

RAQUEL MORRISSY HOSTIN - GODOY

**EFEITOS DO ENDOCRUZAMENTO E DA DERIVA GENÉTICA  
SOBRE A ASSIMETRIA FLUTUANTE (AF) EM ASAS DE  
*Drosophila melanogaster***



Monografia apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Departamento de Genética.

*Orientador:* Dr. João Carlos Marques Magalhães

*Co-orientador:* Msc. Marcio Pie

*Colaborador:* Msc. Erasto Villa Branco Júnior

CURITIBA

2004

## Agradecimentos

Ao Prof. João Carlos por me receber e me aceitar como sua orientada para a elaboração deste trabalho. Agradeço pela oportunidade e por toda orientação.

Ao Márcio pela paciência, conselhos e dicas com os programas de cálculos e análises de dados. Não podendo deixar de citar os importantes momentos de descontração com o pessoal da Zoologia.

Ao Prof. Erasto por ceder o laboratório para a viabilização desta pesquisa, por me ensinar como capturar, manter e observar as drosófilas. Por todos os conselhos e idéias que facilitaram muito o trabalho.

Ao Prof. Juarez pela grande contribuição no momento das análises dos dados. Pela paciência, pelo incentivo e por todo o interesse.

Ao Ricardo por permitir que eu utilizasse o laboratório de genética durante seus horários de aula.

Ao Prof. Ives pelo empréstimo do *permount* e pelas dicas de como usá-lo.

Ao Prof. Marco, da Biologia Celular, pelo empréstimo do Fotomicroscópio, pelas dicas de como usá-lo para observar o meu material e por toda a atenção.

Ao Prof. Ciro, também da Biologia Celular, pela ajuda especial num momento de dificuldade com o Fotomicroscópio numa tarde de sábado.

À Elizabete e à Dona Izolde pela grande ajuda com a limpeza do material do laboratório e pelas conversas nas horas vagas. À Eli também agradeço pelo preparo de alguns meios de cultivo.

À Valéria pelos papos descontraídos e por sempre me avisar das festas do departamento, apesar de só ter comparecido a uma delas.

Aos amigos do Mestrado, Roxane e Alessandro, pela amizade e pelas visitas ao laboratório para um bate-papo de vez em quando.

Aos amigos de infância, Ale, Clau, Carla e Fabi pela preocupação, pelo incentivo e pela grande amizade. Ao Rapha, não só pela amizade e incentivo, mas também pela ajuda com os dados.

Aos meus pais, Martha e Zéca, por tudo o que sou e que pude construir até hoje. A eles agradeço pelo amor e paciência acima de tudo e por sempre acreditarem em mim. Agradeço em especial à minha mãe pela revisão geral deste trabalho.

Ao meu irmão Leo pela força, por compartilhar comigo os momentos mais difíceis e me incentivar sempre.

Ao meu marido Marcelo, por estar ao meu lado em todos os momentos. Agradeço pela paciência, pelo carinho, pelo amor e por todo o trabalho que teve para me ajudar, sem o qual seria impossível concluir mais esta etapa.

Obrigada também a todos aqueles que colaboraram para a realização deste trabalho e que por ventura não estejam citados aqui.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>i</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>i</b>
<b>Lista de Gráficos</b> .....	<b>i</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>ii</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>01</b>
1.1 Revisão Bibliográfica .....	01
1.2 Objetivos .....	03
<b>2. Material</b> .....	<b>04</b>
2.1 Material biológico .....	04
2.2 Material de consumo .....	07
2.3 Equipamentos .....	07
2.4 Software .....	07
<b>3. Métodos</b> .....	<b>08</b>
3.1 Coletas e manutenção das drosófilas .....	08
3.2 Montagem das linhagens .....	09
3.3 Montagem das lâminas.....	11
3.4 Obtenção das imagens.....	12
3.5 Obtenção dos dados .....	15
3.6 Análises dos dados .....	16
<b>4. Resultados</b> .....	<b>19</b>
<b>5. Discussão</b> .....	<b>24</b>
<b>6. Conclusão</b> .....	<b>26</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>27</b>
<b>8. Anexos</b> .....	<b>30</b>

## Lista de Figuras

Figura 01 - Fases do desenvolvimento da <i>Drosophila melanogaster</i> .....	05
Figura 02 - Esquema da armadilha utilizada para a coleta dos animais em seu ambiente natural. ....	06
Figura 03 - Foto ilustrando a disposição das asas na lâmina. ....	11
Figura 04a - Os dez marcos anatômicos anteriormente determinados para a obtenção dos dados (1-10). ....	14
Figura 04b - Os oito marcos anatômicos utilizados para a obtenção dos dados (1-8). ....	14

## Lista de Tabelas

Tabela 01 - Esquema mostrando como foi a origem de cada geração. ....	10
Tabela 02 - Quadro da ANOVA .....	17

## Lista de Gráficos

Gráfico 01 - Gráfico representando as médias dos valores de tamanho de cada linhagem (L25, L29, L30) ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5). ....	43
Gráfico 02 - Gráfico representando os as médias dos valores de forma de cada linhagem (L25, L29, L30) ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5). ....	44
Gráfico 03 - Gráfico representando as médias dos valores de tamanho dos machos (L25 M) e das fêmeas (L25 F), da linhagem 25 ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5). ....	45

Gráfico 04 - Gráfico representando as médias dos valores de tamanho dos machos (L29 M) e das fêmeas (L29 F), da linhagem 29 ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5). .....	45
Gráfico 05 - Gráfico representando as médias dos valores de tamanho dos machos (L30 M) e das fêmeas (L30 F), da linhagem 30 ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5). .....	46
Gráfico 06 - Gráfico representando as médias dos valores de forma dos machos (L25 M) e das fêmeas (L25 F), da linhagem 25 ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5). .....	46
Gráfico 07 - Gráfico representando as médias dos valores de forma dos machos (L29 M) e das fêmeas (L29 F), da linhagem 29 ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5). ). .....	47
Gráfico 08 - Gráfico representando as médias dos valores de forma dos machos (L30 M) e das fêmeas (L30 F), da linhagem 30 ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5). ). .....	47

## Resumo

O endocruzamento caracteriza-se pela reprodução entre indivíduos aparentados em níveis maiores que os esperados pelo acaso. A deriva genética retrata a flutuação de frequências alélicas numa população ao longo das gerações pelos efeitos aleatórios dos genes formadores da próxima geração. Tanto o endocruzamento quanto a deriva aumentam a homozigose, o que pode resultar numa instabilidade do desenvolvimento, que é constatada através da assimetria flutuante (AF). Esta última demonstra a incapacidade de um organismo em se desenvolver igualmente em ambos os lados do corpo, no que diz respeito a uma característica bilateral simétrica. Pequenas populações de drosófilas sofrem de forma mais intensa esses efeitos, devido ao seu número reduzido de indivíduos. Para constatar a presença de AF em *Drosophila melanogaster*, utilizou-se o par de asas de cada indivíduo, sendo cada uma delas marcada em 8 (oito) pontos distintos. Esses pontos, ou marcos anatômicos, foram escolhidos por serem locais de encontro de estruturas (venação das asas). Coletou-se na natureza fêmeas, que deram origem a 13 linhagens. Mantidas em laboratório, três destas linhagens alcançaram cinco gerações. As análises das asas desses animais foram realizadas por meio de métodos baseados em morfometria geométrica. Para tais análises, foram utilizados programas do pacote TPS (ROHLF), que realizaram cálculos resultando nas distâncias de procrustes (AF de forma) e no tamanho de centróides (AF de tamanho). Após as análises estatísticas, não se constatou diferença significativa entre os valores de assimetria, comparando-se as gerações (G0, G1, G2 e G5), as linhagens (L25, L29 e L30) e os sexos, entre si. Esse resultado foi o mesmo tanto para a AF de forma quanto para a de tamanho.

## 1. Introdução

### 1.1 Revisão Bibliográfica

A assimetria flutuante (AF) é caracterizada como sendo o resultado de uma incapacidade do organismo de se desenvolver igualmente em ambos os lados do corpo, em se tratando de uma característica bilateral simétrica (SWADDLE et al., 1994). Segundo CLARKE (1992), o desenvolvimento simétrico dos dois lados do corpo sofre influência das condições genéticas e ambientais. Diversas teorias propõem que a presença de um stress ambiental ou genético durante a ontogênese reduz a eficiência dos processos normais do desenvolvimento, o que começa a ser refletido por um aumento na AF (ADAMS & NISWANDER <sup>1</sup>; CLARKE <sup>2</sup> et al., apud CLARKE, 1992). De acordo com Van VALEN (1962), a AF estima os menores efeitos da variação no processo de desenvolvimento. Acrescenta ainda que essas variações diferem entre os indivíduos e que há também diferenças individuais quanto à resistência a essas variações. Devido às interrelações do sistema morfogenético, é possível um organismo bem resistente em uma característica ser igualmente resistente em outras (Van VALEN, 1962). Por essa razão as perturbações microambientais nos diversos sistemas de um indivíduo podem resultar em uma tendência comum das diferentes características para a AF, mais altas ou mais baixas, porém isto necessita ser investigado para cada característica. Os conceitos de assimetria individual e também os populacionais são de grande importância para os biólogos evolucionistas. Quanto ao nível individual, o interesse está em empregar a assimetria como um indicador das condições de desenvolvimento do indivíduo ou como uma maneira de investigar sua utilidade como característica sinalizadora entre os membros da espécie (MOLLER; SWADDLE, 1997). Para se medir o nível de assimetria flutuante em indivíduos, de acordo com MOLLER e SWADDLE (1997), deve-se utilizar os desvios simples para a simetria, ou seja, a diferença entre o lado direito e o esquerdo ( $R_i - L_i$ ).

Algumas pesquisas demonstram que indivíduos sob *stress* podem ter uma menor estabilidade no desenvolvimento assim como maiores médias de AF. Estes

---

<sup>1</sup> ADAMS, M.S. & NISWANDER, J.D. 1967: Developmental 'noise' and a congenital malformation. – Genet. Res. Camb. 10: 313-317.

<sup>2</sup> CLARKE, G. M., BRAND, G. W. & WHITTEN, M. J. 1986: Fluctuating asymmetry: A technique for measuring development stress caused by inbreeding. – Aust. J. Biol. Sci. 39: 145-53.

argumentos baseiam-se nas relações positivas encontradas entre a AF e o *stress* ambiental, como a poluição, ou genético, como o endocruzamento (LEARY & ALLENDORF<sup>3</sup>; MARKOW<sup>4</sup>; *apud* SANTOS, 2001). Trabalhos mais recentes usam a AF como um índice sensível da qualidade genética total de um indivíduo, relacionada ao sucesso reprodutivo (MOLLER<sup>5</sup>; MOLLER & POMIANKOWSKI<sup>6</sup>; WATSON & THORNHILL<sup>7</sup> *apud* SANTOS, 2001).

O endocruzamento ou endogamia é a reprodução entre indivíduos aparentados em nível maior do que o que seria esperado pelo acaso e resulta em um aumento da homozigose por origem comum (GRIFFITHS et al., 2002). A deriva e a seleção reduzem a variabilidade genética, e estes fatores, além do endocruzamento, podem vir a aumentar a instabilidade do desenvolvimento, o que se constata através da AF.

A deriva genética aleatória é definida como sendo as flutuações das frequências alélicas de uma população, de geração a geração, devidas a efeitos aleatórios na amostragem dos genes que irão formar a próxima geração, e este efeito é tanto maior quanto menor for o tamanho da população (RIEGLER, MICHAELIS e GREEN, 1982). A deriva pode levar a perdas e fixações de alelos sendo relacionada ao endocruzamento, pois aumenta a taxa de homozigose.

Em populações subdivididas, ou melhor, populações isoladas, obtidas a partir da mesma população original, de mesmo tamanho, a taxa de fixação (F) será em média igual entre as subpopulações, mas os alelos fixados ou perdidos poderão ser diferentes. Deste modo, a variabilidade genotípica e fenotípica entre as sub-populações deve aumentar.

Caracteres morfológicos, como a venação das asas de insetos, são quase sempre multifatoriais. Um grande número de genes de diferentes loci devem atuar sobre eles, assim como fatores ambientais que interferem com o desenvolvimento do organismo. Obtendo-se diversas medidas das asas pode-se calcular o Índice de Assimetria (IA) e verificar a AF para cada uma dessas medidas. Espera-se que entre

---

<sup>3</sup> LEARY, R.F. & ALLENDORF, F.W. 1989. Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: implications for conservation biology. *Trends Ecol. Evol.* 4: 214-217.

<sup>4</sup> MARKOW, T. A. 1995. Evolutionary ecology and developmental instability. *Annu. Rev. Entomol.* 40:105-120.

<sup>5</sup> MOLLER, A. P. 1993. Developmental stability, sexual selection and speciation. *J. Evol. Biol.* 6: 493-509.

<sup>6</sup> MOLLER, A. P. & POMIANKOWSKI. 1993 Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Genetica* 89:267-279.

diversas populações obtidas pelo isolamento de linhagens a partir de uma população original, diferentes genes sejam perdidos ou fixados. Deste modo, as diferenças entre linhagens deverão ser maiores que as diferenças dentro de cada linhagem, e isto deve ocorrer em função dos genes que foram aleatoriamente fixados ou perdidos.

Pesquisas científicas nas áreas evolutiva, comportamental e do desenvolvimento, vêm se utilizando da AF, porém são poucas as pesquisas sobre AF em populações naturais de drosófilas. É interessante, portanto, investigar o nível de AF em uma população deste tipo, relacionando-o com os efeitos do endocruzamento, deriva e seleção sobre este parâmetro.

