

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E

BIOLOGIA MOLECULAR

Emanuele Cristina Gustani

EVOLUÇÃO E INTEGRAÇÃO DE FENÓTIPOS COMPLEXOS EM INSETOS:

Estudo de caso em *Teleopsis dalmanni* (Diptera: Diopsidae) e em espécies de

Anastrepha do grupo *fraterculus* (Diptera: Tephritidae)

São Carlos – SP

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E

BIOLOGIA MOLECULAR

Emanuele Cristina Gustani

EVOLUÇÃO E INTEGRAÇÃO DE FENÓTIPOS COMPLEXOS EM INSETOS:

Estudo de caso em *Teleopsis dalmanni* (Diptera: Diopsidae) e em espécies de

Anastrepha do grupo *fraterculus* (Diptera: Tephritidae)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências com área de concentração em Genética Evolutiva.
Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito

São Carlos – SP

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Emanuele Cristina Gustani, realizada em 31/08/2018:

R E A

Prof. Dr. Reinaldo Otavio Alvarenga Alves de Brito
UFSCar

Marco Antonio Del Lama

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama
UFSCar

F / R E A

Prof. Dr. Fernando de Faria Franco
UFSCar

Maura Helena Manfrin

Profa. Dra. Maura Helena Manfrin
USP

Giancarlo Conde Xavier Oliveira

Prof. Dr. Giancarlo Conde Xavier Oliveira
USP

Dedico este trabalho aos mestres no caminho e ao meu esposo Carlos Eduardo.

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Reinaldo A. de Brito pela oportunidade, por extensas discussões, conselhos, por compartilhar suas experiências, pela sua amizade, foram anos de muito aprendizado e esta troca nos permitiu construir este trabalho. Ao prof. Dr. Jason B. Wolf por ter me recebido de braços abertos para o mundo da genética quantitativa evolutiva na University of Bath (UK), pelas inestimáveis discussões e contribuições, por compartilhar seu profundo conhecimento e experiências que foram alicerces para este trabalho.

À minha família por acreditar em mim. Ao meu esposo Eduardo por ser meu suporte incondicional durante estes anos, pelas valiosas discussões, ultrapassarmos muitos obstáculos juntos. A minha mãe por ter me ensinado a perseverança e persistência, à minha irmã Flávia pelas conversas e apoio (sem *spoiler* das séries que não pude assistir).

Aos companheiros de laboratório pelo ambiente acolhedor. Isabel por ser sempre solícita e animada, nunca vou esquecer. À Karla e Carlos pela amizade e companheirismo, compartilhamos churrascos, códigos e sofrimentos. À Samira pela amizade, pelo acolhimento, compreensão, revisão, por compartilhar suas experiências, por tudo. À Janaína pela amizade, discussões, por ter me recebido e mostrado que nada é assustador quando não se está sozinho em um novo país. Ao Diogo Melo pelas inúmeras discussões de genética quantitativa e “R”. Ao prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi por disponibilizar laboratório para o processamento e captura das imagens.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e período sanduíche foi realizado com apoio da CAPES pelo Programa Pesquisador Visitante Especial – PPVE’s CSF- 99999.008093/2015-06.

“Owing to this struggle for life, any variation, however slight and from whatever cause proceeding, if it be in any degree profitable to an individual of any species, in its infinitely complex relations to other organic beings and to external nature, will tend to the preservation of that individual... I have called this principle, by which each slight variation, if useful, is preserved, by the term of Natural Selection, in order to mark its relation to man’s power of selection.”

