

MORFOMETRIA GEOMÉTRICA IDENTIFICA DIFERENÇAS FENOTÍPICAS EM ASAS DE LINHAGENS DE *Mesembrinella bellardiana* ALDRICH, 1922 (DIPTERA: MESEMBRINELLIDAE) DA AMAZÔNIA E MATA ATLÂNTICA

DINIZ LIMA FERREIRA¹; MARCO ANTONIO TONUS MARINHO ²

^{1,2} Laboratório de Evolução e Genética de Insetos (LEGIN), Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas

¹ dinizfff@gmail.com; ² marco.marinho@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Mesembrinellidae compreende um grupo de dípteros com 53 espécies viventes (WHITWORTH; YUSSEFF-VANEGAS, 2019) e uma extinta (CERRETTI et al., 2017). A família compreende um dos grupos mais antigos da superfamília Oestroidea, juntamente com Ulurumyiidae (CERRETTI et al., 2017; KUTTY et al. 2019; BUENAVENTURA et al., 2020). São organismos macrolarvíparos que vivem em áreas sombreadas de formações florestais primárias do Neotrópico (GUIMARÃES, 1977; MARINHO et al., 2017). Sensíveis às variações ambientais, são possíveis bioindicadores de perturbação ambiental (GADELHA et al., 2009).

A sistemática do grupo Mesembrinellidae apresenta algumas controvérsias. Um exemplo em nível de espécie é *Mesembrinella bellardiana* Aldrich, 1922. Guimarães (1977), com base nos padrões de distribuição e em diferenças de coloração dos espécimes, propôs a divisão da linhagem específica em duas subespécies: *M. bellardiana bellardiana* (Aldrich, 1922), com ocorrência restrita ao sul da América do Sul (predominantemente na Mata Atlântica); e *M. bellardiana fuscicosta* (Séguy, 1925), restrita ao norte da América do Sul (predominantemente na Amazônia e Andes). Contudo, em uma revisão posterior, Bonatto (2001) não encontrou diferenças significativas na genitália masculina destas linhagens, não adotando assim a proposta de Guimarães (1977). Posteriormente, Marinho et al. (2017), através da análise de sequências dos genes COI e ITS2, sugeriram que a espécie nominal *M. bellardiana* seria composta provavelmente por duas linhagens evolutivas distintas, correspondendo às subespécies propostas anteriormente.

Apesar das diferenças entre as linhagens de *M. bellardiana*, sua identificação taxonômica é ainda complexa. Assim, este trabalho buscou encontrar diferenças nas formas das asas entre as linhagens evolutivas identificadas em Marinho et al. (2017). Através de morfometria geométrica (ADAMS et al., 2013), buscou-se encontrar padrões na venação de asas que possam embasar as evidências de divergência fenotípica entre linhagens e verificar se é possível sua identificação.

2. METODOLOGIA

Os espécimes de *M. bellardiana* foram obtidos da coleção presente no Lab. de Evolução e Genética de Insetos (LEGIN), do IB/UFPeL. Ao todo, foram analisados 68 indivíduos, sendo sete provenientes da Colômbia e de estados da região Norte do Brasil ('Amazônia') e 61 de estados das regiões Sudeste e Sul do Brasil ('Mata Atlântica'). Para cada espécime, a asa direita foi separada do corpo, fixada em lâmina de microscopia e fotografada em mesma posição e plano focal com uma lupa Zeiss stereo DiscoveryV20.

As imagens individualizadas foram utilizadas para delimitar pontos de referência (*landmarks*). Foram escolhidos 16 pontos homólogos (*sensu*

BOOKSTEIN, 1997) entre as estruturas, variando entre os limites das veias na borda das asas e a intersecção entre uma veia e outra.

A matriz de coordenadas foi utilizada para as análises de morfometria geométrica (ADAMS et al., 2013). Em dois indivíduos, foi necessário estimar *landmarks* faltantes (3 no total) por um método de interpolação (GUNZ et al., 2009). Os efeitos de escala, tamanho e rotação das coordenadas foram retirados pela Análise Generalizada de Procrustes (GPA) (ROHLF; SLICE, 1990).

Foi feita uma ANOVA cuja significância foi testada a partir da randomização de resíduos (COLLYER et al., 2015). O tipo de soma dos quadrados (SS) utilizado foi o "II", o qual é indicado para amostras não-balanceadas (LANGSRUD, 2003). Os modelos lineares testados a princípio envolveram o logaritmo dos tamanhos de centróide, para verificar alometria (KLINGENBERG, 2016), e as linhagens ('Amazônia' e 'Mata Atlântica'), como variáveis resposta. Realizou-se, da mesma forma, um teste de homogeneidade de inclinações para verificar se a alometria era comum ou única às linhagens, além de um teste par-a-par, para comparar as médias das duas linhagens. Verificou-se, ainda, suas formas gráficas por vetores e pontos.