## 1.2 Objetivos

- Revisar a bibliografia acerca de assimetria flutuante (AF)
- Caracterizar a variação morfológica das asas de uma população natural de *Drosophila melanogaster*.
- Avaliar o grau de AF em caracteres morfológicos da asa de *D. melanogaster*, nesta população.
- Verificar o efeito de endocruzamento e de deriva genética sobre a AF em linhagens de *D. melanogaster*, obtidas a partir da população investigada.

---

<sup>7</sup> WATSON, P. J. & THORNHILL, R. 1994. Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Trends. Ecol. Evol.* 9:21-25.

## 2. Material

### 2.1 Material biológico

*D. melanogaster* é uma espécie de pequenos dípteros, descrita em 1830 por Meigen. Sendo um organismo de ciclo vital curto, fácil captura, reprodução e manutenção em laboratório, é constantemente empregada em trabalhos científicos. Este animal vem sendo utilizado como um modelo de sistema de investigação de muitos processos celulares e do desenvolvimento, comuns a vários eucariotos, incluindo os seres humanos (GRAF, 1992). As fêmeas são muito fecundas, chegando a produzir centenas de ovos durante seu curto período de vida. Esta numerosa população facilita a realização de estudos, sobretudo análises estatísticas. Sua utilização em pesquisas genéticas teve início na primeira década do século XX, por Morgan, quem constatou a presença dos diversos caracteres herdáveis, passíveis de serem analisados nas gerações seguintes (FREIRE-MAIA; PAVAN, 1949). Seus estudos e de seus colaboradores viabilizaram descobertas científicas importantes, como *crossing-over* e *linkage* (OLIVEIRA, 1967).

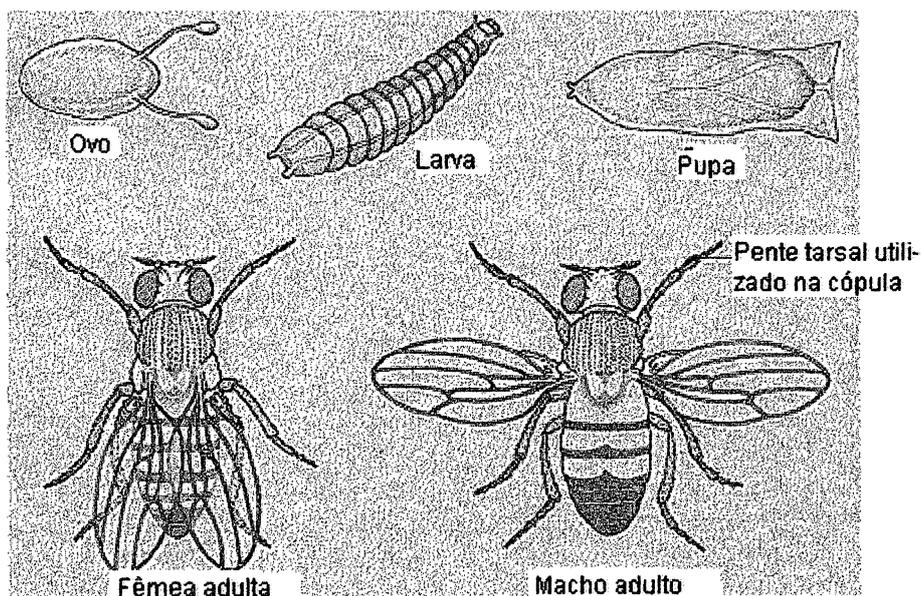
Os cromossomos dessa espécie são 4 pares, sendo os sexuais (X e Y) e os autossômicos (2, 3 e 4). O sequenciamento do seu genoma foi determinado pelo grupo *Celera Genomics (USA)* (ADAMS, *et al*, 2000). Possui aproximadamente 14 mil genes e cerca de 165 milhões de bases. O fato de seu genoma já se encontrar mapeado (BDGP Resources, 2004) a torna, ainda hoje, um excelente material para estudos avançados, como os estudos de genética do desenvolvimento e do comportamento.

As *D. melanogaster* são insetos holometábolos, ou seja, que sofrem metamorfose completa (BARNES, 1984). As fases de seu desenvolvimento, representadas na figura 01, são: ovo, larva, pupa e adulto (macho e fêmea). A uma temperatura ótima de 25°C a seqüência e duração de cada fase, segundo GRAF (1992), é a seguinte:

Ovo.....	1 dia
Estágio larval.....	4 dias
Pupa.....	4 dias
Adulto.....	50 dias

Pouco depois dos machos saírem da pupa, já são férteis, porém as fêmeas levam de 6 a 12 horas para atingirem esse estágio. Depois desse período elas copulam com diferentes machos e armazenam seus semens em receptáculos ventrais, fecundando os ovos mais tarde (GRAF, 1992). Para a distinção entre o macho e a fêmea, observa-se que a extremidade posterior do abdome da fêmea é afilada e os tergitos aí presentes são bem definidos, com as cores claras e escuras intercaladas. Os machos, além de serem de menor tamanho, apresentam o abdome mais arredondado e de coloração escura (Observar figura 01). Outra característica distintiva é a presença dos pentes tarsais no macho (utilizados na cópula), que se encontram no primeiro par de apêndices locomotores, na região do tarso.

**Fig. 01** Fases do desenvolvimento da *Drosophila melanogaster*. (as figuras não se encontram na mesma escala) (Adaptado de: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/Drosophila.html>. Acessado em: 08 de novembro de 2004)



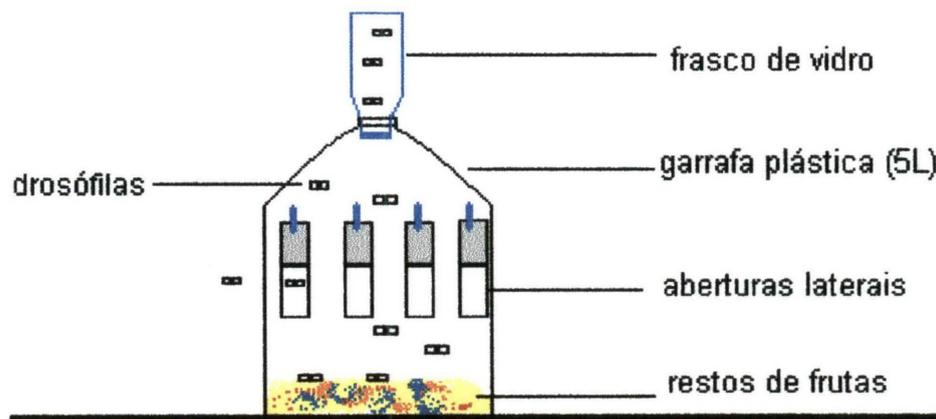
As asas destes insetos são o resultado de um desenvolvimento de origem embrionária. Um conjunto de células, os discos imaginais das asas, sofrem sucessivas mitoses até se diferenciarem, durante a metamorfose, em estruturas que por fim se tornam as asas (ANDRADE; LEHMANN, 2003). A venação da asa de *D. melanogaster* é utilizada como um modelo de desenvolvimento para definir as interações genéticas

que envolvem a proliferação de células, a comunicação célula-célula, a diferenciação celular e a caracterização dos mecanismos moleculares correspondentes (GARCIA-BELLIDO; CELIS, 1992). Esta característica é de considerável importância para se constatar a presença da AF e realizar inferências a respeito.

As linhagens de *D. melanogaster* utilizadas nesta pesquisa foram capturadas no terceiro andar de um edifício situado no bairro Água Verde, região de Curitiba, Paraná. As coletas aconteceram nos dias: 02/04, 05/04, 15/04, 23/04, 27/04, 29/04, 30/04, 18/05, 25/05 e 27/05, sendo que os animais que efetivamente participaram dos resultados da presente pesquisa foram os coletados em: 23/04, 27/04, 18/05, 25/05 e 27/05. Os demais indivíduos foram utilizados para testes quanto à criação em laboratório e elaboração de lâminas. Ocorreram ainda eventuais mortes de algumas linhagens, uma das causas foi a contaminação dos frascos de cultivo por fungos e ácaros.

A armadilha utilizada para as capturas foi elaborada com garrafa plástica para água (5L). Na base interna da garrafa havia iscas de cascas e restos de frutas (banana, manga, mamão e maçã), já a região mediana da mesma foi recortada, em forma de pequenas janelas, de modo que as drosófilas pudessem adentrá-la. (fig. 02)

**Fig. 02** Esquema da armadilha utilizada para a coleta dos animais em seu ambiente natural.



## 2.2 Material de consumo

- Meio de cultivo para *D. melanogaster*, (anexo 01)
- Frascos de cultura;
- Lâminas e lamínulas para microscopia;
- Álcool etílico;
- Éter etílico;
- Permout;
- Esmalte incolor.

## 2.3 Equipamentos

- Câmara de temperatura e umidade constantes (Dep. Genética – UFPR);
- Microscópio estereoscópico (Dep. Genética – UFPR);
- Microscópio equipado com dispositivo para captura de imagens digitalizadas – fotomicroscópio - (Dep. De Biologia Celular – UFPR);
- Computador PC equipado com gravador de CD.

## 2.4 Software

- Para a criação de arquivos no formato tps: TPS UTIL (ROHLF, 2004);
- Para a digitalização das coordenadas: TPS DIGW3,2;
- Para a análise das coordenadas: TPS SMALL;

### 3. Métodos

#### 3.1 Coletas e manutenção das drosófilas

Definiu-se a coleta dos animais em ambiente urbano, mais precisamente em uma residência, devido a facilidade em que podiam ser encontrados. Como se tratava do interior de uma residência, optou-se pela coleta com a armadilha no lugar do uso da rede entomológica, que mostrou-se inviável nesta situação. Além da banana fermentada acrescentaram-se restos e cascas de outras frutas para garantir um grande número de indivíduos para a coleta. A armadilha, já descrita acima, foi colocada próxima à janela. Quando o número de animais no interior da mesma mostrava-se satisfatório, as pequenas janelas laterais eram fechadas. A garrafa plástica era então movimentada levemente como forma de estimular o vôo das drosófilas, que logo se dirigiam para a parte superior, onde estava acoplado um frasco de vidro. Tal frasco logo se tornava repleto de drosófilas, visto que elas tendem a voar para o alto e em direção à luz. Os animais assim capturados foram transportados para o laboratório no mesmo dia.

Primeiramente estudaram-se as técnicas de criação dos animais em laboratório: preparo do meio de cultivo, manutenção em frascos de vidro, repique (transferência dos animais para frascos com meio de cultivo novo), esterização dos animais para a observação em lupa, identificação da espécie, identificação de machos e de fêmeas. Após o período de aprendizagem, iniciou-se a criação e manutenção das linhagens a serem trabalhadas. Foram montadas 34 linhagens, sendo que destas apenas 13 puderam ser efetivamente utilizadas na pesquisa, as demais (21 linhagens) foram descartadas em diferentes fases e por diferentes motivos.

No laboratório os animais eram então observados para a confirmação da espécie e para o isolamento das fêmeas. Sedados com o éter, puderam ser observados por meio do microscópio estereoscópico e utensílios como pinças, pincéis e estiletos. Para a identificação da espécie, utilizou-se a *Chave para a determinação das espécies brasileiras de Drosophila* (CULTUS, 1949) (anexo 02). Primeiramente as fêmeas foram isoladas cada uma em um frasco cilíndrico contendo o meio de cultivo. Como a chave de identificação utilizada distingue *D. melanogaster* de *D. simulans* apenas pelo arco genital do macho, as fêmeas separadas poderiam pertencer a

qualquer uma das duas espécies. Para confirmar-se que o animal em questão era realmente uma *D. melanogaster*, após o nascimento dos primeiros descendentes de cada fêmea, fez-se nova identificação através dos machos. Os frascos com os animais eram então identificados com anotações do lado de fora contendo a data, a linhagem e a geração a que pertenciam. Dessa forma, cada frasco contendo uma fêmea deu origem a uma linhagem, e estes animais foram então considerados como pertencentes à geração zero (G0). Os frascos com os animais eram mantidos em câmara de temperatura e umidade constantes (estufa climatizada), a uma temperatura média de 25°C e umidade relativa de aproximadamente 65%.

### 3.2 Montagem das linhagens

Cada linhagem teve início a partir de uma única fêmea, já fecundada no meio natural, isolada em um meio de cultivo. Os primeiros descendentes destas fêmeas formaram a G0. Foram então preparadas lâminas com as asas dos machos e das fêmeas dessa geração. Isolaram-se 3 casais adultos para darem origem à primeira geração de descendentes dos animais criados em laboratório, a G1. O uso destes 3 casais foi para garantir uma quantidade suficiente de animais para a montagem das lâminas. Essas 3 fêmeas, por terem sido isoladas adultas, já haviam sido fecundadas pelos seus meio-irmãos no frasco de origem e, de uma forma mais intensa, pelos 3 meio-irmãos que foram isolados junto com elas. Com este procedimento, o nível de endocruzamento ainda seria baixo, ou muito próximo do nível da geração inicial ou G0. Assim sendo, optou-se pelo isolamento de apenas uma fêmea adulta e, como forma de garantir a sobrevivências das linhagens, foram feitas repetições em 2 e mais tarde 3 frascos. As repetições consistiam em isolar-se uma fêmea em cada frasco e, quando o número esperado de indivíduos era atingido, optava-se por um dos frascos e os demais eram descartados. A partir da segunda geração (G2) padronizou-se então o uso de apenas uma fêmea adulta, e das repetições, sendo que na segunda e terceira gerações (G2 e G3) utilizou-se 2 repetições e na quarta e quinta (G4 e G5), o número foi de 3 repetições. Observe esquema na tabela 1, em seguida, para melhor compreensão da origem de cada geração.

Tab. 1 Esquema mostrando como foi a origem de cada geração.