Charles Darwin

RESUMO

Caracteres complexos são afetados por múltiplas variáveis e processos, cuja interação molda e determina seu padrão de evolução. Este trabalho utiliza metodologias de genética quantitativa evolutiva para compreender as forças evolutivas afetando a diferenciação morfológica de caracteres complexos em dois modelos evolutivos, buscando quantificar a magnitude da seleção e a resposta modulada pelas covariâncias dos caracteres morfológicos. *Teleopsis dalmanni* é uma mosca de olhos pedunculados cujo ornamento exagerado é resposta à pressão da escolha por machos com olhos com pedúnculos maiores para o acasalamento. No entanto, poucos trabalhos exploram o efeito não-intencional dessa seleção em outras estruturas corporais, e do impacto do balanço energético na evolução de caracteres diferentes. Em duas linhagens submetidas à seleção artificial bidirecional para pedúnculos oculares maiores (High) e pedúnculos menores (Low), encontramos mudanças fenotípicas nos caracteres alvo e não-alvos da seleção. Diante desta mudança, a matriz de variância / covariância genética G revelou que estes caracteres estão positivamente correlacionados e a predição dos vetores de resposta à seleção evidenciam também uma resposta correlacionada. Em outro experimento em indivíduos expostos à níveis diferentes de restrição de recursos, detectamos mudança na resposta à seleção dependendo da disponibilidade recursos, evidenciando padrão de seleção não-intencional entre os caracteres, possivelmente como compensação para o tamanho extremo do comprimento do pedúnculo para manter a alta capacidade de vôo em performances de cópula. No segundo estudo de caso, investigamos o potencial evolutivo de caracteres morfológicos usados na identificação de espécies e alvos da seleção sexual para espécies pertencentes a cinco grupos do gênero *Anastrepha* (*fraterculus*, *grandis*, *pseuparallela*, *serpentina* e *striata*), que são representativas da grande diversidade desse gênero, e focamos no grupo

fraterculus, que apresenta algumas das espécies mais amplamente distribuídas. Encontramos sinal filogenético significativo entre os grupos para alguns dos caracteres ligados à identificação e seleção sexual, e dentro do grupo *fraterculus* apenas para o ápice do acúleo e a forma da asa. Uma análise de correlações revelou que as espécies estudadas não seguem o modelo estocástico Browniano, sugerindo que estejam evoluindo sob influência de seleção. Considerando que a heterogeneidade ambiental (plasticidade) poderia desempenhar um papel preponderante na adaptação dessas espécies, quantificamos a influência ambiental de hospedeiros em duas espécies polífagas, *A. fraterculus* e *A. obliqua*. Vetores de plasticidade correlacionados com a seleção e resposta aos gradientes de seleção indicam uma possível especificidade ao hospedeiro que afetaram principalmente ápice do acúleo, largura da seção não-serrada do acúleo, tamanho e largura da asa, tamanho do olho e largura da cabeça. Esses resultados de plasticidade aliados à alta variação intraespecífica e sinal filogenético para poucos caracteres, embora tenha corroborado papel relevante de características do acúleo na taxonomia, inspiram cautela na identificação das espécies, particularmente entre espécies do grupo *fraterculus* que são filogeneticamente mais próximas, e sugere que sejam considerados as propriedades do hospedeiro para evitar potencial confundimento. Assim, nosso estudo contribui para o esclarecimento dos padrões de evolução morfológica em ambos os insetos, considerando aspectos pouco explorados e pressões diretas ou indiretas do ambiente.

ABSTRACT

Complex traits are affected by multiple traits and processes, whose interaction shape and determine their evolutionary patterns. This work uses quantitative evolutionary genetic methodologies to understand the evolutionary forces affecting the morphological differentiation of complex traits in two different evolutionary models, with the goal of quantifying the magnitude of selection and its response modulated by the covariance of morphological traits. *Teleopsis dalmanni* are stalk-eyed flies whose exaggerated ornament is a response to mating choice on males with larger stalk-eyes for mating. However, few works explore the unintentional effect of this selection on other body parts, and the impact of the energy balance on the evolution of different traits. In two strains subjected to bidirectional artificial selection for large and small stalk-to-body ratios, we found phenotypic changes on target and non-target selected traits. Given this change, the genetic variance / covariance G matrix showed that these traits are positively correlated and the prediction of the response vectors to the selection also shows a correlated response. A separate experiment on individuals exposed to different levels of resource constraints detected a change in response to selection depending on resource availability, showing unintentional pattern selection among traits, possibly as compensation for extreme stalk-eye lengths, to maintain high flying capability in mating performances. A second case study investigated the evolutionary potential of morphological traits used to identify species and targets of sexual selection for species belonging to five groups of the genus *Anastrepha* (*fraterculus*, *grandis*, *pseuparallela*, *serpentina* and *striata*), which represent a portion of the great diversity in the genus, with a special focus on the *fraterculus* group, which harbors some of the most widely distributed species in the genus. We found significant phylogenetic signal for some of the traits linked to sexual identification and selection

