica que 14°C é uma temperatura de maior *stress* que 28°C para *D. cardini*. Utilizando os resultados obtidos, acreditamos que as temperaturas extremas (14°C e 28°C) são temperaturas estressantes para *D. cardini*, sendo 14°C mais que 28°C. Nossos resultados, portanto, corroboram a relação entre variação e estresse.

Por fim, este estudo corrobora dados da literatura que sugerem que o efeito do estresse na variação é específico para cada característica (Murphy et al. 1983, Gebhardt & Stearns 1988, Gebhardt & Stearns 1992, David et al. 1994, Imasheva et al. 1998, Hoffmann & Merilä 1999, Bublly & Loeschcke 2002, Bublly & Loeschcke 2005). O resultado mais evidente é de que 14° C é, de fato, uma temperatura estressante.

Temperatura ótima

O programa adaptacionista defende a ideia de que há uma otimização fenotípica para o ambiente onde o organismo se encontra, em detrimento dos limites impostos pelo desenvolvimento (Gould & Lewontin 1979). No entanto, cada característica que avaliamos no presente trabalho apresentou respostas diferentes, em todos os aspectos, seja para a forma da norma de reação e seus valores característicos (g_i , MV e TMV), seja para os outros resultados obtidos a partir das diferentes análises. Como apontado por (Parker & Smith 1990) “os modelos de otimização devem ser utilizados para nos ajudar a testar conhecimentos sobre as limitações biológicas que influenciam o resultado final da evolução; servem para entendermos melhor as adaptações e não para demonstrar que a seleção natural produz soluções ótimas”. Tendo isso em mente, o resultado da integração das três características avaliadas neste trabalho reforça a ideia de que a expressão fenotípica está limitada pelo desenvolvimento. A temperatura ótima (22,5°C) foi diferente das TMVs das características isoladas; por isso na busca de avaliar as temperaturas ótimas, deve-se fazê-lo através do estudo a partir do organismo como um todo.

Em alguns casos, o ponto ótimo das normas de reação é relativamente fácil de ser encontrado. Quando há um controle dependente da densidade, o que já foi demonstrado para *Drosophila* (Chippindale et al. 1993, Leips & Travis 1999) a melhor estratégia é

maximizar o tamanho de sua prole ao longo da vida (McNamara & Houston 1996). Visualizar caracteres relacionados à história de vida de maneira integrada é uma maneira de explicar a adaptação fenotípica (Stearns 1992).

Na literatura existe mais esforço em discussões semânticas e conceituais sobre os limites impostos pelo desenvolvimento do que em investigações empíricas Schlichting & Pigliucci (1998). Como a construção dos sistemas do desenvolvimento limitam a expressão fenotípica? Essa é pergunta que continua sem resposta, mas trabalhos como o nosso agregam ainda mais resultados importantes que apontam no sentido de que as características são limitadas pelo desenvolvimento.

Considerações finais

A plasticidade fenotípica é vista ainda como uma faceta importante da adaptação a condições variáveis. Em ambientes como o Cerrado, por exemplo, onde há uma sazonalidade muito marcada, a plasticidade fenotípica pode desempenhar um papel extremamente importante. Para organismos cujo ciclo de vida é muito curto, mais curto que as mudanças climáticas, a capacidade de expressar fenótipos alternativos pode ser extremamente vantajosa. Diz-se que a sazonalidade do Cerrado é previsível por apresentar duas estações bem definidas, mas a previsibilidade deve ser analisada de acordo com o tempo de vida dos organismos que são submetidos a ela. Em casos de insetos cujos ciclos de vida são longos o suficiente para perceber essa mudança, a simples procura de microclimas mais adequados pode ser a medida mais eficiente. Drosophilídeos apresentam ciclo de vida muito curto e dependem de recursos que, em geral, são efêmeros (Powell 1997, Markow & O'Grady 2005). Em vista disso, a plasticidade fenotípica por parte destes organismos pode ser uma excelente estratégia de sobrevivência.

A distribuição ampla de *Drosophila cardini* pode ser explicada, pelo menos em parte, pela sua plasticidade fenotípica. Muitos trabalhos discutem a relação da plasticidade fenotípica e as invasões biológicas, além das possibilidades futuras em função das mudanças climáticas que acarretam em mudanças ambientais (Lee 2002, Chown et al. 2007, Chown et al. 2010, Sobek-Swant et al. 2012, Pahl et al. 2013).

REFERÊNCIAS

- Bächli G (2013) TaxoDros: The database on taxonomy of Drosophilidae. <http://taxodros.unizh.ch/>. Acessado em 2 de fevereiro de 2014.
- Barker, J. S. F. & R. A. Krebs. 1995. Genetic variation and plasticity of thorax length and wing length in *Drosophila aldrichi* and *Drosophila buzzatii*. *Journal of Evolutionary Biology* **8**:689-709.
- Bernardo, U., P. Pedata, & G. Viggiani. 2007. Phenotypic plasticity of pigmentation and morphometric traits in *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). *Bulletin of Entomological Research* **97**:101-109.
- Bitner-Mathe, B. C. & L. B. Klaczko. 1999. Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. *Heredity* **83**:688-696.
- Boulétreau-Merle, J., R. Allemand, Y. Cohet, & J. David. 1982. Reproductive strategy in *Drosophila melanogaster*: significance of a genetic divergence between temperate and tropical populations. *Oecologia* **53**:323-329.
- Bradshaw, A. D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics* **13**:115-155.
- Brisson, J. A., J. Wilder, & H. Hollocher. 2006. Phylogenetic analysis of the *cardini* group of *Drosophila* with respect to changes in pigmentation. *Evolution* **60**:1228-1241.
- Bubliy, O. A. & V. Loeschcke. 2000. High stressful temperature and genetic variation of five quantitative traits in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* **110**:79-85.