Linha gens	Gerações					
	G0	G1	G2	G3	G4	G5
08	1 ♀ coletada na natureza	—	—	—	—	—
09	1 ♀ coletada na natureza	—	—	—	—	—
13	1 ♀ coletada na natureza	—	—	—	—	—
16	1 ♀ coletada na natureza	—	—	—	—	—
24	1 ♀ coletada na natureza	—	—	—	—	—
25	1 ♀ coletada na natureza	3 casais adultos no mesmo frasco	1 ♀ em cada frasco (2 frascos)	1 ♀ em cada frasco (2 frascos)	1 ♀ em cada frasco (3 frascos)	1 ♀ em cada frasco (3 frascos)
26	1 ♀ coletada na natureza	—	—	—	—	—
28	1 ♀ coletada na natureza	—	—	—	—	—
29	1 ♀ coletada na natureza	3 casais adultos no mesmo frasco	1 ♀ em cada frasco (2 frascos)	1 ♀ em cada frasco (2 frascos)	1 ♀ em cada frasco (3 frascos)	1 ♀ em cada frasco (3 frascos)
30	1 ♀ coletada na natureza	3 casais adultos no mesmo frasco	1 ♀ em cada frasco (2 frascos)	1 ♀ em cada frasco (2 frascos)	1 ♀ em cada frasco (3 frascos)	1 ♀ em cada frasco (3 frascos)
31	1 ♀ coletada na natureza	—	—	—	—	—
32	1 ♀ coletada na natureza	—	—	—	—	—
33	1 ♀ coletada na natureza	—	—	—	—	—

Durante todo o período da pesquisa foram montadas 34 linhagens. Destas, apenas 13 foram oficialmente utilizadas na pesquisa. As demais linhagens foram descartadas por diferentes motivos, sendo 2 por contaminação do meio, 6 por não terem nascidos descendentes da fêmea-mãe original, 7 por terem sido identificadas como *D. simulans* e finalmente 6 por não apresentarem número suficiente de machos e/ou de fêmeas para que as lâminas pudessem ser montadas.

### 3.3 Montagem das lâminas

Estipulou-se um número de 15 machos e 15 fêmeas de cada linhagem, para a montagem das lâminas. Este número apresentou variações para menos devido a diferentes motivos, entre eles a perda de material durante o processo de elaboração das lâminas, o não aproveitamento de imagens pelo fato de algumas asas estarem em posições inadequadas para a observação, ou até mesmo o número insuficiente de animais no frasco das linhagens, em cada geração.

Para a dissecação das asas, primeiramente anestesiou-se os animais com éter e fez-se a seleção dos machos e das fêmeas com o microscópio estereoscópico. Os animais foram colocados novamente em contato com o éter e, depois de mortos, suas asas foram dissecadas com o auxílio de uma pinça de ponta fina, e um estilete. As asas foram acomodadas nas lâminas aos pares, sendo que a asa esquerda ficava no lado esquerdo da lâmina e ao seu lado a asa direita. (fig. 03)

**Fig. 03** Foto ilustrando a disposição das asas na lâmina.



Diferentes técnicas foram testadas para a montagem das lâminas com as asas dos animais, resultando num total de 14 lâminas teste e 53 lâminas oficiais. Inicialmente elas foram elaboradas colocando-se o par de asas umedecido em água, sobre a lâmina e então as asas foram cobertas com a lamínula e seladas com esmalte incolor. O mesmo procedimento foi realizado apenas substituindo-se a água pelo álcool. Numa terceira tentativa, aguardou-se a evaporação completa do álcool antes de se colocar a lamínula. Seguiram-se então testes utilizando-se o *permount*. O procedimento inicial foi o de se colocar uma gota de álcool na lâmina, sobre a asa, e aguardar a sua evaporação. Em seguida acrescentar uma gota de *permount* e cobrir com a lamínula. Repetiu-se o procedimento anterior, mas excluindo-se o álcool do preparo e ainda pressionando-se levemente a lamínula para uma melhor fixação. Testou-se ainda o uso de fita adesiva comum e dupla face. A fita adesiva simples foi colocada sobre as asas que estavam acomodadas na lâmina. Quanto à fita dupla face, esta era colada na lâmina e em cima dela as asas eram acomodadas. Este último procedimento (com a fita dupla face), teve ainda uma variação, que consistiu na colocação de uma lamínula sobre as asas. A utilização dessas fitas trouxe alguns inconvenientes, dentre eles a alteração das asas por sobreposições e enrugamentos. Ao se observar este material ao microscópio, pode-se notar uma certa poluição da imagem, causada pela goma adesiva da fita, que dificultou a observação. O último procedimento testado e, por fim adotado, foi o seguinte: após a colocação das asas na lâmina, espalhou-se de uma a duas gotas de *permount* na lamínula e utilizou-se esta lamínula para cobrir as asas. Por fim apertou-se levemente a lamínula para uma melhor fixação e vedação. Esta técnica foi a que apresentou os melhores resultados. As demais técnicas dificultaram a observação ao microscópio por permitirem a formação de muitas bolhas de ar ao redor e sobre as asas e por deslocarem as mesmas de sua posição original, dentre outros inconvenientes. Após a definição da técnica a ser utilizada, cada lâmina foi montada com três lamínulas, sendo que estas acomodaram um total de oito pares de asas cada, resultando em um número médio de 24 pares por lâmina (fig 3, acima). Seguiu-se para as observações em microscópio.

### 3.4 Obtenção das imagens

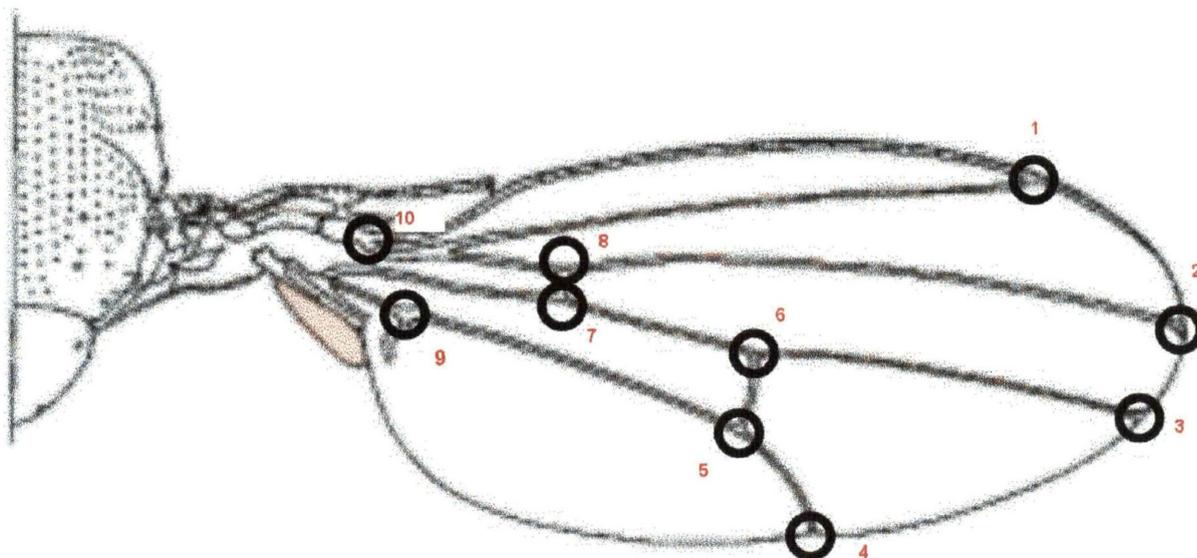
O microscópio utilizado para a digitalização das imagens foi o fotomicroscópio alemão *Axiophot CARL ZEISS*, que se encontra acoplado a um PC. As imagens das asas foram então digitalizadas por meio do programa *Spectral Acquisition – Expo*

*Version: 2.0 ASI 2001* e armazenadas em arquivos do tipo imagem JPEG em CD-RW. Este equipamento pertence ao departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, da UFPR.

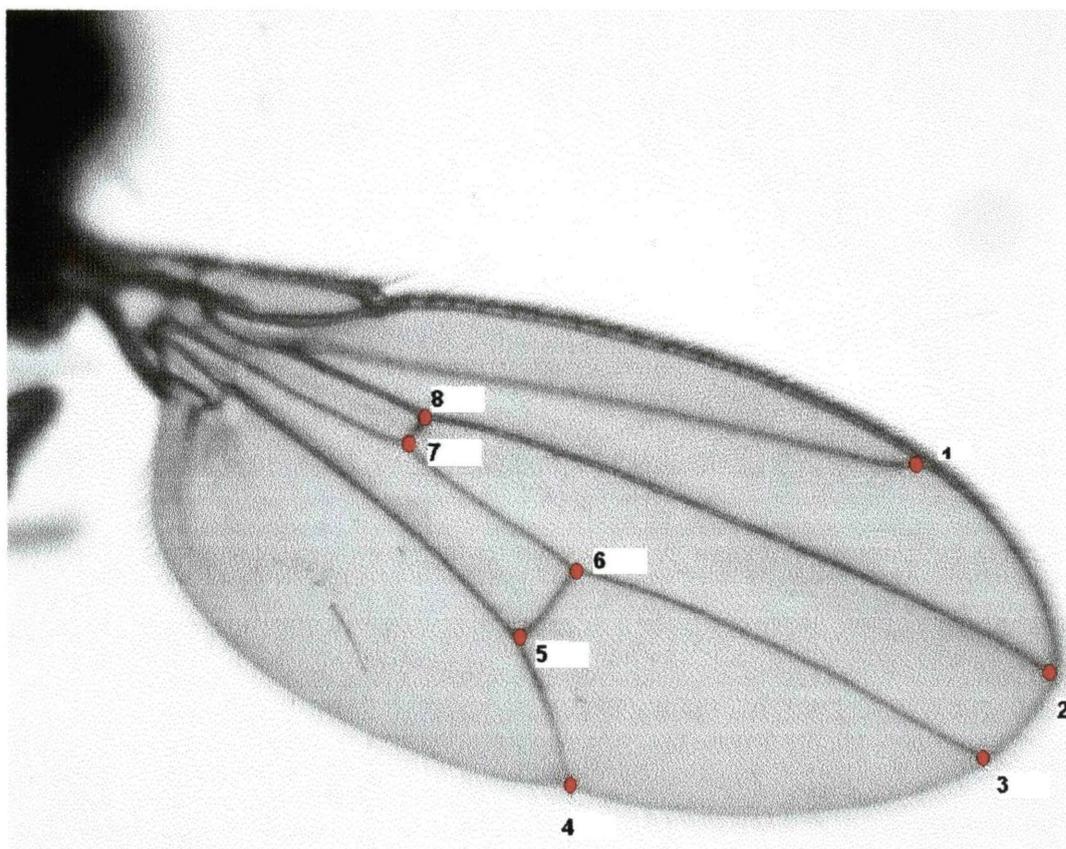
O par de asas de cada animal foi armazenado em duas imagens, sendo uma da asa esquerda e outra da asa direita. Uma asa de cada par teve que ser rotacionada de modo que fosse possível a sobreposição das imagens (direita e esquerda) para as análises posteriores. Esta rotação foi realizada utilizando-se o programa *Paint (Windows XP)*. Para transformar as imagens em formato *TPS*, necessário para o programa de determinação dos marcos anatômicos, utilizou-se o programa *TPS UTIL*. Já no formato adequado, cada par de asas pode ser observado através do programa *TPSDIGW32*, para a determinação dos oito marcos anatômicos. A princípio a determinação seria de 10 marcos (fig. 4a), porém, como a posição de dois deles era muito próxima à área de inserção da asa no corpo do animal, eles foram descartados, restando apenas oito marcos (fig. 4b). A proximidade da área de inserção tornou-se um problema porque nem todas as asas dissecadas apresentavam a região onde se encontravam estes marcos.

Os marcos anatômicos são métodos morfométricos que mapeiam pontos, relacionando-os uns com os outros, e não partes com partes, resultando assim numa grande riqueza de informações. Segundo RODRIGUES e SANTOS (2004) eles são "os pontos nos quais as estruturas biológicas são amostradas" e, dessa forma, identificam as variações das mesmas estruturas morfológicas nos diferentes exemplares em estudo. Os marcos aqui utilizados foram os do tipo 1, isto é, a justaposição de tecidos, que consistem em pontos de encontro de 3 estruturas (MONTEIRO; REIS, 1999) como, neste caso, a venação das asas da *D. melanogaster*.

**Fig. 04a** Os dez marcos anatômicos anteriormente determinados para a obtenção dos dados (1-10).



**Fig. 04b** Os oito marcos anatômicos utilizados para a obtenção dos dados (1-8).



### 3.5 Obtenção dos dados

Uma das curiosidades dos cientistas refere-se às variações de forma e de tamanho dos organismos. A morfometria surgiu como um estudo para tentar solucionar as questões a esse respeito. Atualmente vem ganhando espaço, descrevendo e representando a geometria e a forma das estruturas de maneira mais precisa. Todas as comparações morfológicas desta pesquisa basearam-se na morfometria geométrica.

A morfometria permite relacionar as características geométricas das formas biológicas com análises estatísticas da variação (MONTEIRO; REIS, 1999). Possibilita, dessa maneira, o estudo das causas das diferenças de forma encontradas nos organismos. As primeiras pesquisas na área surgiram no século XVI, com Dürer e desde então vem se desenvolvendo. Atualmente existem diversos softwares para análises morfométricas, como os desenvolvidos por F. J. Rohlf.

A base das análises estatísticas de forma é o *Espaço Forma de Kendall*, (RODRIGUES; SANTOS, 2004), ou seja, multidimensional. As distâncias entre pontos representados nele são denominadas de *Distância de Procrustes* e medem a diferença entre as formas (MORAES, 2003) e também quanto ao tamanho (MONTEIRO; REIS; 1999). Na presente pesquisa utilizou-se o programa TPSSMALL, que efetua Análises de Procrustes, pela sobreposição e análise de distâncias, e determina os tamanhos de centróides.