among species groups, and within the *fraterculus* group only for the aculeus apex and wing shape. A correlation analysis of ancestral matrix Principal components revealed that the studied species do not follow the Brownian stochastic model, suggesting that their evolution is shaped by selection. Considering that environmental heterogeneity (plasticity) could play a relevant role in the adaptation of these species, we quantified the environmental influence of hosts in two polyphagous species, *A. fraterculus* and *A. obliqua*. Plasticity vectors positively correlated with selection and response to selection gradients indicate a possible host specificity that affected mainly the aculeus apex, the aculeus width in their non-serrated portion, the wing size and width, the eye size and the head width. These results, together with the high intraspecific variation and phylogenetic signal only for a limited number of traits, though corroborate the relevant role of the aculeus on taxonomy, raise a cautionary flag for its use in species identification, particularly among species of the *fraterculus* group, which are phylogenetically closer, and suggests that host attributes should be considered to avoid potentially confounding results. Thus, our study contributes to the elucidation of morphological evolutionary patterns in these insect models, by considering poorly explored quantitative models as well as direct and indirect environmental pressure inferences.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Dimorfismo sexual em moscas de olhos pedunculados da espécie *Teleopsis dalmanni* (Foto: Jerry Husak).....8

Figura 2. Dimorfismo sexual de espécies de *Anastrepha*. Foto: Bureau of Plant Pest Surveillance and Pest Risk Analysis.....13

CAPÍTULO II

Forensic quantitative genetic analysis reveals unintended index selection as the cause of wing-shape evolution induced by artificial selection on eye-span in a stalk-eyed fly

Figure 1. Box-plot distribution of different traits measured on an unselected control (C) line, an H line selected for high eye-stalk ratio and an L line, selected for low eye-stalk ratio, separated by sex.....42

Figure 2. Box-plot distribution of geometric distance, representing the geometric distance mean measured on lines selected for H (high eye-stalk ratio) and L (low eye-stalk ratio) subjected to resource manipulation.....43

Supplementary Information

Figure S1. Regression slopes for six traits evaluated from two antagonistically selected lineages (with replicates) for males and females submitted to resource availability gradients.....45

CAPÍTULO III

Evidência de plasticidade fenotípica em caracteres morfológicos de espécies do grupo

Anastrepha fraterculus

Figura 1. Filomorfoespaço demonstrando os primeiros eixos de variação no morfoespaço (PC1 e PC2) nas duas abordagens (Distâncias e *Landmarks*) para as nove espécies aqui estudadas.....83

Figura 2. Análise de Componentes principais para dados das medidas e forma de nove espécies do gênero *Anastrepha*.....84

Informação Suplementar

Figura S1. Descrição da localização das landmarks para captura da forma e distâncias lineares. A. Asa, 14 landmarks. B. Cabeça, 16 landmarks. C. Acúleo, 7 landmarks. D. Tórax, 4 landmarks.....86

Figura S2. Árvore de espécies inferida a partir de árvores de máxima de verossimilhança de 3945 genes para nove espécies do gênero *Anastrepha*.....86

Figura S3. Média fenotípica para diferentes caracteres de *Anastrepha obliqua* medidos em moscas fêmeas adultas derivadas de três hospedeiros: *A. carambola*, *E. pyriformes* e *S. Dulcis*.....87

Figura S4. Média fenotípica para diferentes caracteres de *Anastrepha fraterculus* medidos em moscas fêmeas adultas derivadas de três hospedeiros: *E. brasiliensis*, *E. uniflora* e *P. guajava* para *Anastrepha*.....87

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Forensic quantitative genetic analysis reveals unintended index selection as the cause of wing-shape evolution induced by artificial selection on eye-span in a stalk-eyed fly

Table 1. Linear models for lineages subjected to 20 generations of bidirectional selection, and an unselected control line. Six distances were analyzed on adult individuals of *Teleopsis dalmanni*, separated by sex (M=male; F=female).....37

Table 2. Genetic variances, covariances and correlations for traits of *Teleopsis dalmanni*.....38