- Bubliy, O. A. & V. Loeschcke. 2002. Effect of low stressful temperature on genetic variation of five quantitative traits in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **89**:70-75.
- Bubliy, O. A. & V. Loeschcke. 2005. Variation of life-history and morphometrical traits in *Drosophila buzzatii* and *Drosophila simulans* collected along an altitudinal gradient from a Canary island. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**:119-136.
- Capy, P., E. Pla, & J. R. David. 1993. Phenotypic and Genetic-Variability of Morphometrical Traits in Natural-Populations of *Drosophila-Melanogaster* and *Drosophila-Simulans* .1. Geographic Variations. *Genetics Selection Evolution* **25**:517-536.
- Carreira, V. P., M. A. Imberti, J. Mensch, & J. J. Fanara. 2013. Gene-by-Temperature interactions and candidate plasticity genes for morphological traits in *Drosophila melanogaster*. *Plos One* **8**.
- Cenzi De Ré, F., E. L. Loreto, & L. J. Robe. 2010. Gene and species trees reveal mitochondrial and nuclear discordance in the *Drosophila cardini* group (Diptera: Drosophilidae). *Invertebrate biology* **129**:353-367.
- Charlesworth, B. 1994. *Evolution in age-structured populations*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Chippindale, A. K., A. M. Leroi, S. B. Kim, & M. R. Rose. 1993. Phenotypic plasticity and selection in *Drosophila* life-history evolution. I. Nutrition and the cost of reproduction. *Journal of Evolutionary Biology* **6**:171-193.

- Chown, S. L., A. A. Hoffmann, T. N. Kristensen, M. J. Angilletta, N. C. Stenseth, & C. Pertoldi. 2010. Adapting to climate change: a perspective from evolutionary physiology. *Climate Research* **43**:3-15.
- Chown, S. L., S. Slabber, M. A. McGeoch, C. Janion, & H. P. Leinaas. 2007. Phenotypic plasticity mediates climate change responses among invasive and indigenous arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**:2531-2537.
- Cohet, Y. & J. David. 1978. Control of the adult reproductive potential by preimaginal thermal conditions. *Oecologia* **36**:295-306.
- Colon-Parrilla, W. V. & I. Perez-Chiesa. 1999. Ethanol Tolerance and Alcohol Dehydrogenase (ADH; EC1. 1.1. 1) Activity in Species of the *cardini* Group of *Drosophila*. *Biochemical Genetics* **37**:95-107.
- David, J., L. Araripe, M. Chakir, H. Legout, B. Lemos, G. Petavy, C. Rohmer, D. Joly, & B. Moreteau. 2005a. Male sterility at extreme temperatures: a significant but neglected phenomenon for understanding *Drosophila* climatic adaptations. *Journal of Evolutionary Biology* **18**:838-846.
- David, J. R., Gibert, P., Legout, H., Petavy, G., Capy, P., & Moreteau, B. 2005b. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity*, **94**(1), 3-12.
- David, J. R., R. Allemand, P. Capy, M. Chakir, P. Gibert, G. Petavy, & B. Moreteau. 2004. Comparative life histories and ecophysiology of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genetica* **120**:151-163.

- David, J. R., P. Gibert, E. Gravot, G. Petavy, J. P. Morin, D. Karan, & B. Moreteau. 1997. Phenotypic plasticity and developmental temperature in *Drosophila*: Analysis and significance of reaction norms of morphometrical traits. *Journal of Thermal Biology* **22**:441-451.
- David, J. R., P. Gibert, H. Legout, G. Petavy, P. Capy, & B. Moreteau. 2005b. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity* **94**:3-12.
- David, J. R., H. Legout, & B. Moreteau. 2006. Phenotypic plasticity of body size in a temperate population of *Drosophila melanogaster*: when the temperature-size rule does not apply. *Journal of Genetics* **85**:9-23.
- David, J. R., B. Moreteau, J. P. Gauthier, G. Petavy, A. Stockel, & A. G. Imasheva. 1994. Reaction Norms of Size Characters in Relation to Growth Temperature in *Drosophila-Melanogaster* - an Isofemale Lines Analysis. *Genetics Selection Evolution* **26**:229-251.
- Day, R. & G. Quinn. 1989. Comparisons of treatments after an analysis of variance in ecology. *Ecological monographs* **59**:433-463.
- Delpuech, J. M., B. Moreteau, J. Chiche, E. Pla, J. Voudibio, & J. R. David. 1995. Phenotypic Plasticity and Reaction Norms in Temperate and Tropical Populations of *Drosophila-Melanogaster* - Ovarian Size and Developmental Temperature. *Evolution* **49**:670-675.
- DeWitt, T. J. & S. M. Scheiner. 2004. Phenotypic plasticity. Oxford University Press. New York.