Na análise de Procrustes, sobreposição generalizada por quadrados mínimos (MORAES, 2003), determina-se um ponto de tangência que é definido como a média de todas as formas observadas, de modo que ela seja equidistante de todas essas formas e com o mínimo possível de variações (RODRIGUES; SANTOS, 2004). A essa média são excluídas as diferenças de transladação, proporcionalização, e rotação, resultando na Configuração de Consenso. A transladação para um local comum consiste na sobreposição do centróide, das formas observadas, na origem dos sistemas de eixos do plano cartesiano (MONTEIRO; REIS, 1999). Para se padronizar o tamanho das formas (proporcionalização), utiliza-se uma medida geral multivariada, ou seja, o tamanho de centróide. Segundo MORAES (2003), "(...) o Tamanho de Centróide corresponde à raiz quadrada dos somatórios dos quadrados das distâncias entre cada ponto de referência e o centro de massa, ou centróide." A rotação orienta as formas de

maneira que os marcos correspondentes em cada figura tenham as distâncias entre si minimizadas (RODRIGUES; SANTOS, 2004).

Cada asa de cada animal, com os marcos definidos, tem suas coordenadas X e Y obtidas. O programa *TPSDIG* armazena esses dados, que são utilizados pelo *TPSSMALL* para realizar o cálculo das distâncias de procrustes e do tamanho de centróides. A distância de procrustes foi dada pelo programa em um único valor, já o tamanho de centróides foi apresentado em dois valores, um da asa direita e um da asa esquerda. Os valores dos tamanhos de centróides foram subtraídos em módulo, entre si, para que se obtivesse apenas um único valor. Este valor resultante caracterizou a chamada Assimetria Flutuante de tamanho (AF tamanho) e, a Assimetria Flutuante de forma (AF forma) foi determinada pelo valor da distância de procrustes. Cada um destes valores de assimetria foi transferido para o programa *Excel (Windows)* onde foram elaboradas quatro planilhas, cada uma correspondente a uma geração (G0, G1, G2, G5).

### 3.6 Análises dos dados

Os dados obtidos de cada animal, já organizados nas planilhas do Excel, foram então trabalhados estatisticamente. Inicialmente calculou-se a média aritmética geral de cada geração. De posse destes dados, seguiu-se para a elaboração dos gráficos, de modo que os valores pudessem ser melhor visualizados, permitindo a comparação com as demais linhagens e gerações (gráficos 01 e 02). Calculou-se então a média dos valores de assimetria dos machos e das fêmeas e posteriormente elaborou-se os gráficos com esses dados (gráficos 03 ao 08).

A análise de variância (ANOVA) utilizada neste trabalho foi a análise para experimentos fatoriais (tabela 2). Segundo VIERA e HOFFMANN (1989), este tipo de análise é muito útil para o estudo da interação entre os tratamentos, ou seja, fatores.

Os valores brutos de AF de forma e tamanho (anexos 3, 4, 5 e 6), resultantes das análises do programa *TPSSMALL*, foram transformados somando-se 0,5 ao valor bruto e extraindo-se a raiz quadrada do valor resultante ( $\sqrt{x+0,5}$ ). Esta transformação permitiu que a aplicação dos testes de significância fosse válida (anexos 7, 8, 9 e 10).

Foram realizadas ANOVAs para as 13 linhagens da geração 0 (G0), tanto para os valores de AF de forma quanto de AF de tamanho (anexo 11 e 12). As demais análises compararam os dois sexos (M, F) com as 3 linhagens (25, 29, 30) e as 4 gerações (G0, G1, G2, G5). Para isso foram feitas duas análises, sendo uma referente à forma e outra ao tamanho (anexo 13 e 14).

Outra análise realizada foi a correlação entre os valores de AF forma e a média dos tamanhos dos centróides, assim como entre os valores de AF forma e a média dos tamanhos dos centróides (anexos 15 e 16).

**TAB 2. Quadro da ANOVA**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F calculado</b>
<b>Tratamento</b>	t-1	SQ trat	SQtrat / t-1	QMtrat /QM r
<b>Linhagem</b>	l-1	SQ l	SQ l / l-1	QM l /QM r
<b>Sexo</b>	s-1	SQ s	SQ s / s-1	QMs /QM r
<b>Geração</b>	g-1	SQ g	SQ g / g-1	QMg /QM r
<b>Linhagem X Sexo</b>	(l-1)(s-1)	SQ l x s	SQ l x s / (l-1)(s-1)	QM (l x s) /QM r
<b>Linhagem X Geração</b>	(l-1)(g-1)	SQ l x g	SQ l x g / (l-1)(g-1)	QM (l x g) /QM r
<b>Geração X Sexo</b>	(g-1)(s-1)	SQ g x s	SQ g x s / (g-1)(s-1)	QM (g x s) /QM r
<b>Linhagem X Sexo X Geração</b>	(l-1)(s-1)(g-1)	SQ l x s x g	SQ l x s x g / (l-1)(s-1)(g-1)	QM (l x g x s) /QM r
<b>Resíduo (erro)</b>	(n-1)-(t-1)	SQ r	SQ r / (n-1)-(t-1)	
<b>Total</b>	<b>n-1</b>	<b>SQ t</b>		

Onde:

FV = fatores de variância

GL = grau de liberdade

SQ = soma dos quadrados:

$$\text{Total} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$\text{Tratamento} = \frac{\sum x^2}{t} - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$\text{Linhagem} = \frac{\sum l^2}{l} - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$\text{Sexo} = \frac{\sum s^2}{s} - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$\text{Geração} = \frac{\sum l^2}{g} - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$\text{Linhagem X Sexo} = \frac{\sum s \times l^2}{(s \times l)} - \frac{(\sum x)^2}{n} - \text{SQ l} - \text{SQ s}$$

$$\text{Linhagem X Geração} = \frac{\sum l \times g^2}{(l \times g)} - \frac{(\sum x)^2}{n} - \text{SQ l} - \text{SQ g}$$

$$\text{Geração X Sexo} = \frac{\sum g \times s^2}{(g \times s)} - \frac{(\sum x)^2}{n} - \text{SQ g} - \text{SQ s}$$

$$\text{Linhagem X Sexo X Geração} = \text{SQ tratamento} - (\text{SQ l} + \text{SQ g} + \text{SQ s} + \text{SQ l} \times \text{s} + \text{SQ l} \times \text{g} + \text{SQ g} \times \text{s})$$

$$\text{Resíduo} = \text{SQ total} - \text{SQ tratamento}$$

QM = quadrado médio

F = grau de significância

#### 4. Resultados

Analisando-se o gráfico 01, que mostra os valores referentes às médias de AF de tamanho em cada linhagem, ao longo do tempo, nota-se a inexistência de um padrão nesses valores. Observando-se cada linhagem, nota-se o seguinte:

- **L25:** na primeira geração, o valor de assimetria de tamanho é de 2,53; na G1 esta assimetria cai para 2,14, sugerindo uma população um pouco mais simétrica com relação a anterior, quanto ao tamanho de suas asas; na geração seguinte o valor volta a subir (2,29), aumentando assim a assimetria; na última geração (G5), ela aumenta um pouco mais até atingir 2,50, porém mantém-se abaixo do valor inicial 2,53. Desta maneira pode-se dizer que esta linhagem apresentou uma flutuação nos valores de assimetria de tamanho ao longo das gerações e que, ao final do período de 5 gerações apresentou uma queda de assimetria de 0,03, ou seja, uma tendência a tornar-se mais simétrica.
- **L29:** em G0, o valor da assimetria de tamanho é de 2,42, caindo para 2,33 na G1 e para 2,09 na G2. Há uma tendência à diminuição da assimetria de tamanho da G0 à G2. Da G2 para a G5 observa-se um pequeno aumento para 2,19, ou seja, maior assimetria. O valor final foi mais baixo que o das duas primeiras gerações (G0 e G1), apesar de ter aumentado um pouco em relação à G2, sugerindo também, de maneira geral, um decréscimo na assimetria.
- **L30:** 2,20 é o valor inicial da assimetria desta linhagem, seguindo para 2,48, ou seja, ao contrário das demais apresentou um aumento na assimetria já na G1 e manteve esta tendência, sendo 2,56 na G2 e atingindo 2,69 na G5.

No que diz respeito à assimetria de forma, analisando-se o gráfico 2, nota-se igualmente uma inexistência de padrão nos resultados, que foram os seguintes:

- **L25:** nesta linhagem, de forma geral, a variação dos dados ao longo das gerações foi bem pequena, sendo de 0,001, quando compara-se o valor

inicial (G0) com o valor final (G5). Este sutil aumento da G0 para a G5 sugere uma certa estabilidade no que diz respeito à forma das asas nessa linhagem. Na G0 o valor é de 0,018, subindo para 0,019 na G1, desta para a G2, a variação foi também de 0,001, porém o valor diminuiu novamente para 0,018 e atingiu 0,019 na última geração.

- **L29:** esta foi a linhagem que apresentou maior variação nos dados, visto que o valor de assimetria de forma da primeira geração (G0) estava bem acima dos demais, e o valor correspondente à última geração foi o valor de assimetria mais baixo de todos. Aqui pode ser observada uma forte tendência à simetria, devido ao alto valor de assimetria da G0, que foi de 0,027. Na G1 o valor de assimetria de forma caiu bruscamente 0,010 pontos, chegando a 0,017, a maior variação observada neste gráfico. Na geração seguinte, G2, o valor subiu para 0,018, e caiu novamente na G5, chegando a 0,015.
- **L30:** esta linhagem apresentou variações constantes de 0,002 ao longo das gerações. Iniciando com 0,017 na G0, caindo para 0,015 na G1, retornando para 0,017 na G2 e voltando novamente para 0,015 na última geração (G5). Mostrou uma leve tendência a tornar-se mais simétrica.

Os gráficos de 3 a 5 trazem os valores de AF de tamanho de cada geração, considerando-se os dados de machos e de fêmeas separadamente. Seguem os resultados:

- **L25:** nesta linhagem, observando-se os machos separadamente, vê-se um aumento na assimetria de tamanho ao longo das gerações (G0 = 4,55; G1 = 5,15; G2 = 5,28; G5 = 6,24). Quanto às fêmeas, este padrão não pode ser observado. Ocorre uma variação nos dados ao longo do tempo, resultando em uma queda da assimetria de tamanho (G0 = 8,76; G1 = 4,83; G2 = 6,75; G5 = 6,18). Comparando-se aqui os valores dos machos com os valores das fêmeas, ao longo das gerações, percebe-se que não há uma tendência entre eles, pois ora os machos mostram-se mais assimétricos, ora as fêmeas.

- **L29:** nesta linhagem a variação dos dados é maior. As fêmeas seguem de 5,63 na G0 para 4,42 na G1, aumentam a assimetria para 7,00 na G2 e finalmente caem para 4,61 na G5. Comparando-se G5 com G0, a queda da assimetria não foi muito grande, porém a variação ao longo das gerações foi maior. Os machos desta geração também apresentaram grandes variações, sendo a maior, da mesma forma que as fêmeas, a da G2. Os valores dos machos foram: G0 = 6,09; G1 = 6,46; G2 = 2,12; G5 = 5,09. Os machos em geral apresentaram maiores índices de assimetria de tamanho que as fêmeas dessa linhagem.
- **L30:** Os maiores valores de assimetria de tamanho puderam ser observados nas fêmeas da linhagem 30. Aqui nota-se claramente um aumento da assimetria de tamanho, ao longo das gerações, nos machos. Quanto às fêmeas também ocorreu um aumento de assimetria, porém da G1 para a G2, aconteceu um pequeno decréscimo de 0,45. Observa-se ainda que as fêmeas são mais assimétricos que os machos. Os resultados obtidos nessa linhagem foram os seguintes: para as fêmeas: G0 = 4,99; G1 = 7,76; G2 = 7,31; G5 = 8,19; para os machos G0 = 4,88; G1 = 5,30; G2 = 6,14; G5 = 7,4.

Analisando-se os gráficos de 6 a 8, pode-se observar os valores de AF de forma dos machos e das fêmeas, separadamente, para cada geração. Seguem os resultados:

- **L25:** quanto a AF de forma, os valores observados nesta linhagem apresentam uma pequena variação, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Nota-se aqui uma pequena tendência a assimetria nas fêmeas e, ao contrário, uma pequena queda na assimetria dos machos. Os valores são, para as fêmeas: G0 = 0,016; G1 = 0,021; G2 = 0,020; e manteve-se em 0,020 na G5; para os machos G0 = 0,021; G1 = 0,017; G2 = 0,016 e finalmente G5 = 0,018.
- **L29:** aqui pode-se notar claramente uma diminuição da assimetria nos machos, que apresentam em G0 um alto valor (0,031) e chegam a 0,014

na G5. Os valores de G1 e G2 foram, respectivamente 0,017 e 0,016. As fêmeas mostram uma variação menor que a dos machos. Os valores foram:  $G_0 = 0,022$ ;  $G_1 = 0,016$ ;  $G_2 = 0,020$ ;  $G_5 = 0,016$ . Numa análise geral, as fêmeas também se mostraram menos assimétricas ao longo das gerações.

- **L30:** nas fêmeas desta linhagem, de forma geral, tem-se uma tendência ao aumento da assimetria, o que pode ser visto comparando-se  $G_0$  com  $G_5$ , apesar do pequeno decréscimo de  $G_2$  para  $G_5$ . Os valores das fêmeas foram:  $G_0 = 0,013$ ;  $G_1 = 0,015$ ;  $G_2 = 0,017$ ;  $G_5 = 0,015$ . Os machos, ao contrário das fêmeas, tiveram um decréscimo de assimetria de forma, de 0,021 na  $G_0$ , para 0,014 na  $G_5$ . Os valores da  $G_1$  e  $G_2$  foram, respectivamente 0,015 e 0,018.