A diminuição da dimensionalidade das variáveis de forma foi feita por uma Análise de Componentes Principais (PCA). Com os *pc scores*, foi realizada uma análise discriminativa baseada em modelos (*Gaussian Finite Mixture Models for Classification*) (FRALEY; RAFTERY, 2002). Por fim, verificou-se se as formas de asas poderiam ser corretamente atribuídas às suas respectivas linhagens. Todas as análises foram feitas em R (R CORE TEAM, 2020), através dos pacotes *geomorph* (ADAMS et al., 2020) e *mclust* (SCRUCCA et al., 2016).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização da GPA, as variáveis de forma e tamanho de centróide no espaço tangencial puderam ser adquiridas (DRYDEN; MARDIA, 1993; ROLHF, 1999; ADAMS et al., 2013). Esse espaço multidimensional foi, nesse caso, descrito por 32 dimensões.

Tanto o tamanho de centroide (alometria) quanto as linhagens eram significativas: $\Pr(>F) = 0.001$ e $\Pr(>F) = 0.051$, respectivamente. O tamanho de cada efeito (*Z scores*) na amostra foi de 4.4914 e 1.7202, respectivamente. Esse modelo se mostrou mais viável para explicar o tamanho das asas, e menos para a atribuição das linhagens. O teste de homogeneidade das inclinações revelou-se, entretanto, não significativo: $\Pr(>F) = 0.127$. Dessa forma, padrões alométricos entre linhagens eram comuns, não sendo necessária a subtração dos resíduos do tamanho de centróide das variáveis de forma. O teste par-a-par revelou uma distância entre quadrados mínimos (LS) significativa: $\Pr(>F) = 0.047$. Logo, existem diferenças nas formas médias das duas linhagens.

A PCA resultou em 32 componentes principais, sendo que o primeiro (PC1) representou aproximadamente 28%, e o segundo (PC2) 18%. Quando plotados os primeiros dois eixos de variação, entretanto, observou-se não ser possível distinguir as linhagens 'Mata Atlântica' e 'Amazônia'. Assim, todos os *pc scores* (32) foram utilizados para verificar se as formas eram corretamente atribuídas às suas linhagens na análise discriminativa.

Os resultados obtidos mostraram uma correta classificação de linhagem, com uma taxa de erro de 10,29%. Ou seja, em praticamente todas as amostras, as formas de asas corresponderam corretamente às suas respectivas linhagens. A porcentagem de acerto, entretanto, está inflada, devido à baixa amostragem de

indivíduos da linhagem 'Amazônia'. O resultado dessa análise deve ser visto com cautela.

A superimposição entre as formas médias das duas linhagens demonstra diferenças morfológicas nas asas (Fig. 1). A média da linhagem 'Amazônia', em relação à 'Mata Atlântica', apresenta uma retração na porção apical da asa. Há um recuo notável também para a região medial da asa, na veia cúbito-anal 1, representado pelo *landmark* 7. As proporções entre as células radiais 2+3 e 4+5 também mudam. Há um aumento na área da primeira, em relação a segunda.

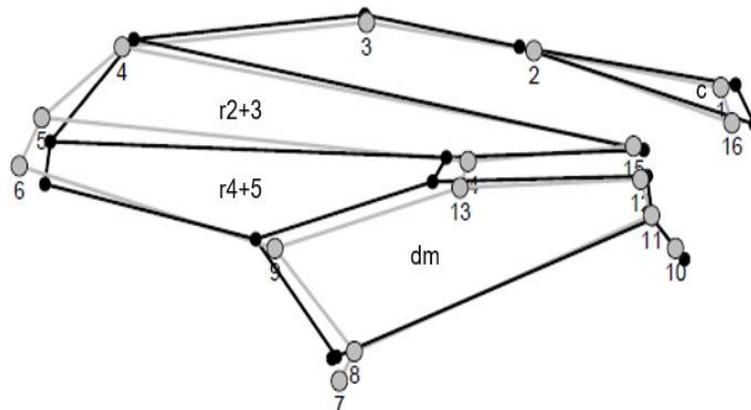


Figura 1. Superimposição das formas médias das asas das linhagens de *M. bellardiana*. Em preto, forma média da linhagem 'Amazônia'; em cinza, da linhagem 'Mata Atlântica'. A nomenclatura de veias e células segue McAlpine (1981).

As principais divergências nos caracteres morfológicos entre as linhagens haviam sido descritas por Guimarães (1977), havendo a proposta de divisão em duas subespécies: *M. bellardiana bellardiana* (Aldrich, 1922), aqui tratada como linhagem 'Mata Atlântica'; e *M. bellardiana fuscicosta* (Séguy, 1925), aqui tratada como linhagem 'Amazônia' (como em Marinho et al., 2017). As diferenças fenotípicas que justificaram a criação dessas duas subespécies por Guimarães (1977) foram a coloração da polinosidade da cabeça, dourada para a primeira e branca para a segunda; e a coloração da porção terminal dos fêmures, a qual é negra para a primeira e acastanhada para a segunda. Essas diferenças, contudo, não eram acompanhadas por diferenças significativas entre as genitálias (BONATTO, 2001).