- Ellers, J. & G. Driessen. 2011. Genetic correlation between temperature-induced plasticity of life-history traits in a soil arthropod. *Evolutionary Ecology* **25**:473-484.
- Emerich, P., H. Valadão, J. Silva, & R. Tidon. 2012. High Abundance of Neotropical Drosophilids (Diptera: Drosophilidae) in Four Cultivated Areas of Central Brazil. *Neotropical Entomology* **41**:83-88.
- Falconer, D. 1981. Introduction to quantitative genetics.
- Ferreira, L. B. & R. Tidon. 2005. Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. *Biodiversity & Conservation* **14**:1809-1821.
- Fox, J., D. Bates, D. Firth, M. Friendly, G. Gorjanc, S. Graves, R. Heiberger, G. Monette, H. Nilsson, & D. Ogle. 2009. Car: companion to applied regression. R package version 1.2-16. Online at <http://cran.r-project.org/web/packages/car/index.html>.
- Games, P. A. & J. F. Howell. 1976. Pairwise multiple comparison procedures with unequal n's and/or variances: a Monte Carlo study. *Journal of Educational and Behavioral Statistics* **1**:113-125.
- Gavrilets, S. & S. M. Scheiner. 1993. The genetics of phenotypic plasticity. V. Evolution of reaction norm shape. *Journal of Evolutionary Biology* **6**:31-48.
- Gebhardt, M. D. & S. C. Stearns. 1988. Reaction norms for developmental time and weight at eclosion in *Drosophila mercatorum*. *Journal of Evolutionary Biology* **1**:335-354.

- Gebhardt, M. D. & S. C. Stearns. 1992. Phenotypic Plasticity for Life-History Traits in *Drosophila melanogaster* .3. Effect of the Environment on Genetic-Parameters. *Genetics Research* **60**:87-101.
- Gibert, P., B. Moreteau, J. R. David, & S. M. Scheiner. 1998. Describing the evolution of reaction norm shape: Body pigmentation in *Drosophila*. *Evolution* **52**:1501-1506.
- Gould, S. J. & R. C. Lewontin. 1979. The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* **205**:581-598.
- Gutteling, E. W., J. A. G. Riksen, J. Bakker, & J. E. Kammenga. 2007. Mapping phenotypic plasticity and genotype-environment interactions affecting life-history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Heredity* **98**:28-37.
- Hartl, D. L. & A. G. Clark. 1997. *Principles of population genetics*. Sinauer associates Sunderland.
- Hodin, J. (2009). She shapes events as they come: plasticity in female insect reproduction. *Phenotypic plasticity of insects: Mechanisms and Consequences*: Science Pub Inc, 423-521..
- Hoffmann, A. 2010. Physiological climatic limits in *Drosophila*: patterns and implications. *The Journal of Experimental Biology* **213**:870-880.
- Hoffmann, A. & P. Parsons. 1997. Extreme environmental change and evolution.
- Hoffmann, A. A. & J. Merilä. 1999. Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Trends in Ecology & Evolution* **14**:96-101.

- Hoffmann, A. A. & C. M. Sgro. 2011. Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* **470**:479-485.
- Hollocher, H., J. L. Hatcher, & E. G. Dyreson. 2000. Genetic and developmental analysis of abdominal pigmentation differences across species in the *Drosophila dunni* subgroup. *Evolution* **54**:2057-2071.
- Huey, R. B., T. Wakefield, W. D. Crill, & G. W. Gilchrist. 1995. Within- and between-generation effects of temperature on early fecundity of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **74**:216-223.
- Imasheva, A. G., V. Loeschcke, L. A. Zhivotovsky, & O. E. Lazebny. 1998. Stress temperatures and quantitative variation in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **81**:246-253.
- Imasheva, A. G., B. Moreteau, & J. R. David. 2000. Growth temperature and genetic variability of wing dimensions in *Drosophila*: opposite trends in two sibling species. *Genetical Research* **76**:237-247.
- Jablonka, E. & M. J. Lamb. 1998. Epigenetic inheritance in evolution. *Journal of Evolutionary Biology* **11**:159-183.
- Jablonka, E. & M. J. Lamb. 2005. Evolution in four dimensions: Genetic, epigenetic, behavioral, and symbolic variation in the history of life.
- Karan, D., B. Moreteau, & J. R. David. 1999. Growth temperature and reaction norms of morphometrical traits in a tropical drosophilid: *Zaprionus indianus*. *Heredity* **83**:398-407.