A correlação realizada entre a média do tamanho de centróide e a assimetria de forma (anexo 16) mostrou que não existe correlação entre estes dois quesitos. Da mesma forma, a correlação entre o tamanho de centróide e a assimetria de tamanho (anexo 16) não o é. Este cálculo permitiu a comprovação de que as análises de morfometria geométrica realizadas nesta pesquisa pelos programas do pacote TPS, consideram tamanho e forma como variáveis independentes. Estes resultados encontram-se de acordo com o que diz MONTEIRO e REIS (1999): "A utilização do tamanho de centróide (...) em detrimento de outras variáveis, (...), é justificada pelo fato de o tamanho do centróide ser a única variável de tamanho que não se correlaciona com a forma (...)"

Após a transformação adequada dos dados, conforme descrito no item 3.6 *Análise dos dados*, realizou-se a ANOVA para experimentos fatoriais. A ANOVA realizada com os valores das 3 linhagens (L25, L29, L30) ao longo das 4 gerações ( $G_0$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_5$ ) testou as seguintes hipóteses:  $H_0$  = existe diferença significativa entre as linhagens, entre os sexos, entre as gerações, ou entre as interações destas 3 variáveis (linhagem X sexo, linhagem X geração, geração X sexo, linhagem X geração X sexo) ( $F$  calculado  $>$   $F$  tabelado) e  $H_1$  = não existe diferença significativa entre as linhagens, entre os sexos, entre as gerações, ou entre as interações destas 3 variáveis (linhagem X sexo, linhagem X geração, geração X sexo, linhagem X geração X sexo) ( $F$  calculado

< F tabelado). Como resultado, a hipótese verdadeira foi H1, e a nula H0, pois não foi encontrada significância para nenhuma das análises (anexos 13 e 14). Desta forma, os 2 sexos, as 3 linhagens e as 4 gerações não apresentam diferença entre si, nem entre as suas interações, quanto a AF de tamanho nem quanto a de forma.

Realizou-se as ANOVAs para as 13 linhagens da G0. Os dados referentes a estas linhagens refletem a situação da população na natureza, visto que estes animais são os descendentes de fêmeas coletadas já fecundadas em seu ambiente natural. Foram testadas as seguintes hipóteses: H0 = existe diferença significativa entre as linhagens da G0 (F calculado > F tabelado) e H1 = não existe diferença significativa entre as linhagens da G0 (F calculado < F tabelado). Como resultado, a hipótese verdadeira foi H1, e a nula H0, pois não foi encontrada significância para nenhuma das análises (anexos 11 e 12). Desta forma, as 13 linhagens constituintes não apresentam diferença entre si quanto a AF de tamanho nem quanto a de forma.

Foi estimado o valor de F (Coeficiente de Endogamia) para uma estimativa do grau de endogamia ao longo das gerações, provocado pela deriva. Supondo um F inicial igual a zero, após 5 gerações a estimativa estaria no mínimo entre 40% e 50%. O cálculo foi realizado com base na seguinte fórmula  $F_t = 1/2N + (1 - 1/2N) F_{t-1}$  (FUTUYMA, 1996). O resultado não pode ser preciso, pois não se sabe exatamente com quantos machos cada fêmea cruzou, porém nos dá a idéia de que o grau de endogamia, após as 5 gerações, é alto.

## 5. Discussão

Os gráficos elaborados com os valores brutos das assimetrias, resultantes das análises do programa TPSSMALL, em linhas gerais, não apresentaram o padrão esperado de um aumento na assimetria flutuante, tanto de tamanho quanto de forma, ao longo das gerações. Esperava-se também alguma tendência distinta entre os sexos, que pudesse retratar a preferência das fêmeas por machos mais simétricos no momento do acasalamento, porém isso não aconteceu. Os resultados das análises de variância mostraram que os dados não apresentam diferença significativa entre si, nem interagem uns com os outros. Diversas podem ter sido as causas deste resultado.

Os animais utilizados nesta pesquisa foram coletados na natureza, e não são linhagens cultivadas em laboratório por longos períodos, como os observados nas pesquisas científicas em que se constata a assimetria, o que pode ter sido uma das causas deste resultado distinto.

Outro fator, levando-se em conta, ainda, o fato de que os animais são provenientes da natureza, é que foram transferidos para um ambiente mais controlado e homogêneo (temperatura e umidade dentro de padrões constantes, alimento padrão e em quantidade suficiente) no laboratório. Tal fato pode ter acentuado o efeito da seleção, o que poderia ter diminuído a variação genética que pudesse existir na população natural.

Os animais foram todos coletados num mesmo ambiente, dentro de um período de aproximadamente 5 semanas o que pode ter resultado no fato de que o  $F$  inicial não era zero, ou seja, deveria existir cruzamentos entre meio-irmão neste ambiente natural. Isto seria possível, pois o alimento estaria num único local, onde também os ovos seriam colocados, o que concentraria os animais naquela região, facilitando este cruzamento, resultando numa população natural de  $F$  elevado, mais endogâmica que o naturalmente esperado.

Talvez os níveis de assimetria na população natural sejam baixos, a ponto de ser um fator sem influência genética considerável.

Um último comentário pode ainda ser feito a respeito da análise dos dados. Notou-se que o CV (coeficiente de variação) dos dados referentes à AF forma era bem menor do que o CV referente à AF de tamanho. Como estes dois dados eram provenientes dos mesmos marcos anatômicos, pode-se sugerir que o programa utilizado (TPS) seja mais eficiente no que diz respeito aos dados de AF de forma do que para os de tamanho.

## 6. Conclusão

A pesquisa científica exige tempo e dedicação, muitas vezes maiores do que se espera. Os resultados nem sempre são conclusivos e geralmente sugerem que novos procedimentos sejam testados. Aqui ficam as seguintes sugestões para pesquisas com assimetria, semelhantes a esta:

- utilizar-se de um casal ainda em pupa para dar origem às gerações seguintes é uma forma de intensificar a endogamia;
- um maior número de repetições em cada geração garante a sobrevivência das linhagens;
- coletar animais de regiões geográficas bem distintas deve ser uma maneira mais eficiente para se testar a assimetria;
- utilizar-se de diferentes programas de análises de dados, talvez distintos programas para as diferentes assimetrias, pode garantir a qualidade dos dados;
- utilizar-se de métodos que permitam o cálculo mais preciso do valor de  $F$  para constatar o efeito da deriva;
- comparar populações naturais com populações de laboratório pode trazer resultados interessantes;
- testar diferentes órgãos do animal, com simetria bilateral, pode resultar na descoberta da melhor região a ser utilizada para estas pesquisas.

Novas técnicas são diariamente testadas pelos cientistas e muitas delas logo passam a ser adotadas por outros. Neste ramo é importante manter-se atualizado e ser persistente.

## 7. Referências Bibliográficas

- ADAMS, M. D. ; et al. **The genome sequence of *Drosophila melanogaster***. Science, Mar 24; 287 (5461): 2185-95, 2000. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?holding=npg&cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=10731132&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?holding=npg&cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10731132&dopt=Abstract)> Acessado em 08 de novembro de 2004).
- ANDRADE, H. H. R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas- RS: Editora da ULBRA, 2003 p. 281-307.
- BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 5 ed. São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1984.
- BDGP Resources, Release 3 Genomic Sequence Downloads, **Chromosome Arm Genomic Sequences**. Disponível em: <<http://www.fruitfly.org/sequence/release3genomic.shtml>> Acessado em: 14 de março de 2004.
- CLARKE, G. M. Fluctuating asymmetry: a technique for measuring developmental stress of genetic and environmental origin. **Acta Zool. Fennica**, v. 191, p. 31-35, junho 1992.
- FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. **Introdução ao estudo da drosófila**. Departamento de Biologia Geral da Faculdade de Ciências e Letras da Universidade de São Paulo. **CULTUS**, v. 01, n. 5, 1949.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2 ed. São Paulo: SBG / CNPq, 1996.

- GARCIA-BELLIDO, A.; CELIS, J. F. de. **Developmental genetics of the venation pattern of *Drosophila***. Annu. Rev. Genet., v. 26, p. 277-304, 1992.
- GRIFFITHS, A. J.F.; et al. **Introdução à genética**. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA, 2002.
- GRAF, U.; SCHAIK, N. van; MURSLER, F. E..**Drosophila genetics: a practical course**. 1992.
- MOLLER, A. P.; SWADLE, J. P. **Asymetry, developmental stability and evolution**. Oxford: Oxford Universit Press,1997.
- MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. dos. **Princípios de Morfometria Geométrica**. Ribeirão Preto-SP: Editora Holos, 1999.
- MORAES, D. A. de; **A morfometria geométrica e a "revolução na morfometria": localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos**. Boletim – ano III, número 3, 2003. Disponível em: <http://www.bioletim.hpg.ig.com.br/III-3/Artigos/moraes.htm> Acessado em: 08 de novembro de 04.
- OLIVEIRA, N. de. **Iniciação à pesquisa genética em drosófila**. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola, Ministério da Agricultura, 1967.
- RIEGLER, R; MICHAELIS, A.; GREEN, M.M. **Diccionario de Genetica y Citogenetica Clásica y Molecular**. Madrid: Editorial Alhambra, 1982.
- RODRIGUES, L. A.; SANTOS V. F. **Morfometria geométrica – aplicações em paleobiologia de Dinossáurios**. Ciências da Terra (UNL), Lisboa, nº esp. V, CD-ROM, pp. A141-A145 Disponível em: <[http://www.mnhn.ul.pt/dinos/public\\_html/Luis\\_A\\_Rodrigues/MORFO%20VI%20CONG%20NAC%20GEOLOGIA.pdf](http://www.mnhn.ul.pt/dinos/public_html/Luis_A_Rodrigues/MORFO%20VI%20CONG%20NAC%20GEOLOGIA.pdf)> Acessado em: 08 de novembro de 2004.
- ROHLF, F. J. **TPSDIGW3,2 (Digitize landmarks & outlines from image files, scanner, or video) for Windows (95 through XP) Version 3,2**. Disponível em:

<<http://life.bio.sunysb.edu/morph/morphomet/tpsdigw32.exe>> Acessado em: 11 de março de 2004.

SANTOS, M. Fluctuating asymmetry is nongenetically related to mating success in *Drosophila buzzatii*. **Evolution**, V. 55, n. 11, p. 2248-2256, agosto 2001.

SOCIETY FOR DEVELOPMENTAL BIOLOGY, The interactive fly, Anatomy of the adult fly, wing. Disponível em: <<http://sdb.bio.purdue.edu/fly/aimain/1adult.htm>> Acessado em: 14 de março de 2004.

SWADDLE, J. P.; WITTER, M. S.; CUTHILL, I.C. The analysis of fluctuating asymmetry. **Animal Behaviour**, v. 48, p. 986-989, maio 1994.

Van VALEN, L. V.A study of fluctuating asymmetry. **Evolution**, v. 16, n.2, p. 125-142, março 1962.

VIERA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas, 1989.

## Anexos

### 1. Meio de cultivo para *Drosophila melanogaster* (utilizado pelo Departamento de Genética, UFPR).

- *Ingredientes*

Glucose .....	50 ml
Água .....	2000
ml	
Farinha de trigo .....	200 g
Amido de milho .....	20 g
Fubá .....	140 g
Ágar .....	40 g
Fermento biológico.....	20 g
Nipagin .....	20 ml
Ácido Propiônico .....	04 ml

### 2. Chave para identificação das espécies brasileiras de *Drosophila*. (CULTUS, 1949, pág. 57) (Representados apenas os itens para a identificação da *D. melanogaster* – *sublinhado*- )

1. Mesonotum com todas ou quase todas as suas cerdas emergindo de manchas escuras circulares; algumas vezes essas manchas se fundem formando manchas maiores ou faixas .....	42
<u>-- . Não inteiramente como acima .....</u>	<u>2</u>
<u>2. Cerdas escutelares anteriores convergentes .....</u>	<u>3</u>
--. Cerdas escutelares anteriores divergentes .....	22
3. Cerdas prescutelares presentes .....	4
<u>--. Sem cerdas prescutelares .....</u>	<u>5</u>

5. Mesonotum com faixas escuras longitudinais, sendo a mediana bifurcada posteriormente; faixas escuras dos tergitos abdominais interrompidas mediana e lateralmente; cerdas preapicais da primeira e segunda tíbia não muito evidentes.  
 .....*busckii*  
 Coquillet.  
--. Não inteiramente como acima ..... 6
6. Espécies escuras ..... 7  
--. Espécies amareladas ..... 10
10. Uma fileira de cerdas cuneiformes na parte interna do primeiro fêmur; faixas dos tergitos abdominais interrompidas no meio; mesonotum algumas vezes com faixas longitudinais indistintas ..... *immigrans*  
 Sturtevant.  
--. Sem cerdas cuneiformes no fêmur ..... 11
11. Pelos acrosticais em oito ou mais filas ..... 12  
 --. Pelos acrosticais em seis filas ..... 18
12. Índice costal 3,3 – 3,7; asas foscas; espécie grande; duas faixas longitudinais indistintas entre as cerdas dorsais centrais ..... *camargoii* Dobzhansky e Pavan.  
--. Índice costal inferior a 3,0 ..... 13
13. Mesonotum brilhante; pentes sexuais no primeiro tarso do macho ..... 14  
 --. Mesonotum fosco (para mesonotum estriado, v. 42) ..... 15
14. Arco genital do macho com processo externo pouco saliente.....  
*melanogaster* Meigen.  
 --. Arco genital do macho com processo externo muito saliente.....  
*simulans* Sturtevant.