Table 3. Normalized Δz vectors as a magnitude of morphological change and directional phenotypic selection gradients (β), also estimated as the norm from the P matrix and Δz and traits.....39

Table 4. Linear models for lineages selected for H (High eye-stalk ratio) and L (Low eye-stalk ratio) for 120 generations subjected to resource manipulation.....40

Table 5. The normalized Δz vectors for lineages submitted to resource allocation as magnitude of morphological change and directional phenotypic selection gradients (β), also estimated as the norm from the P matrix and Δz and traits.....41

Supplementary information

Table S1. Vector correlations between response to selection (Δz), gradient selection (β). The vectors were constructed based on multivariate Breeder's equation (Lande Equation)44

CAPÍTULO III

Evidência de plasticidade fenotípica em caracteres morfológicos de espécies do grupo *Anastrepha fraterculus*

Tabela 1. Teste de Sinal Filogenético para o total de espécies e para o grupo *fraterculus*, para a Forma, Tamanho do Centróide e Distâncias Euclidianas (DL).....80

Tabela 2. Tabela 2. Matrizes de Variância / Covariância e Correlação entre caracteres mensurados em nove espécies de *Anastrepha*81

Tabela 3. Estimativa dos vetores de plasticidade da média da posteriori do efeito fixo para cada hospedeiro para cada espécie.....82

Tabela 4. Teste de alinhamento entre os vetores de plasticidade com o vetor de máxima variação fenotípica da matriz P de cada espécie (P_{max}), resposta à seleção para cada hospedeiro (Δz) e gradiente de seleção para cada hospedeiro (β). O alinhamento é expresso como modo de correlação entre os vetores normalizados (θ) para ambas as espécies, *A. obliqua* e *A. fraterculus sp2*.82

Informação Suplementar

Tabela S1. Amostra de moscas-da-fruta, *Anastrepha.sp*.....85

Tabela S2. Caracteres utilizados nas distâncias Euclidianas.....85

Tabela S3. Estimativa da forma média para o conjunto de espécimes alinhados.....88

Tabela S4. Média e desvio-padrão de diversas medidas para as espécies (E) e hospedeiros (H) aqui estudadas.....89

Tabela S5. Matriz de correlação dos escores dos componentes principais e valores de significância para cada ramo com ao menos quatro descendentes. O triângulo de baixo representa as correlações, enquanto o triângulo superior os valores de significância, em que as que superam valores corrigidos por Bonferroni estão em negrito.....	90
Table S6. Vetores de resposta à seleção e gradientes de seleção inferidas para <i>A.obliqua</i> e <i>A. fraterculus</i> emergidas de hospedeiros distintos. hospedeiro em duas espécies polifágas.....	91
Table S7. Regressão linear para os três hospedeiros de cada espécie. Ao = <i>Anastrepha obliqua</i> . Af = <i>Anastrepha fraterculus</i> sp2.D.L. = Distância Linear, H= Hospedeiro, y=intercept, E = Estimate, P= P-value.....	92

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	1
1.1.INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.2. Modelos de estudo.....	7
1.2.1. Stalk-eyed fly	7
1.2.2. <i>Anastrepha</i>	10
1.3. Objetivo Geral	13
1.3. Objetivos Específicos.....	13
1.4. Referências.....	14
CAPÍTULO II.....	22
Forensic quantitative genetic analysis reveals unintended index selection as the cause of wing-shape evolution induced by artificial selection on eye-span in a stalk-eyed fly.....	22
2.1.INTRODUCTION.....	23
2.2. MATERIAL AND METHODS.....	25
2.2.1.Population studied and breeding design.....	25
2.2.1.2.Population.....	25
2.2.2.Artificial Selection.....	26
2.2.3.Trait measurement.....	26
2.2.4.Breeding Design.....	27
2.2.5.Statistical analyses.....	27