- Kingsolver, J. G., R. Izem, & G. J. Ragland. 2004. Plasticity of size and growth in fluctuating thermal environments: Comparing reaction norms and performance curves. *Integrative and Comparative Biology* **44**:450-460.
- Klepsatel, P., M. Gáliková, N. Maio, C. D. Huber, C. Schlötterer, & T. Flatt. 2013. Variation in thermal performance and reaction norms among populations of *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **67**:3573-3587.
- Leblanc, L., P. M. O'Grady, D. Rubinoff, & S. L. Montgomery. 2009. New immigrant drosophilidae in hawaii, and a checklist of the established immigrant species. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*. 41:121-127.
- Lee, C. E. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution* **17**:386-391.
- Legendre, P. & L. Legendre. 1998. *Numerical ecology*. Elsevier (Amsterdam and New York).
- Leips, J. & J. Travis. 1999. The comparative expression of life-history traits and its relationship to the numerical dynamics of four populations of the least killifish. *Journal of Animal Ecology* **68**:595-616.
- Lewontin, R. C. 1974. *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press. New York.
- Lewontin, R. C. 2001. *The triple helix: Gene, organism, and environment*. Harvard University Press.

- Markow, T. A. & P. M. O'Grady. 2006. *Drosophila: A guide to species identification and use*. Academic Press, Londres.
- Mata, R. A., M. McGeoch, & R. Tidon. 2008. Drosophilid assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the Brazilian Savanna. *Biodiversity and Conservation* **17**:2899-2916.
- Mayr, E. 1982. *The growth of biological thought: Diversity, evolution, and inheritance*. Harvard University Press.
- McNamara, J. M. & A. I. Houston. 1996. State-dependent life histories. *Nature* **380**:215-221.
- Merilä, J. & A. P. Hendry. 2014. Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: the problem and the evidence. *Evolutionary Applications* **7**:1-14.
- Moczek, A. P. & H. F. Nijhout. 2003. Rapid evolution of a polyphenic threshold. *Evolution & Development* **5**:259-268.
- Moczek, A. P., S. Sultan, S. Foster, C. Ledon-Rettig, I. Dworkin, H. F. Nijhout, E. Abouheif, & D. W. Pfennig. 2011. The role of developmental plasticity in evolutionary innovation. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* **278**:2705-2713.
- Moreteau, B., P. Capy, A. Alonsomoraga, A. Munozserrano, J. Stockel, & J. R. David. 1995. Genetic-Characterization of Geographic Populations Using Morphometrical Traits in *Drosophila melanogaster* - Isogroups Versus Isofemale Lines. *Genetica* **96**:207-215.

- Morgan, H. D., H. G. Sutherland, D. I. Martin, & E. Whitelaw. 1999. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature Genetics* **23**:314-318.
- Morin, J. P., B. Moreteau, G. Petavy, R. Parkash, & J. R. David. 1997. Reaction norms of morphological traits in *Drosophila*: Adaptive shape changes in a stenotherm circumtropical species? *Evolution* **51**:1140-1148.
- Murphy, P., J. Giesel, & M. Manlove. 1983. Temperature effects on life history variation in *Drosophila simulans*. *Evolution*:1181-1192.
- Nunney, L. & W. Cheung. 1997. The effect of temperature on body size and fecundity in female *Drosophila melanogaster*: Evidence for adaptive plasticity. *Evolution* **51**:1529-1535.
- Nylin, S. & K. Gotthard. 1998. Plasticity in life-history traits. *Annual Review of Entomology* **43**:63-83.
- Oliveira, H. V. 2013. Associação entre drosofilídeos (Insecta: Diptera) e frutos como sítios de criação larval. Universidade de Brasília.
- Pahl, A. T., J. Kollmann, A. Mayer, & S. Haider. 2013. No evidence for local adaptation in an invasive alien plant: field and greenhouse experiments tracing a colonization sequence. *Annals of Botany* **112**:1921-1930.
- Parker, G. A. & J. M. Smith. 1990. Optimality theory in evolutionary biology. *Nature* **348**:27-33.

- Peres-Neto, P. R., P. Legendre, S. Dray, & D. Borcard. 2006. Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology* **87**:2614-2625.
- Petavy, G., J. David, P. Gibert, & B. Moreteau. 2001. Viability and rate of development at different temperatures in *Drosophila*: a comparison of constant and alternating thermal regimes. *Journal of Thermal Biology* **26**:29-39.
- Pigliucci, M. 2001. Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. Johns Hopkins University Press.
- Pigliucci, M. & G. Muller. 2010. Evolution—the extended synthesis.
- Powell, A. M., M. Davis, & J. R. Powell. 2010. Phenotypic plasticity across 50 MY of evolution: *Drosophila* wing size and temperature. *Journal of Insect Physiology* **56**:380-382.
- Powell, J. R. 1997. Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* Model (Oxford Series in Ecology & Evolution).
- Prasad, N. & A. Joshi. 2003. What have two decades of laboratory life-history evolution studies on *Drosophila melanogaster* taught us? *Journal of Genetics* **82**:45-76.
- Quinn, G. G. P. & M. J. Keough. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press.
- Ridley, M. 2006. Evolução. Artmed.