## 5. Assimetria Flutuante de Forma - GO (dados brutos)

Sexo	Linhagens	Indiv.	8	9	13	16	24	25	26	28	29	30	31	32	33	Totals
M	1		0,02197	0,01645	0,02120	0,02391	0,02464	0,01319	0,01561	0,01823	0,14766	0,02951	0,01028	0,02197	0,02168	
	2		0,02266	0,02459	0,02371	0,02627	0,03999	0,01488	0,01303	0,01449	0,01943	0,02129	0,01646	0,01710	0,02533	
	3		0,02367	0,01258	0,00937	0,01961	0,02568	0,02688	0,01996	0,01325	0,01325	0,00692	0,02017	0,01151	0,02100	0,01584
	4		0,01942	0,02757	0,06202	0,01700	0,02001	0,01910	0,01704	0,01297	0,01297	0,01461	0,01844	0,02210	0,01407	0,01425
	5		0,00828	0,00944	0,01698	0,01934	0,01818	0,04472	0,01615	0,01633	0,02299	0,02299	0,01956	0,01775	0,01499	0,01752
	6		0,01718	0,02041	0,01370	0,00972	0,01605	0,01605	0,02436	0,01134	0,01059	0,02540	0,01434	0,01162	0,01743	0,01472
	7		0,01526	0,15039	0,01620	0,01594	0,01628	0,01628	0,01397	0,01367	0,01000	0,01297	0,01270	0,02405	0,00922	0,01880
	8		0,02217	0,01464	0,01972	0,01340	0,02559	0,01349	0,01349	0,01194	0,01095	0,01412	0,03021	0,01599	0,01537	0,02372
Total dos machos			0,15062	0,27607	0,17290	0,14519	0,18043	0,17058	0,11864	0,10682	0,26411	0,16622	0,12977	0,13116	0,15186	2,16436
F	1		0,01497	0,01260	0,01502	0,01819	0,01718	0,01615	0,01764	0,01401	0,04758	0,01510	0,04952	0,01803	0,01085	
	2		0,01366	0,02623	0,01376	0,01770	0,01378	0,01550	0,01941	0,03092	0,02637	0,01719	0,01721	0,02439	0,01305	
	3		0,01543	0,01723	0,01834	0,01412	0,01801	0,01603	0,01518	0,01518	0,01869	0,02077	0,01353	0,01710	0,01050	0,02458
	4		0,00797	0,01467	0,01046	0,01242	0,01194	0,01485	0,01485	0,01334	0,02356	0,01459	0,00833	0,01982	0,02524	0,01370
	5		0,01472	0,02336	0,00995	0,02546	0,02311	0,02893	0,01774	0,02171	0,02171	0,01931	0,00739	0,02911	0,02026	0,01633
	6		0,01424	0,00836	0,01493	0,01607	0,02619	0,01038	0,05046	0,05046	0,01532	0,01612	0,01406	0,02450	0,01509	0,02274
	7		0,01218	0,01580	0,01466	0,02171	0,01572	0,00967	0,01962	0,01962	0,02167	0,01892	0,01746	0,01624	0,01496	0,01705
	8		0,01923	0,01448	0,01273	0,01856	0,01525	0,01581	0,01581	0,01918	0,01333	0,01476	0,00817	0,02073	0,01368	0,02151
Total das fêmeas			0,11230	0,13272	0,10984	0,14423	0,14118	0,12732	0,17257	0,15921	0,17841	0,10123	0,19422	0,14215	0,13980	1,85519
Total das linhagens			0,26293	0,40879	0,28273	0,28942	0,32161	0,29790	0,29121	0,26603	0,44252	0,26745	0,32399	0,27332	0,29166	4,01955

Linhagens		8	9	13	16	24	25	26	28	29	30	31	32	33	Totals
Sexo	Indiv.														
M	1	7,2444	0,69163	4,23086	3,35197	10,08438	12,39870	5,32381	4,87175	17,25551	2,31758	4,09821	1,67673	2,95022	
	2	2,75991	8,39746	2,45217	4,34317	7,20598	3,59567	1,74993	0,27423	7,59233	1,34886	1,93770	7,68884	9,62572	
	3	4,41071	5,09777	0,52024	6,49136	1,86780	4,46311	3,80247	11,72971	2,74113	7,48507	5,55086	1,33389	1,77872	
	4	4,15476	16,17437	27,81225	12,03362	10,58049	2,05803	14,21759	3,85059	7,33051	4,41142	0,83207	0,27643	14,19709	
	5	3,54979	1,01021	2,29136	7,45720	2,44665	1,52532	10,77699	0,86169	4,52341	0,32838	7,90020	7,58100	2,54882	
	6	2,98093	12,16337	2,43949	0,11358	2,45663	4,94516	3,93152	0,16830	6,68407	0,07422	4,19107	5,14041	0,64287	
	7	4,45255	0,37198	0,38782	6,20895	6,51089	5,46486	4,93158	11,96992	2,71229	8,15951	2,74275	4,51209	6,89414	
	8	4,93791	0,52736	9,78563	8,61397	9,83359	5,60681	1,75863	3,99472	2,43357	13,58551	0,09277	2,06543	5,22200	
Total dos machos		34,49099	44,43415	49,91984	48,61363	50,98642	40,05765	46,49252	37,72091	51,27281	37,71055	27,34563	30,25483	43,95957	543,25969
F	1	0,48862	1,25130	9,10559	0,47599	10,66294	1,56963	2,62787	2,07418	6,12510	0,96517	18,62878	13,40471	16,28771	
	2	3,15914	4,91656	0,35254	8,89223	5,63529	7,88834	8,08552	0,52329	2,63449	4,58672	25,54120	4,15396	1,80389	
	3	0,39306	5,87862	2,45105	5,02027	1,33914	13,02930	1,33284	6,63322	5,15673	7,27459	11,54803	0,45599	4,15766	
	4	2,59409	1,05427	11,56069	1,38449	1,28228	10,64699	12,44854	13,75717	6,99847	6,06971	8,34136	0,57499	9,94459	
	5	0,59039	0,97366	8,22316	12,67572	16,81380	14,61807	2,81014	0,66099	1,60555	5,72441	13,40422	16,50121	0,65300	
	6	5,93463	4,31664	6,32125	9,76058	3,46425	15,45847	14,65008	4,92129	3,53428	3,04994	7,43241	7,36390	0,17511	
	7	0,10242	1,86108	6,44952	20,70795	10,32940	8,01810	3,38925	5,00560	3,02915	7,63368	8,24921	2,54733	19,47804	
	8	2,60325	8,67496	1,06626	4,72238	6,88739	2,14514	0,55697	6,46078	10,19790	2,18474	12,21408	0,64926	15,17206	
Total das fêmeas		15,86560	28,92710	45,53005	63,63960	56,41449	73,37403	45,90122	40,03651	39,28168	37,48895	105,55730	45,67134	67,67205	665,35994
Total das linhagens		50,35659	73,36125	95,44989	112,25343	107,40091	113,43168	92,39374	77,75742	90,55449	75,19950	132,90294	75,92617	111,63163	1208,61963





**9. Assimetria Flutuante de Forma - GO (dados transformados)**

Sexo	Linhagens	Indiv.	9. Assimetria Flutuante de Forma - GO (dados transformados)																Totais	
			8	9	13	16	24	25	26	28	29	30	31	32	33					
M	1		0,72295	0,72428	0,72368	0,72545	0,73075	0,71755	0,71626	0,71728	0,72071	0,72200	0,71865	0,71910	0,72479					
	2		0,72365	0,71595	0,71370	0,72084	0,72504	0,72587	0,72109	0,71642	0,71199	0,72123	0,71520	0,72180	0,71822					
	3		0,72070	0,72634	0,74298	0,71903	0,72112	0,72048	0,71906	0,71622	0,71737	0,72003	0,72257	0,71699	0,71711					
	4		0,71294	0,71375	0,71901	0,72065	0,71985	0,73805	0,71844	0,71856	0,72318	0,72081	0,71955	0,71763	0,71939					
	5		0,71915	0,72140	0,71673	0,71395	0,71837	0,72412	0,71508	0,71456	0,72484	0,71718	0,71528	0,71933	0,71744					
	6		0,71782	0,80647	0,71847	0,71829	0,71852	0,71692	0,71664	0,71414	0,71622	0,71603	0,72391	0,71360	0,72028					
	7		0,72261	0,71738	0,72091	0,71652	0,72498	0,71659	0,71550	0,71481	0,71702	0,72816	0,71833	0,71789	0,72369					
	8		0,71361	0,71423	0,72337	0,71980	0,72458	0,71939	0,72082	0,71672	0,71903	0,72242	0,71858	0,71702	0,72524					
Total dos machos			5,75345	5,83980	5,77886	5,75452	5,78320	5,77896	5,74288	5,72870	5,75036	5,76785	5,75206	5,74335	5,76615	74,94015				
F	1		0,71663	0,72541	0,71677	0,71952	0,71678	0,71799	0,72070	0,72864	0,72551	0,71916	0,71917	0,72415	0,71627					
	2		0,71793	0,71919	0,71996	0,71702	0,71973	0,71835	0,71776	0,72020	0,72164	0,71661	0,71909	0,71449	0,72428					
	3		0,71272	0,71741	0,71447	0,71583	0,71550	0,71753	0,71648	0,72357	0,71735	0,71297	0,72098	0,72473	0,71673					
	4		0,71744	0,72344	0,71410	0,72489	0,72327	0,72728	0,71954	0,72229	0,72063	0,71231	0,72740	0,72129	0,71856					
	5		0,71711	0,71299	0,71758	0,71838	0,72539	0,71441	0,74193	0,71786	0,71841	0,71698	0,72422	0,71769	0,72300					
	6		0,71567	0,71819	0,71740	0,72229	0,71813	0,71391	0,72085	0,72227	0,72036	0,71935	0,71850	0,71761	0,71906					
	7		0,72057	0,71727	0,71605	0,72011	0,71781	0,71820	0,72054	0,71647	0,71747	0,71286	0,72162	0,71672	0,72216					
	8		0,71750	0,71796	0,71642	0,72028	0,70711	0,71588	0,72048	0,72444	0,72094	0,71768	0,71703	0,71764	0,71765					
Total das fêmeas			5,73558	5,75187	5,73274	5,75832	5,74372	5,74355	5,77828	5,77575	5,76231	5,72792	5,76802	5,75433	5,75771	74,79010				
Total das linhagens			11,48903	11,59166	11,51160	11,51284	11,52692	11,52251	11,52115	11,50445	11,51268	11,49577	11,52009	11,49769	11,52387	149,73025				

### 10. Assimetria Flutuante de Tamanho - GO (dados transformados)

Linhagens		8	9	13	16	24	25	26	28	29	30	31	32	33	Totals
Sexo	Indiv.														
M	1	2,78288	1,09162	2,17505	1,96264	3,25336	3,59148	2,41326	2,31770	4,21373	1,67856	2,14434	1,47537	1,85748	
	2	1,80552	2,98286	1,71819	2,20072	2,77596	2,02378	1,49998	0,87990	2,84470	1,35973	1,56131	2,85812	3,18209	
	3	2,21601	2,36596	1,01007	2,64412	1,53876	2,22780	2,07424	3,49710	1,80031	1,80031	2,82579	2,45985	1,35421	1,50954
	4	2,15749	4,08343	5,32093	3,54029	3,32874	1,59938	3,83635	2,08581	2,79830	2,21617	1,15415	0,88115	3,83368	
	5	2,01241	1,22891	1,67074	2,82085	1,71658	1,42314	3,35812	1,16692	2,24130	0,91015	2,89831	2,84271	1,77449	
	6	1,86572	3,55856	1,71450	0,78331	1,71949	2,33349	2,10512	0,81749	2,68031	0,75778	2,16589	2,37496	1,06905	
	7	2,22543	0,93380	0,94224	2,59016	2,64781	2,44231	2,33057	3,53128	1,79229	2,94270	1,80076	2,23877	2,71922	
	8	2,33193	1,01359	3,20712	3,01894	3,21459	2,47120	1,50287	2,12008	1,71277	3,75307	0,76991	1,60170	2,39207	
Total dos machos		17,39740	17,25872	17,75884	19,56103	20,19530	18,11257	19,12051	16,41628	20,08371	16,44395	14,95454	15,52699	18,33762	231,26745
F	1	0,99430	1,32337	3,09929	0,98792	3,34110	1,43862	1,76858	1,60443	2,57393	1,21044	4,39645	3,72890	4,09728	
	2	1,91289	2,32735	0,92333	3,06467	2,47695	2,89626	2,93011	1,01158	1,77045	2,25537	5,10306	2,15730	1,51786	
	3	0,94502	2,52559	1,71786	2,34953	1,35615	3,67822	1,35383	2,67081	2,37839	2,78830	3,47074	0,97775	2,15816	
	4	1,75900	1,24670	3,47285	1,37277	1,33502	3,33871	3,59841	3,77587	2,73833	2,56314	2,97344	1,03662	3,23181	
	5	1,04422	1,21394	2,95350	3,62984	4,16099	3,88820	1,81938	1,07749	1,45105	2,49488	3,72884	4,12325	1,07378	
	6	2,53666	2,19469	2,61175	3,20321	1,99104	3,99481	3,89231	3,89231	2,32837	2,00855	1,88413	2,81645	2,60783	
	7	0,77616	1,53658	2,63619	4,60521	3,29081	2,91858	1,97212	2,34640	1,87860	2,85196	2,95791	1,74556	4,46968	
	8	1,76160	3,02902	1,25150	2,28525	2,71798	1,62639	1,02809	2,63833	3,27076	1,63852	3,56568	1,07204	3,95880	
Total das fêmeas		11,72984	15,39724	18,66628	21,49840	20,67003	23,77978	18,36282	17,45327	18,07007	17,68674	29,01257	17,64954	21,32901	251,30559
Total das linhagens		29,12724	32,65597	36,42512	41,05943	40,86533	41,89235	37,48333	33,86954	38,15378	34,13069	43,96711	33,27653	39,66663	482,57303