2.2.6.Resource Manipulation.....	28
2.3. RESULTS.....	29
2.4. DISCUSSION.....	31
2.5. REFERENCES.....	46
CAPÍTULO III.....	51
Evidência de plasticidade fenotípica em caracteres morfológicos de espécies do grupo <i>Anastrepha fraterculus</i>.....	51
3.1. INTRODUÇÃO	52
3.2. MATERIAL AND METHODS.....	58
3.2.1.Dados para análise do sinal filogenético da forma e medidas lineares	58
3.2.2.Dados para avaliar a plasticidade.....	59
3.2.3.Análise Estatística.....	60
3.2.4.Métodos Comparativos Filogenéticos.....	60
3.2.5.Análises de plasticidade.....	63
3.3. RESULTADOS.....	65
3.3.1.Métodos Comparativos Filogenéticos.....	65
3.3.2.Plasticidade.....	67
3.4. DISCUSSÃO.....	70
3.5. REFERÊNCIAS.....	93
4.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101

CAPÍTULO I

1.1.INTRODUÇÃO GERAL

A compreensão da evolução fenotípica engloba diversos campos de estudo. A biologia evolutiva, dentre estas áreas, quantifica e investiga mudanças bem como prediz mecanismos direcionadores da mudança morfológica ao longo do tempo (Nosil et al., 2018), identificando as causas e implicações da divergência adaptativa, principalmente pela predição da capacidade das espécies de responder à pressões ambientais (Houle, 1992; Dai, 2016). Tal predição é capacitada por ferramentas da genética quantitativa, que contempla o estudo de características complexas (Falconer e Mackay, 1996). Chamamos de caracteres complexos os resultantes de uma rede intrincada de fatores e interações, tais como entre diferentes genes e seus produtos em um contexto ambiental (bióticos e abióticos), influenciando no desenvolvimento e criando associações que determinam a resposta fenotípica à seleção (Wolf, 2002).

Portanto, variáveis ambientais sejam elas biológicas, tais como predadores, competição por parceiros ou ainda escolha de parceiros, ou abiótica, como temperatura ou fotossensibilidade, afetam o desenvolvimento, comportamento, distribuição espacial e abundância de indivíduos na natureza. Ainda, estas variáveis podem ser recursos que impactam diretamente a sobrevivência e reprodução, quer seja ao afetar como fenótipos são produzidos e expressos em ambientes diferentes, ou como há a alocação de energia em fenótipos distintos, já que pode haver um mecanismo de balanço energético em virtude de um resposta fenotípica a fontes escassas de recursos (Garland e Kelly, 2006; Fusco e Minelli, 2010).

A predição de matrizes de variância / covariância permite reconhecer mudanças no padrão de covariância e pode determinar como uma população responde à seleção, padrão diretamente relacionado à variância genética das características. Esta predição fornece indícios da dinâmica evolutiva sob condições controladas (Scheiner, 2002; Lande, 1982). Lande (1979) revolucionou matematicamente esta análise com modelos parameterizados por medidas de tamanhos populacionais e de gradientes de seleção, os quais permitem indicar diferenças quantitativas fenotípicas pela medida da similaridade entre indivíduos parentais e sua prole. Ainda, Lande demonstrou que equações da genética quantitativa podem ser expandidas e aplicadas para além do melhoramento animal e vegetal, impulsionando a aplicação de parâmetros genéticos, tal como a herdabilidade e correlações genéticas, na evolução de caracteres complexos (Roff, 2003).

Consequentemente, entender a direção da seleção e da mudança fenotípica em caracteres complexos em populações naturais permite reconhecer as respostas diretas ou indiretas a efeitos ambientais (Ercit, 2016). Na maioria das vezes, contudo, a seleção afeta diversos caracteres, não apenas por agir diretamente em um padrão multicaracterístico, mas também porque pode haver correlação entre diversos caracteres, de forma que a seleção afeta diferentes caracteres por haver covariância entre eles. Tal correlação entre caracteres pode ser inclusive devido à correlação não-esperada (não-predita) entre características promovida por pleiotropia ou mesmo desequilíbrio de ligação promovendo efeitos não-intencional sob caracteres que não são o alvo direto da seleção (Lande e Arnold, 1983). Particularmente, a seleção pode impactar a variação fenotípica de forma que as mudanças podem ocorrer como uma resposta correlacionada devido à associação dos caracteres (Lande, 2009).