- Rocha, F., H. F. Medeiros, & L. B. Klaczko. 2009. The reaction norm for abdominal pigmentation and its curve in *Drosophila mediopunctata* depend on the mean phenotypic value. *Evolution* **63**:280-287.
- Rocha, F. B. & L. B. Klaczko. 2012. Connecting the dots of nonlinear reaction norms unravels the threads of genotype-environment interaction in *Drosophila*. *Evolution* **66**:3404-3416.
- Roque, F., S. C. F. de Oliveira, & R. Tidon. 2011. Technical adaptations of retention traps used to catch drosophilids. *Drosophila Information Service* **94**:140.
- Schlichting, C. D. & M. Pigliucci. 1998. Phenotypic evolution: a reaction norm perspective. Sinauer Associates Incorporated.
- Sisodia, S. & B. N. Singh. 2002. Effect of temperature on longevity and productivity in *Drosophila ananassae*: Evidence for adaptive plasticity and trade-off between longevity and productivity. *Genetica* **114**:95-102.
- Sobek-Swant, S., J. C. Crosthwaite, D. B. Lyons, & B. J. Sinclair. 2012. Could phenotypic plasticity limit an invasive species? Incomplete reversibility of mid-winter deacclimation in emerald ash borer. *Biological Invasions* **14**:115-125.
- Sokal, R. & F. Rohlf. 1995. Biometry New York, NY: WH Freeman & Co.
- Soto, E. M., I. M. Soto, V. P. Carreira, J. J. Fanara, & E. Hasson. 2008. Host-related life history traits in interspecific hybrids of cactophilic *Drosophila*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **126**:18-27.

- Soto, E. M., I. M. Soto, M. D. Cortese, & E. Hasson. 2011. Oviposition site preferences and performance in natural resources in the human commensals *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Fly* **5**:102-109.
- Soto, I. M., M. H. Manfrin, F. D. M. Sene, & E. Hasson. 2007. Viability and developmental time and *Drosophila gouveai* and *Drosophila antonietae* (Diptera : Drosophilidae) are dependent on the cactus host. *Annals of the Entomological Society of America* **100**:490-496.
- Sperandio, E. M. 2012. Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do Cerrado.
- Stearns, S. 1992. The evolution of life histories.
- Tidon, R. 2006. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. *Biological Journal of the Linnean Society* **87**:233-247.
- Val, F., C. Vilela, & M. Marques. 1981. Drosophilidae of the Neotropical region. The genetics and biology of *Drosophila* **3**:123-168.
- Valladares, F., D. Sanchez-Gomez, & M. A. Zavala. 2006. Quantitative Estimation of Phenotypic Plasticity: Bridging the Gap between the Evolutionary Concept and Its Ecological Applications. *Journal of Ecology*:1103-1116.
- Van Valen, L. 2005. The statistics of variation. *Variation: A central concept in biology*:29-48.

- Vilela, C. R., A. F. G. Silva, & F. M. Sene. 2002. Preliminary data on geographical distribution of *Drosophila* species within morpho-climatic domains of Brazil III: The *cardini* group. *Revista Brasileira de Entomologia* **46**:139-148.
- West-Eberhard, M. J. 2003. *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press.
- Wickham, H. 2009. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer Publishing Company, Incorporated.
- Wong, L. C. & P. Schedl. 2006. Dissection of *Drosophila* ovaries. *Journal of visualized experiments: JoVE*.
- Wund, M. A. 2012. Assessing the Impacts of Phenotypic Plasticity on Evolution. *Integrative and Comparative Biology* **52**:5-15.
- Zar, J. H. 2010. *Biostatistical analysis*.
- Zuur, A. F., E. N. Ieno, & G. M. Smith. 2007. *Analysing ecological data*. Springer.