11. ANOVA forma (G0)				
FV	GL	SQ	QM	F calc.
Tratamentos	12	0,0004750	0,0000396	0,6945917
Blocos	1	0,0001082	0,0001082	1,8993473
Resíduo (ERRO)	194	0,0110550	0,0000570	
Total	207	0,0116382		

	GL	Fcalc.	Ftab. (1%)	Ftab. (5%)
Tratam.	12 / 194	0,6945917	2,18	1,75
Bloco	1 / 194	1,8993473	6,63	3,84

12. ANOVA tamanho (G0)				
FV	GL	SQ	QM	F calc.
Tratamentos	12	14,0912	1,1743	1,2871
Blocos	1	1,9304	1,9304	2,1158
Resíduo (ERRO)	194	176,9983	0,9124	
Total	207	193,0199		

	GL	Fcalc.	Ftab. (1%)	Ftab. (5%)
Tratam.	12 / 194	1,2871	2,18	1,75
Bloco	1 / 194	2,1158	6,63	3,84

13. ANOVA forma						
FV	GL	SQ	QM	F calc.	F tab 1%	F tab 5%
Tratamento	23	0,001385	0,0000602	1,1248	1,79	1,52
Linhagem (L)	2	0,0001596	0,0000798	1,4901	4,61	3,00
Sexo (S)	1	0,0000041	0,0000041	0,0760	6,63	3,84
Geração (G)	3	0,0002587	0,0000862	1,6099	3,78	2,60
Linhagem X Sexo (LxS)	2	0,0000367	0,0000183	0,3425	4,61	3,00
Linhagem X Geração (LxG)	6	0,0004668	0,0000778	1,4527	2,80	2,10
Sexo X Geração (SxG)	3	0,0004159	0,0001386	2,5884	3,78	2,60
Linhagem X Sexo X Geração (LxSxG)	6	0,0000438	0,0000073	0,1362	2,80	2,10
Resíduo	192	0,0102827	0,0000536			
Total	215	0,0116681				

14. ANOVA tamanho						
FV	GL	SQ	QM	F calc.	F tab 1%	F tab 5%
Tratamento	23	16,730068	0,7273943	0,9342	1,79	1,52
Linhagem (L)	2	1,7934616	0,8967308	1,1517	4,61	3,00
Sexo (S)	1	1,6861254	1,6861254	2,1655	6,63	3,84
Geração (G)	3	0,8184463	0,2728154	0,3504	3,78	2,60
Linhagem X Sexo (LxS)	2	0,3317972	0,1658986	0,2131	4,61	3,00
Linhagem X Geração (LxG)	6	4,6422887	0,7737148	0,9937	2,80	2,10
Sexo X Geração (SxG)	3	2,0620590	0,6873530	0,8828	3,78	2,60
Linhagem X Sexo X Geração (LxSxG)	6	5,3958901	0,8993150	1,1550	2,80	2,10
Resíduo	192	149,4966217	0,7786282			
Total	215	166,2266901				

15. Média do tamanho de Centróide												
Gerações		GO			G1			G2			G5	
Sexo	M	F	Indiv.	M	F	Indiv.	M	F	Indiv.	M	F	Indiv.
		Indiv.	Indiv.		Indiv.	Indiv.		Indiv.	Indiv.		Indiv.	Indiv.
L25	1	998,29045	1079,87396	890,35657	802,71419	1012,10232	802,71419	1014,94533	1055,85437	1012,89242	1012,89242	
	2	967,60598	1078,67338	973,17714	818,46201	1068,62822	818,46201	1057,80285	935,70654	1026,66963	1026,66963	
	3	909,52554	1088,35509	967,56458	848,37657	1041,81697	848,37657	1029,70329	932,92484	1062,24083	1062,24083	
	4	974,23300	1062,92917	981,60886	794,94887	1065,47862	794,94887	881,83773	766,01885	1045,64394	1045,64394	
	5	921,64912	1096,34416	985,16562	806,17866	1109,64507	806,17866	971,35659	911,12909	1046,68190	1046,68190	
	6	969,98944	1127,97000	963,23047	870,71265	1133,31092	870,71265	961,65252	930,83841	998,70241	998,70241	
	7	909,12632	1016,92631	996,86155	883,56235	1096,63159	883,56235	1060,55305	928,96954	1064,69594	1064,69594	
	8	960,22775	1119,82696	964,96729	887,62228	1075,45138	887,62228	930,03435	935,76826	1056,60597	1056,60597	
	9	921,34321	1029,01733	965,46156	858,26517	1114,80754	858,26517	917,79478	935,49942	1076,15920	1076,15920	
L29	1	941,56170	1093,56312	856,60139	920,42695	1039,09010	920,42695	1043,63371	868,69710	1015,69612	1015,69612	
	2	960,92886	1073,57223	856,04236	917,89614	1126,72155	917,89614	1039,94250	846,85462	999,40105	999,40105	
	3	922,90990	1118,19994	895,93689	905,51087	1043,69459	905,51087	985,56588	895,99543	1014,80098	1014,80098	
	4	931,59454	985,78624	920,12478	936,58149	1042,78496	936,58149	978,62533	894,54473	1017,65900	1017,65900	
	5	963,69572	1022,81819	998,36322	921,90516	913,33305	921,90516	1042,25205	924,05937	1026,06576	1026,06576	
	6	945,08238	988,53123	846,63059	916,30336	1002,83740	916,30336	1073,10788	938,24637	987,73828	987,73828	
	7	949,29068	1021,07741	929,67172	927,16615	943,59510	927,16615	1006,37048	870,07993	1012,36443	1012,36443	
	8	915,11633	969,97893	896,28843	966,85078	1043,27101	966,85078	1052,95867	890,15899	998,92299	998,92299	
	9	939,09545	1090,71966	901,99555	859,96206	982,15898	859,96206	1018,93856	827,71896	1064,73567	1064,73567	
L30	1	964,80071	1122,85596	882,26877	880,57797	988,47339	880,57797	1046,35077	955,40245	1096,05718	1096,05718	
	2	977,25744	1150,97325	901,18467	931,92851	1004,84232	931,92851	1020,37246	939,53939	1066,15015	1066,15015	
	3	980,31793	1103,18942	880,45731	890,17609	1024,57888	890,17609	1019,98864	967,09704	1112,42181	1112,42181	
	4	987,59364	1109,78358	926,27335	893,29657	1027,72595	893,29657	1016,39699	957,74012	1057,32810	1057,32810	
	5	978,48565	1113,65128	866,76857	922,65898	1003,97372	922,65898	999,84322	935,08724	1115,40711	1115,40711	
	6	975,09134	1123,65007	903,76112	925,62925	1043,01829	925,62925	1012,46601	908,63812	1111,57126	1111,57126	
	7	973,02912	1103,80082	956,61088	915,80719	1000,66782	915,80719	970,77310	970,28847	987,71834	987,71834	
	8	1018,25377	1104,16705	912,42939	926,31836	988,42908	926,31836	1026,25607	950,54567	1098,13743	1098,13743	
	9	984,16682	1112,34352	978,23854	937,82481	961,64126	937,82481	1026,19575	913,77350	1029,48045	1029,48045	

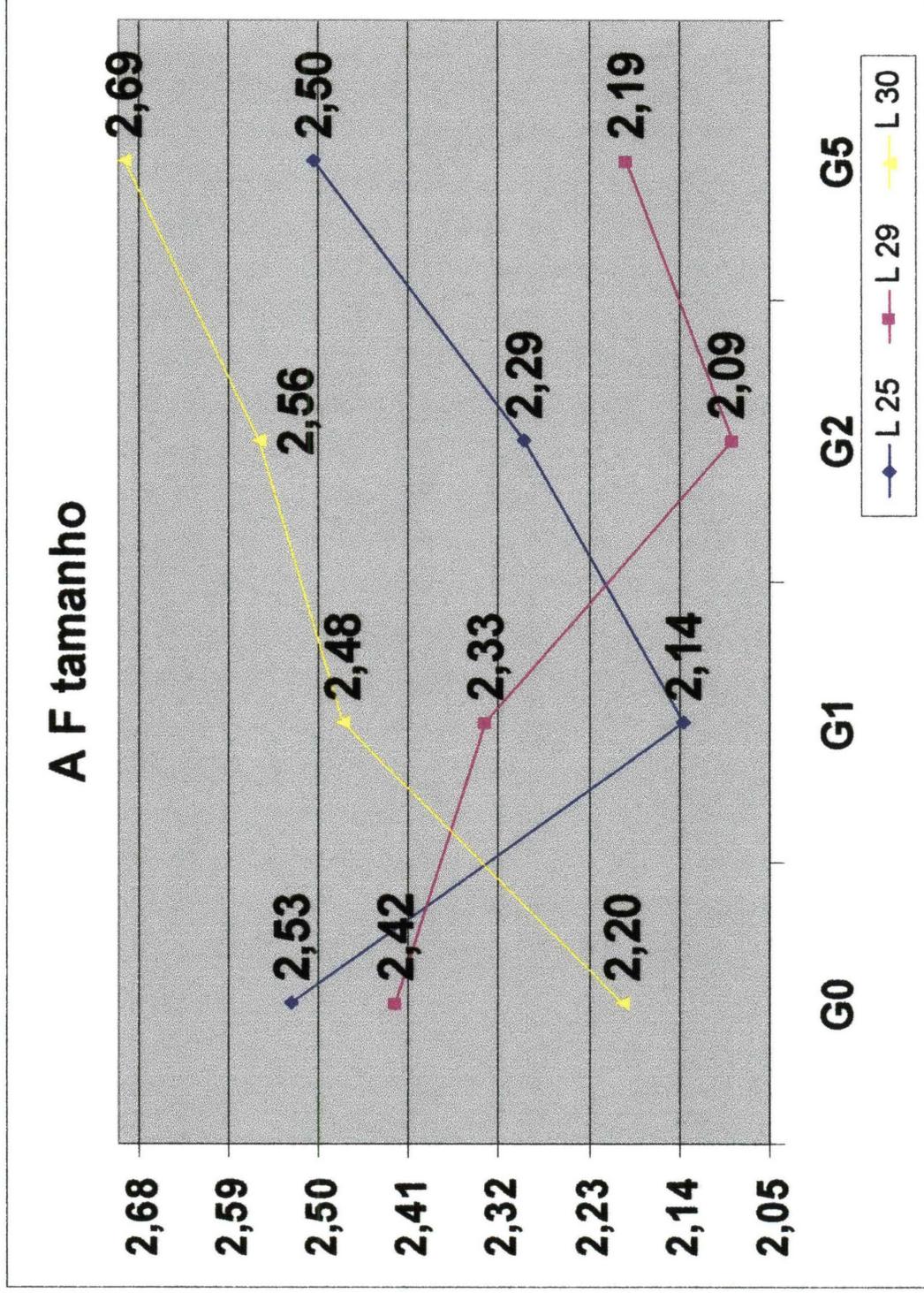
### 16. Correlação

<b>Correlação (tamanho X AF forma)</b>	<b>-0,01306</b>
GL	216
tab. 1%	0,10
tab. 5%	0,13
teste t	<b>-0,19192</b>
t tab.	2,58
1,96	1,96
<b>Significância</b>	<b>Não há correlação entre tamanho e AF forma.</b>

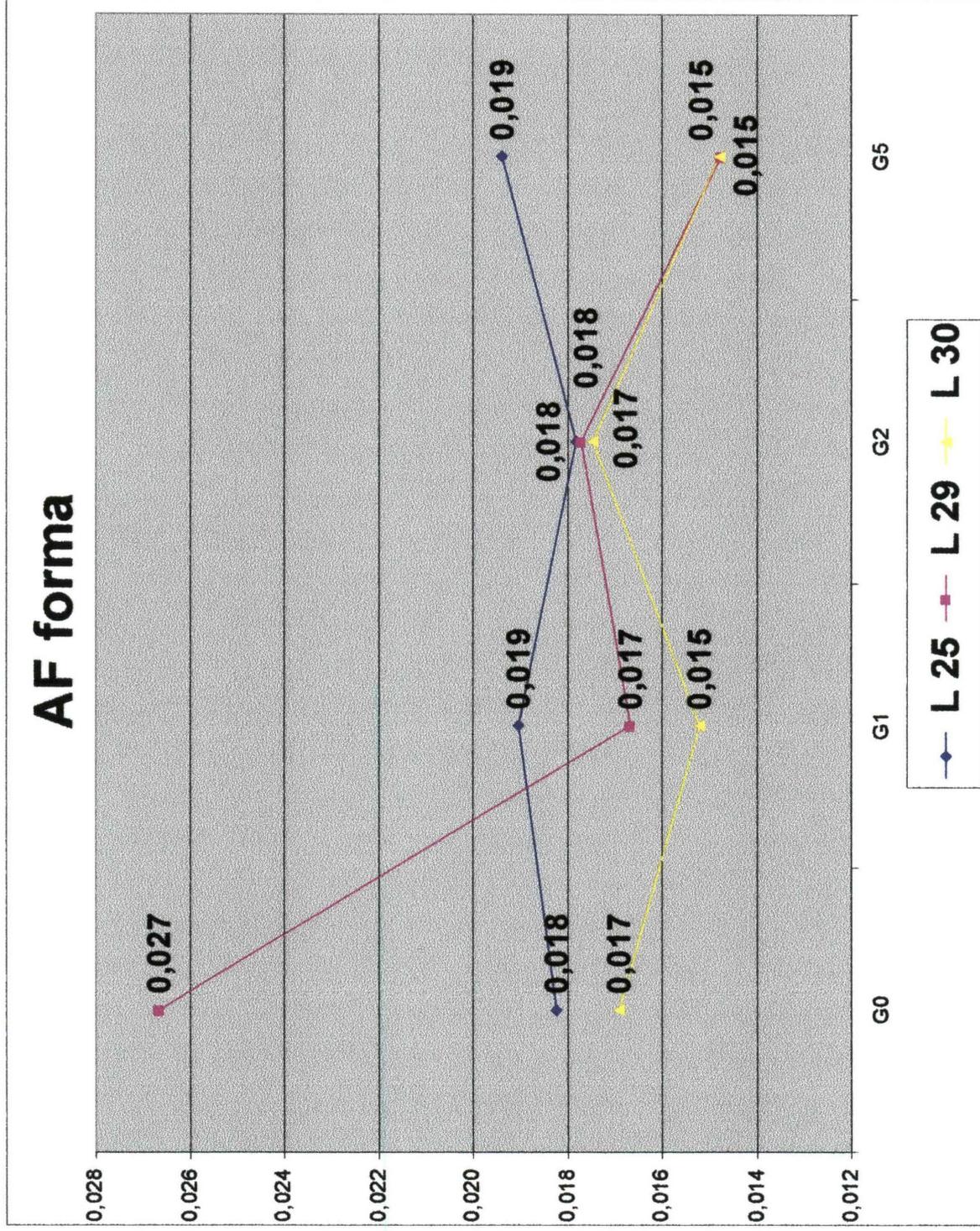
<b>Correlação (tamanho X AF tamanho)</b>	<b>0,050162</b>
GL	216
tab. 1%	0,10
tab. 5%	0,13
teste t	<b>0,738159</b>
t tab.	2,58
1,96	1,96
<b>Significância</b>	<b>Não há correlação entre tamanho e AF forma.</b>