Considerando-se o papel central da correlação genética entre caracteres na resposta à pressões de seleção, a decomposição da força de seleção, seja ela natural, sexual, ou mesmo artificial, dentro de uma abordagem multivariada pode discriminar os efeitos da heterogeneidade ambiental (Careau *et al.*, 2010; Pélabon, 2014), já que a manipulação do ambiente ou variação natural nas condições ambientais está associada à força variável da seleção (Hayward *et al.*, 2017) e permitir entender as forças subjacentes determinantes da diferenciação morfológica.

Vários trabalhos mostram que o padrão de variância e covariância pode mudar ao longo do tempo e em condições ambientais distintas, seja em laboratório e/ou em populações naturais (Hoffmann e Merila, 1999; Charmantier e Garant, 2005; Wood e Brodie, 2015; Rowinski e Rogell, 2017; Hayward *et al.*, 2017). Assim, a quantificação da covariância entre caracteres e da seleção sob certas condições ambientais pode refletir se a mudança evolutiva pode ter sido reprimida ou facilitada pela existência ou não de covariância genética entre caracteres que estejam ou não sob seleção (Wood e Brodie, 2016).

Alguns autores sugerem que a interação genótipo-ambiente pode mobilizar variação herdável em um ambiente novo moldando a forma da resposta da seleção diante da novidade ambiental (Price *et al.*, 2003; Hermisson e Wagner, 2004). Sob essa premissa, a predição da variação por modelos lineares mistos é essencial para permitir a compreensão da dinâmica da mudança evolutiva por particionar o efeito aditivo do ambiental (Hadfield, 2012).

Assim, para entender a evolução de múltiplos caracteres contínuos e o efeito do processo evolutivo sobre os mesmos, é necessário compreender a relação entre os caracteres, descrita na equação multivariada de resposta à seleção (“breeding equation”) (Lande, 1979):

$$\Delta z = G.\beta,$$

em que Δz é o vetor das respostas evolutivas que representa a diferença entre as médias das gerações antes e depois da seleção, β é o vetor do gradiente de seleção e G representa a variação genética aditiva, que é crucial para explicar a mudança evolutiva (Roff, 2002). Como mencionado acima para caracteres quantitativos, a estrutura multivariada pode ser descrita em matrizes G de variância / covariância, na qual as variâncias dos caracteres são dispostas na diagonal e os demais elementos representam índices de correlação e covariância genética par-a-par dos caracteres na população em estudo. As correlações genéticas geradas são também consequência de desequilíbrio de ligação e/ou pleiotropia, sendo esta última geralmente a mais importante na evolução de caracteres complexos (Roff, 2012).

Rearranjando a equação de Lande, é possível mensurar a seleção atuante com base na estrutura de covariância: $\beta = G^{-1} (z_i - z_j)$, sendo que $(z_i - z_j)$ corresponde à diferença nos vetores de médias entre as respostas das espécies antes e depois da seleção, respectivamente, i e j , ou seja, a resposta à seleção diferencial Δz . Esta equação permite a distinção entre o diferencial adicionando o efeito da covariância entre os caracteres (Lande e Arnold 1983).

Em suma, a capacidade de inferência do nível de variação genética, determinado pela matriz de variância / covariância genética aditiva (G) (Draghi e Whitlock, 2012), permite a determinação do potencial evolutivo das populações. Muitos estudos que abordaram a importância destes parâmetros ao longo dos anos (Lande 1979; Lande e Arnold 1983, Arnold e Wade 1984a, b; Careau, 2010; Aguirre et al., 2014), ajudam a elucidar a medida da força e o padrão multivariado de caracteres complexos na natureza ou em condições artificiais (Kingsolver et al. 2001; Kingsolver e Pfennig 2004). Em geral, estes trabalhos têm indicado que a matriz G é relativamente constante (Brodie, 1992), mas pode mudar ao longo do tempo pela atuação de forças evolutivas, tais como a seleção correlacional (Jones et al. 2003, 2004),

deriva (Lande 1980; Phillips et al. 2001), fluxo gênico (Guillaume e Whitlock 2007), mutação (Jones et al. 2007), e recombinação (desequilíbrio de ligação).