Material Suplementar

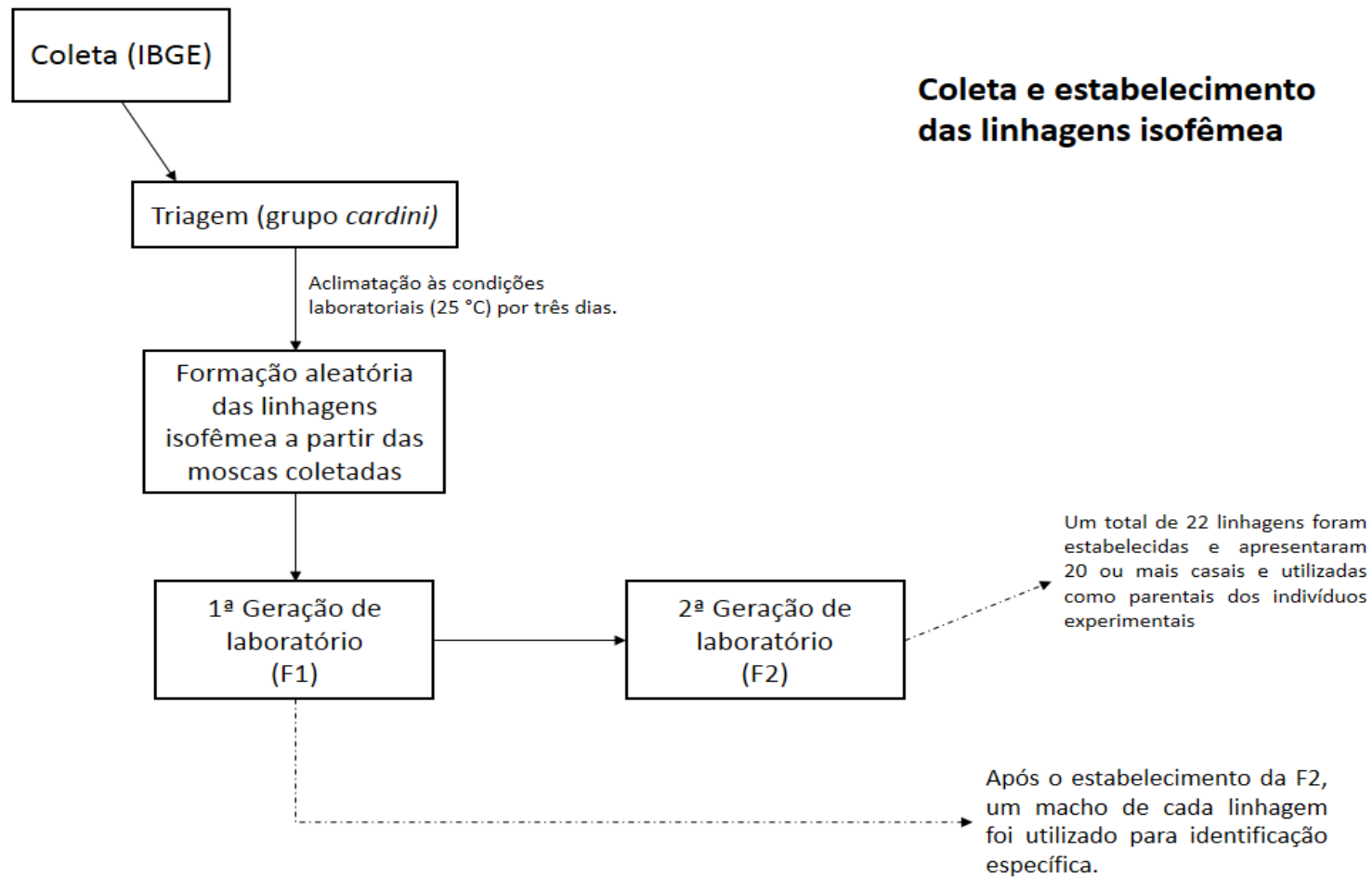


Figura S1. Esquema da primeira parte do desenho experimental

Esquema da coleta de ovos e etapas subsequentes das coletas de dados.

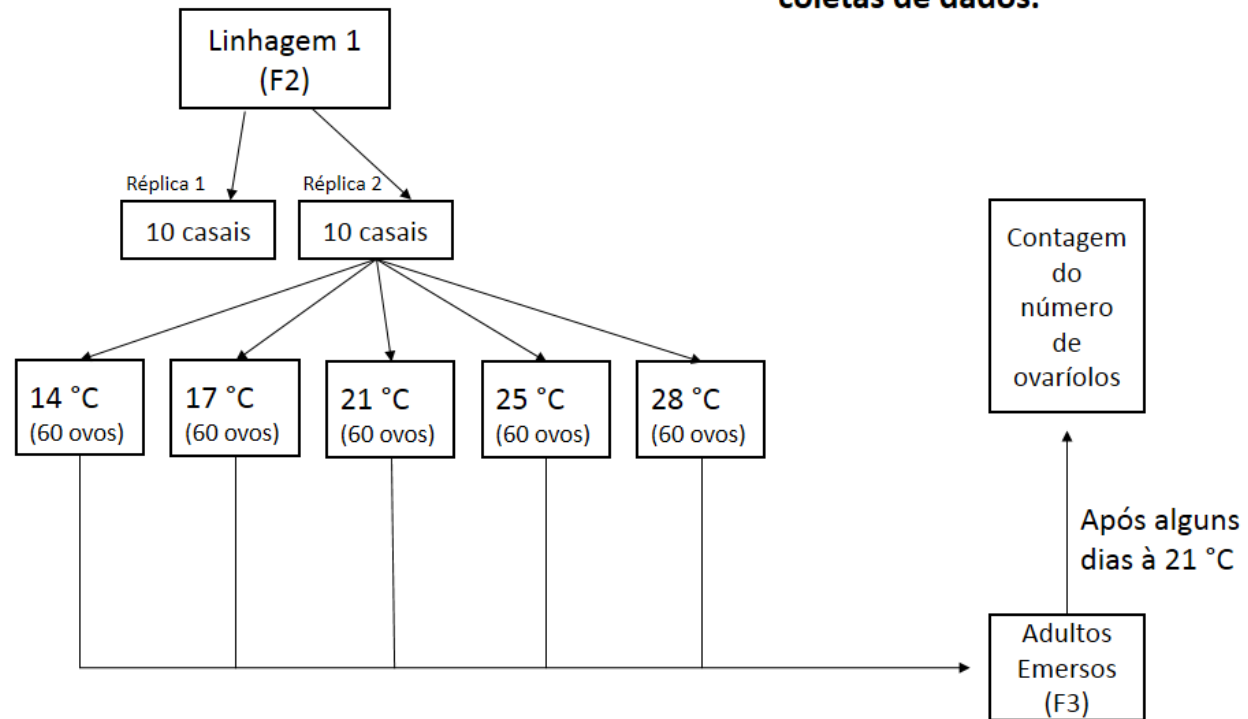


Figura S2. Esquema da segunda parte do desenho experimental.