## Gráficos

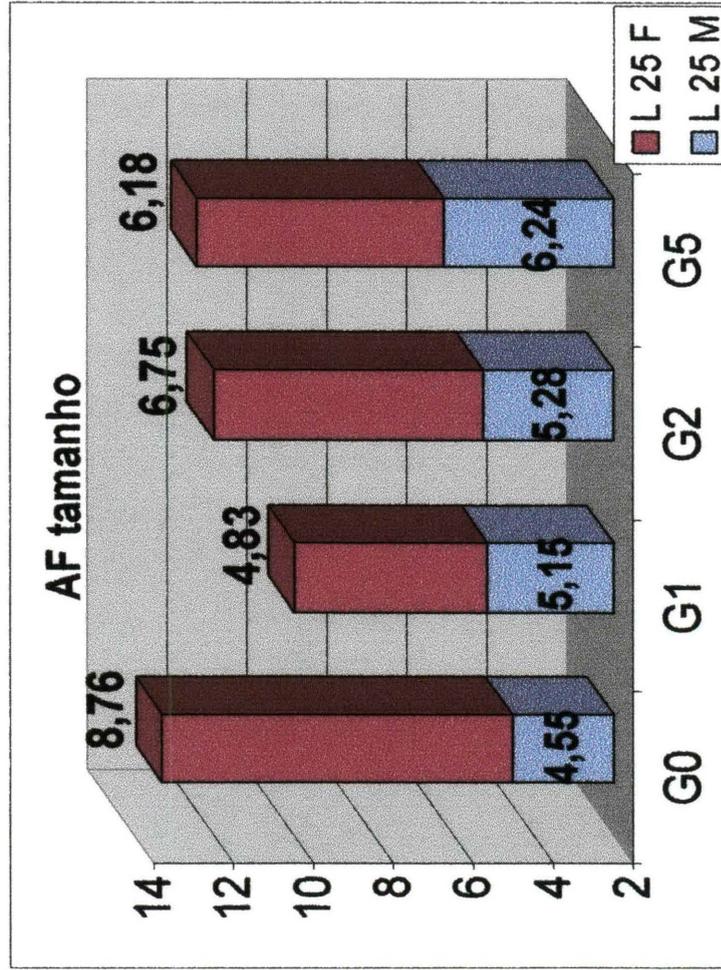
**Graf. 01** Gráfico representando as médias dos valores de tamanho, de cada linhagem (L25, L29, L30) ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5).



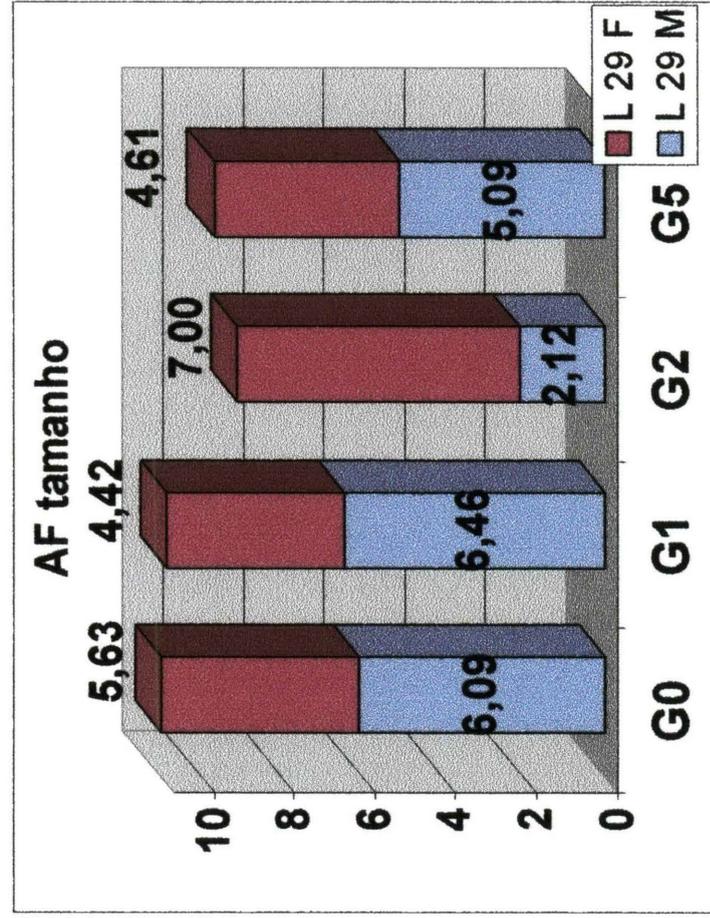
**Graf. 02** Gráfico representando as médias dos valores de forma, de cada linhagem (L25, L29, L30) ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5).



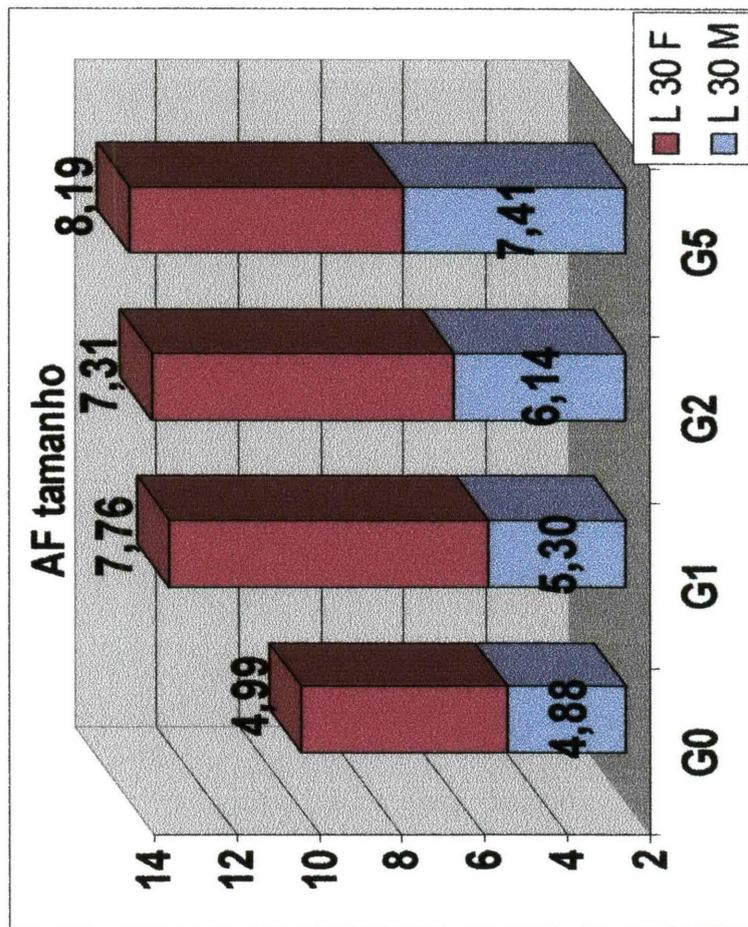
**Graf. 03** Gráfico representando as médias dos valores de tamanho, dos machos (L25 M) e das fêmeas (L25 F), da linhagem 25 ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5).



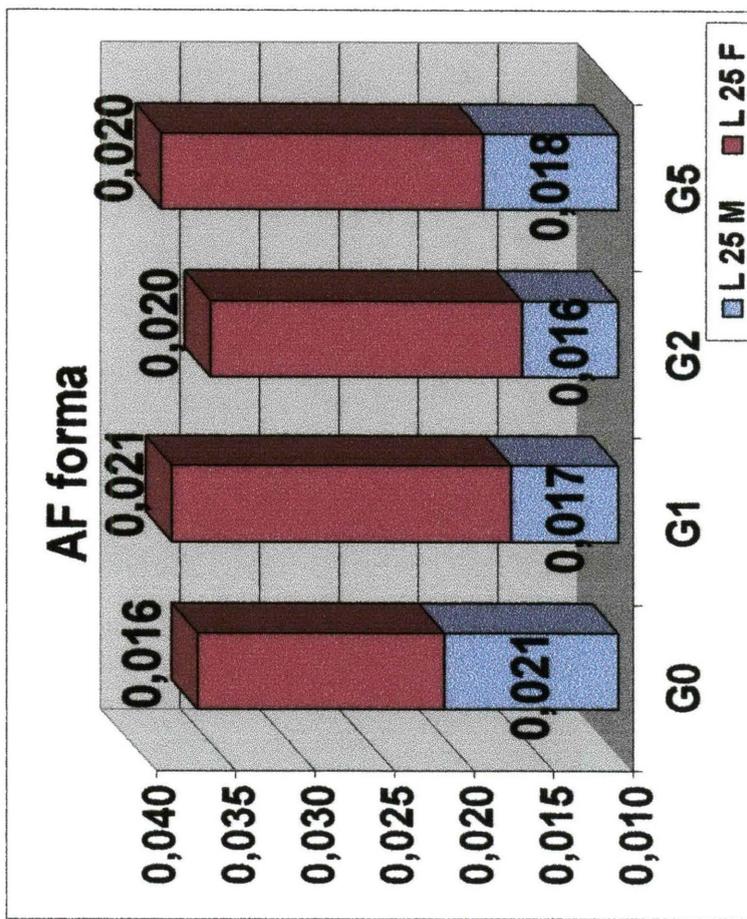
**Graf. 04** Gráfico representando as médias dos valores de tamanho dos machos (L29 M) e das fêmeas (L29 F), da linhagem 29 ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5).



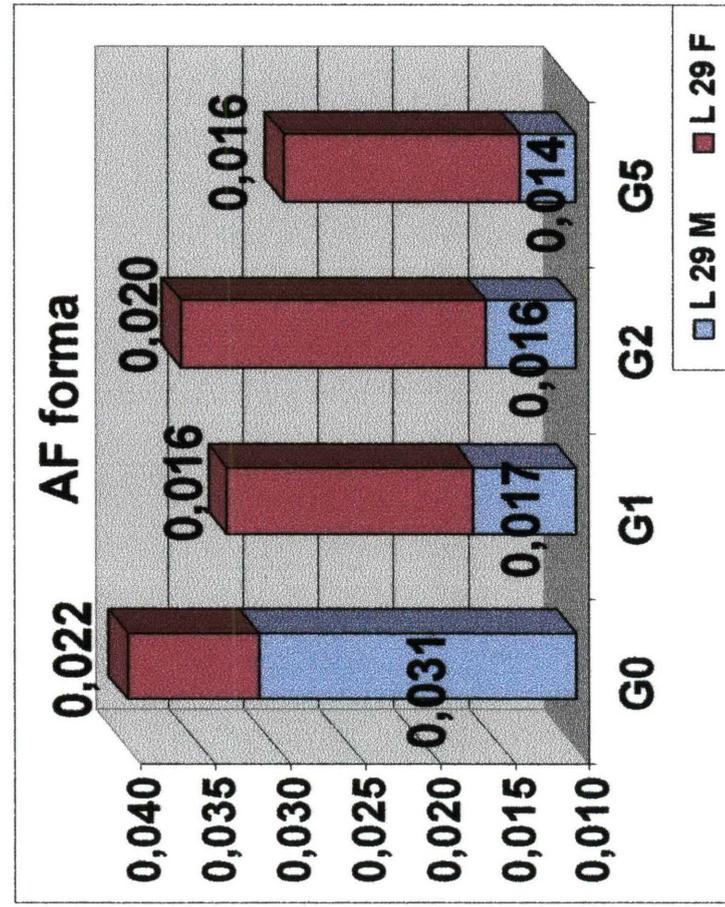
**Graf. 05** Gráfico representando as médias dos valores de tamanho dos machos (L30 M) e das fêmeas (L30 F), da agem 30 ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5).



**Graf. 06** Gráfico representando as médias dos valores de forma dos machos (L25 M) e das fêmeas (L25 F), da linhagem 25 ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5).



**Graf. 07** Gráfico representando as médias dos valores de forma dos machos (L29 M) e das fêmeas (L29 F), da linhagem 29 ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5).



**Graf. 08** Gráfico representando as médias dos valores de forma dos machos (L30 M) e das fêmeas (L30 F), da linhagem 30 ao longo do tempo (gerações G0, G1, G2, G5).