No entanto, considerando-se a dificuldade de se estimar matrizes G (genéticas), que geralmente demanda um grande número de famílias para produzir estimativas com alto grau de confiança, foi proposto que a matriz P (fenotípica) pode ser adotada diante da “Conjectura de Cheverud” (Cheverud, 1988), uma vez que P e G em geral são altamente similares e correspondentes porque estão sob a mesma dinâmica de desenvolvimento propiciada por seleção estabilizadora. Assim, a matriz P pode ser utilizada como substituta da matriz G em estudos evolutivos (Roff, 1995). Muitos trabalhos têm comprovado que matrizes de variância/covariância fenotípicas e genotípicas são similares, principalmente em caracteres morfológicos mensurados em muitos organismos (Cheverud, 1988, 1995, 1996; Roff 1995, 1996; Stepan 1997, 2012; Waitt e Levin 1998; Arnold e Phillips 1999; Marroig e Cheverud 2001; Dochtermann, 2011; Roff e Fairbairn, 2011; Garcia et al., 2014). Portanto, a comparação de matrizes fenotípicas inter e intra táxons, na falta de uma matriz G, pode ser suficiente para se entender a diversificação desses grupos (Cheverud e Marroig, 2007; Porto et al., 2009).

A existência de correlação genética entre caracteres pode criar restrições ao processo evolutivo, e a resposta a tal processo tende a mudar as matrizes na direção da maior proporção de variação (Blows e Walsh 2009). Schluter (1996) descreve o primeiro componente principal da matriz genética V/CV (G_{max}) ou seu equivalente fenotípico (P_{max}), que são o primeiro componente principal da matriz genética- G (G_{max}) ou da matriz P como “linhas de menor resistência evolutiva” (LLER – *Lines of Least Evolutionary Resistance*), que representariam a direção em que a diversificação das linhagens amostradas teria maior

facilidade em ocorrer. Este vetor seria o maior no espaço da variação disponível para uma mudança evolutiva por seleção natural ou deriva genética que pode ou não ser acompanhado por estas forças (Arnold et al., 2001; Marroig e Cheverud, 2005). O alinhamento entre os eixos de máxima variação genética e os gradientes de seleção pode estabelecer se a população responderá com maior ou menor grau de dificuldade na direção da seleção (Marroig e Cheverud, 2005).

A seleção natural pode ter um papel fundamental na evolução fenotípica contribuindo para a adaptação, portanto investigar padrões evolutivos resultantes de variação genética permanente ou de seleção sob uma população reflete a importância destes estudos (Lande e Arnold, 1983). Portanto, uma abordagem multivariada usando modelos lineares gerais é relevante para entender a evolução fenotípica multidimensional ao longo do tempo. A estratégia de captura da variação deve contemplar estruturas que revelem os processos que afetaram o desenvolvimento e repercutiram nos aspectos funcionais do indivíduo adulto (Roff, 2009; Klingenberg, 2010). As abordagens multivariadas, seja por morfometria geométrica, que mostra um poder potencial de detecção das diferenças da forma (Collyer et al., 2015), ou medidas diretas dos caracteres complexos por distância euclidiana, podem descrever objetivamente a magnitude da seleção sobre os caracteres (Lande, 1982; Lande, 2009).

Muitos trabalhos em insetos já utilizaram abordagens da genética quantitativa para decompor efeitos da seleção. Foi observado que grilos da espécie *Grillus firmus* apresentaram uma correlação entre alocação e aquisição de recursos, e que a plasticidade (o mesmo genótipo expressando fenótipos distintos em ambientes distintos) associada à variância da aquisição de recursos determina mecanismos energéticos de alocação como trade-offs entre componentes do valor adaptativo (Robinson e Beckerman 2013). Em um experimento com