RECEITA MEIO DE CULTURA DE FUBÁ

1 – Separe duas panelas: uma para o fubá e a outra para o ágar.

2 – Misture na PANELA DE FUBÁ (panela final):

- 450 ml de água fria
- 70 g de fubá de milho
- 19 g de fermento biológico seco

3 – Reserve a panela de fubá por três minutos e leve ao fogo

4 – Misture na PANELA DE ÁGAR:

- 500 ml de água fria
- 14 g de ágar

4 – Agite bem e aqueça, sempre misturando o conteúdo, até que o líquido se torne transparente. (esta etapa vai determinar a rigidez do meio. Quanto mais tempo em fogo o ágar ficar, mais rígido o meio se tornará). Adicione 40g de açúcar mascavo e continue até atingir o ponto. Em caso de dúvida, quando a mistura iniciar a fervura é um ponto de referência.

5 – Transfira o conteúdo da panela de ágar para a panela de fubá. Ferva em fogo baixo por 10 a 15 minutos ou até chegar no ponto (mistura densa)

6 – Desligue o fogo, aguarde a mistura esfriar até 70°C e adicione 1,5 g de Nipagim.

RECEITA GRUPO JEAN-DAVID

Ingredientes:

15 g de ágar

115 g de fermento biológico seco

110 g de fubá de milho

5,75 g de Nipagim

1000 g de água

1 – Adicione ágar à panela com água até o início da fervura

2 – Adicione o fubá e o fermento biológico e mexa até atingir consistência

3 - Desligue o fogo, aguarde a mistura esfriar até 70°C e adrescente 1,5 g de Nipagim.

RECEITA MEIO DE CULTURA SIMPLIFICADO

15 g de ágar

100 g de fermento biológico seco

150 g de açúcar

1,5 g de Nipagim.

1 – Ferver água + ágar

2 – Adicionar fermento e aguardar aproximadamente 10 minutos

3 – Desligue o fogo, aguarde a mistura esfriar até 70°C e adrescente 1,5 g de Nipagim.

Tabela S1. Estatísticas descritivas do tempo de desenvolvimento de ovo a adulto (dias).

Todas as linhagens foram agrupadas.

Temperatura	N de casos	Média	Erro padrão da média	Desvio Padrão
28	283	10,809	0,059	0,996
25	458	11,284	0,057	1,224
21	626	16,051	0,056	1,395
17	392	28,296	0,092	1,816
14	117	43,291	0,234	2,533

Tabela S2. Estatísticas descritivas do número de ovariolos. Todas as linhagens foram agrupadas.

Temperatura	N de casos	Média	Erro padrão da média	Desvio Padrão
28	130	39,892	0,416	4,745
25	213	46,07	0,29	4,234
21	237	49,059	0,287	4,418
17	175	50,657	0,352	4,651
14	45	42,711	1,061	7,118

Tabela S3. Estatísticas descritivas da viabilidade. Todas as linhagens foram agrupadas.

Temperatura	N de casos	Média	Erro padrão da média	Desvio Padrão
28	32	0,156	0,021	0,119
25	32	0,318	0,029	0,162
21	32	0,373	0,027	0,152
17	32	0,28	0,023	0,132
14	32	0,062	0,011	0,061

Tabela S4. Anova de 2 fatores do tempo de desenvolvimento. df = graus de liberdade,

SS = soma dos quadrados, MS = quadrados médios.

	df	SS	MS	F	p
Temperatura	4	51,126	12,781	10,603,812	<0,01
Isofêmea	11	0,144	0,013	10,847	<0,01
Temperatura*Isofêmea	44	0,240	0,005	4,530	<0,01
Resíduo	1,816	2,189	0,001		

Tabela S5. Anova de 2 fatores do número de ovariolos. df = graus de liberdade, SS = soma dos quadrados, MS = quadrados médios.

	df	SS	MS	F-Ratio	p-Value
Temperatura	4	10139,22	2534,805	131,352	<0,01
Isofêmea	11	1094,004	99,455	5,154	<0,01
Temperatura*Isofêmea	44	1481,851	33,678	1,745	0,002
Resíduo	740	14280,37	19,298		

Tabela S6. Anova de 2 fatores da viabilidade. df = graus de liberdade, SS = soma dos quadrados, MS = quadrados médios.

	df	SS	MS	F-Ratio	p-Value
Temperatura	4	3,848	0,962	34,297	<0,01
Isofêmea	11	0,622	0,057	2,016	0,034
Temperatura*Isofêmea	44	0,691	0,016	0,560	0,984
Resíduo	100	2,805	0,028		

Tabela S7. Parâmetros polinomiais das funções que descrevem o tempo de desenvolvimento (dias), número de ovariolos e viabilidade das 12 linhagens isofêmea utilizadas e valores característicos derivados das funções. MV = valor máximo ou mínimo, TMV = Temperatura de valor máximo ou mínimo.