Marinho et al. (2017) sugeriram um modelo de duas espécies baseado na divergência genética entre sequências de COI e ITS2, além da distribuição disjunta entre as linhagens. Entretanto, a identificação taxonômica dessas linhagens genéticas por caracteres morfológicos (como descritos por Guimarães, 1977) é complicada. A forma da asa de nenhuma maneira representa uma correlação direta com a divergência entre as sequências gênicas. Contudo, contribuem na identificação das linhagens e confirmam de maneira quantitativa a sua divergência fenotípica. Reforçando, portanto, o modelo de duas subespécies proposto por aqueles autores, possivelmente compreendendo até mesmo duas espécies distintas.

4. CONCLUSÕES

As diferenças estatísticas significativas confirmam que existem diferenças nas formas médias das asas entre as duas linhagens. A análise discriminativa identifica

corretamente essas formas às suas respectivas classes, ainda que com algumas ressalvas. Confirma-se, assim, a divergência fenotípica entre as linhagens da Mata Atlântica e Amazônia, além da genética, obtida por Marinho et al., 2017.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.; COLLYER, M.; KALIONTZOPOULOU, A.. **Geomorph: Software for geometric morphometric analyses**. R package version 3.2.1, 2020.
- ADAMS, D.; ROHLF, J.; SLICE, D.E.. A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. **Hystrix**, v. 24, n. 1, p. 7, 2013.
- BONATTO, Sionei Ricardo. **Revisão e análise cladística de Mesembrinellidae stat. rev. (Diptera, Oestroidea)**. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Entomologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2001.
- BOOKSTEIN, F.. **Morphometric tools for landmark data: geometry and biology**. Cambridge University Press, 1997.
- BUENAVENTURA, E.; et al. Protein-encoding ultraconserved elements provide a new phylogenomic perspective of Oestroidea flies (Diptera: Calypterae). **Systematic Entomology**, early view [doi: <https://doi.org/10.1111/syen.12443>], 2020.
- CERRETTI, P.; et al. First fossil of an oestroid fly (Diptera: Calypterae: Oestroidea) and the dating of oestroid divergences. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0182101, 2017.
- COLLYER, M.; SEKORA, D.; ADAMS, D.. A method for analysis of phenotypic change for phenotypes described by high-dimensional data. **Heredity**, v. 115, n. 4, p. 357-365, 2015.
- DE QUEIROZ GADELHA, B.; FERRAZ, A.; AGUIAR, V.. A importância dos mesembrinelíneos (Diptera: Calliphoridae) e seu potencial como indicadores de preservação ambiental. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 4, p. 660-664, 2009.
- DRYDEN, L.; MARDIA, K.. Multivariate shape analysis. **Sankhyā: The Indian Journal of Statistics, Series A**, v. 55, p. 460-480, 1993.
- FRALEY, Chris; RAFTERY, Adrian E. Model-based clustering, discriminant analysis, and density estimation. **Journal of the American statistical Association**, v. 97, n. 458, p. 611-631, 2002.
- GUIMARAES, J.. A systematic revision of the Mesembrinellidae, stat. nov. (Diptera, Cyclorrhapha). **Arquivos de Zoologia**, n. 29, p. 1-109, 1977.
- GUNZ, P.; et al. Principles for the virtual reconstruction of hominin crania. **Journal of Human Evolution**, v. 57, n. 1, p. 48-62, 2009.
- KLINGENBERG, C.. Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. **Development Genes and Evolution**, v. 226, n. 3, p. 113-137, 2016.
- KUTTY, S.N.; et al. Phylogenomic analysis of Calypterae: resolving the phylogenetic relationships within a major radiation of Diptera. **Cladistics**, v. 35, n. 6, p. 605-622, 2019.
- LANGSRUD, Ø.. ANOVA for unbalanced data: Use Type II instead of Type III sums of squares. **Statistics and Computing**, v. 13, n. 2, p. 163-167, 2003.
- MARINHO, M.A.T.; et al. The first phylogenetic study of Mesembrinellidae (Diptera: Oestroidea) based on molecular data: clades and congruence with morphological characters. **Cladistics**, v. 33, n. 2, p. 134-152, 2017.
- MCALPINE, J.F.; et al. **Manual of Nearctic Diptera. Volume 1**. Agriculture Canada, Canadá, 1981.
- R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.
- ROHLF, J.. Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. **Journal of Classification**, v. 16, n. 2, p. 197-223, 1999.
- ROHLF, F.J.; SLICE, D.. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. **Systematic Biology**, v. 39, n. 1, p. 40-59, 1990.
- SCRUCCA, L.; FOP, M., MURPHY, T.B.; RAFTERY, A.E.. mclust 5: clustering, classification and density estimation using Gaussian finite mixture models. **The R Journal**, v. 8, n. 1, p. 289-317, 2016.
- WHITWORTH, T.L.; YUSSEFF-VANEGAS, S.. A revision of the genera and species of the Neotropical family Mesembrinellidae (Diptera: Oestroidea). **Zootaxa**, v. 4659, n. 1, p. 1-146, 2019.