Isofêmea	Tempo de desenvolvimento					Número de ovariolos					Viabilidade				
	g0	g1	g2	TMV	MV	g0	g1	g2	TMV	MV	g0	g1	g2	TMV	MV
1	180.234	-12.876	0.244	26.3852	10.3658	-19.415	6.987	-0.176	19.8494	49.929	-3.47	0.387	-0.009	21.5	0.69025
2	162.558	-11.542	0.219	26.3516	10.4829	-58.981	10.834	-0.26	20.8346	53.8801	-2.706	0.306	-0.007	21.8571	0.63814
3	166.237	-11.952	0.23	25.9826	10.9649	-43.631	9.299	-0.226	20.573	52.0232	-4.029	0.447	-0.01	22.35	0.96623
4	159.853	-11.484	0.221	25.9819	10.6649	-10.747	5.747	-0.141	20.3794	47.8133	-3.124	0.36	-0.009	20	0.476
5	151.609	-10.664	0.202	26.396	10.8653	-19.677	7.247	-0.186	19.4812	50.9131	-2.057	0.236	-0.005	23.6	0.7278
6	147.172	-10.33	0.195	26.4872	10.3657	-29.829	7.633	-0.188	20.3005	47.648	-2.64	0.309	-0.007	22.0714	0.77004
7	156.488	-11.173	0.214	26.1051	10.6516	9.185	4.453	-0.119	18.7101	50.843	-2.603	0.31	-0.007	22.1429	0.82914
8	157.486	-11.259	0.215	26.1837	10.0847	-5.256	5.207	-0.127	20.5	48.1158	-2.39	0.268	-0.006	22.3333	0.60267
9	159.145	-11.297	0.215	26.2721	10.7471	10.261	4.322	-0.114	18.9561	51.2252	-2.734	0.324	-0.008	20.25	0.5465
10	168.095	-12.153	0.234	25.9679	10.3008	-2.955	5.868	-0.156	18.8077	52.2268	-2.352	0.272	-0.006	22.6667	0.73067
11	170.496	-12.371	0.239	25.8808	10.4106	-20.096	7.205	-0.182	19.794	51.2117	-3.398	0.372	-0.008	23.25	0.9265
12	168.062	-12.17	0.234	26.0043	9.826	-72.704	11.705	-0.276	21.2047	51.3966	-3.099	0.359	-0.008	22.4375	0.92853
Média	162.3	-11.6	0.2	26.2	10.5	-22.0	7.2	-0.2	19.9	50.6	-2.9	0.3	0.0	22.0	0.7
Erro padrão	2.6	0.2	0.0	0.1	0.1	7.4	0.7	0.0	0.2	0.6	0.2	0.0	0.0	0.3	0.0

Tabela S8. Parâmetros polinomiais das funções que descrevem valor adaptativo e tempo de desenvolvimento de cada linhagem isofêmea de *D. cardini*. g_if = parâmetros do valor adaptativo; g_id = parâmetros tempo de desenvolvimento; TMF = temperatura de maior valor adaptativo potencial; TMT = temperatura de menor tempo de desenvolvimento; TMD = temperatura de maior diferença entre tempo de desenvolvimento e valor adaptativo potencial.

Isofêmea	Valor adaptativo potencial				Tempo de desenvolvimento				
	g0f	g1f	g2f	TMF (°C)	g0d	g1d	g2d	TMT (°C)	TMD (°C)
Isofêmea 1	-6,82	0,747	-0,018	20,75	3,791	-0,274	0,005	27,40	22,20
Isofêmea 2	-6,727	0,719	-0,017	21,15	3,66	-0,259	0,005	25,90	22,23
Isofêmea 3	-6,74	0,724	-0,017	21,29	3,724	-0,268	0,005	26,80	22,55
Isofêmea 4	-5,985	0,661	-0,016	20,66	3,725	-0,266	0,005	26,60	22,07
Isofêmea 5	-5,397	0,603	-0,014	21,54	3,727	-0,267	0,005	26,70	22,89
Isofêmea 6	-6,083	0,665	-0,016	20,78	3,796	-0,274	0,005	27,40	22,36
Isofêmea 7	-5,51	0,622	-0,015	20,73	3,79	-0,273	0,005	27,30	22,38
Isofêmea 8	-5,63	0,585	-0,013	22,50	3,715	-0,265	0,005	26,50	23,61
Isofêmea 9	-5,202	0,582	-0,014	20,79	3,733	-0,268	0,005	26,80	22,37
Isofêmea 10	-6,475	0,709	-0,017	20,85	3,795	-0,274	0,005	27,40	22,34
Isofêmea 11	-6,381	0,687	-0,016	21,47	3,899	-0,286	0,006	23,83	22,11
Isofêmea 12	-5,234	0,583	-0,014	20,82	3,818	-0,276	0,005	27,60	22,61
Média	-6,193	0,676	-0,016	20,75	3,747	-0,269	0,005	27,80	22,50
Erro padrão	0.1	0.01	<0.01	0.1	0.01	<0.01	<0.01	0.2	0.1