borboletas das espécie *Bicyclus anynana*, a seleção artificial foi aplicada para forma do olho nas asas anteriores e posteriores, as quais primariamente foram correlacionadas e responderam à seleção na mesma direção, no entanto ao longo das gerações progressivamente as borboletas apresentaram distintos fenótipos e apresentaram respostas divergentes à seleção (Beldade et al., 2002). Em *Drosophila melanogaster*, a aplicação de seleção artificial durante 26 gerações para mudar a escala alométrica mostrou a potencial manutenção dos padrões de covariância por ligações pleiotrópicas ocasionando seleção não intencional em caracteres não-alvos, sugerindo que a escala do tamanho nas asas pode ser li interna mitada por seleção em outras estruturas (Bolstad et al., 2015). Como correlações entre os caracteres podem determinar padrões diferentes de seleção, buscamos avaliar neste trabalho, como a resposta à padrões distintos de seleção, artificial ou natural, afeta caracteres alvo e não-alvo dessa seleção, estimando as matrizes de Variância/Covariância e vetores de seleção e resposta evolutiva para compreensão da mudança fenotípica em dois modelos de insetos sujeitos a padrões distintos de seleção e correlação fenotípica.

1.2. Modelos de Estudo

1.2.1. *Stalk-eyed Fly*

As moscas de olhos pedunculados (“*Stalk-eyed flies*”) da família Diopsidae são originalmente encontradas no sudeste da Ásia e apresentam tanto espécies com e sem dimorfismo sexual, sendo que nessas últimas, tal dimorfismo sexual é devido à seleção intra e intersexual sobre o tamanho do pedúnculo ocular, constituindo um excelente modelo para estudo de seleção sexual (Burkhardt & de la Motte, 1985) (Figura 1).

Moscas da espécie *Teleopsis dalmanni* (inicialmente denominada como *Cyrtodiopsis dalmanni* (Meier e Baker 2002) são originadas da região da Malásia e apresentam grande dimorfismo sexual, que consiste em olhos posicionados lateralmente em pedúnculos

separados por uma grande haste longe da cabeça, de forma que o tamanho do pedúnculo ocular pode chegar a exceder o tamanho do corpo (Shillito 1971; Burkhardt & de la Motte, 1985; Burkhardt & de la Motte, 1988)(Figura 1). Nessa espécie, em geral, fêmeas se agrupam em plantas radiculares, enquanto machos competem por estas aglomerações e as fêmeas escolhem machos com pedúnculos maiores (Burkhardt & de la Motte, 1985; Wilkinson & Dodson, 1997; Cotton, 2004a).

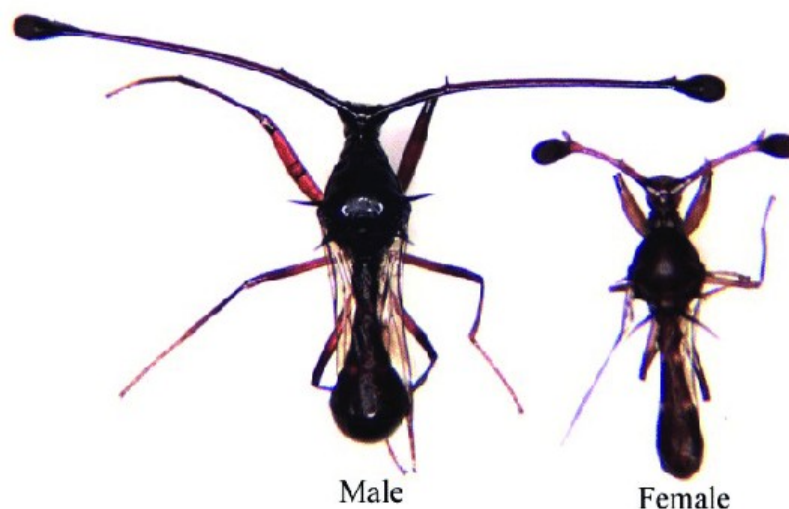


Figura 1. Dimorfismo sexual em moscas de olhos pedunculados da espécie *Teleopsis dalmanni* (Foto: Jerry Husak).

Em função da escolha sexual de fêmeas e das batalhas territoriais entre machos, a seleção sexual pode exercer efeito para pedúnculos oculares maiores (“stalks”) em detrimento para outros caracteres (Panhuis & Wilkinson, 1999). Principalmente, o crescimento exagerado dos olhos exige maior custo energético, podendo impactar na produção de estruturas, na morfologia das asas, na performance do vôo, posteriormente no desempenho de luta por ambos estarem relacionado à manobrabilidade que a forma da asa exerce (Ribak et

al. 2009). Consequentemente, a seleção sexual pode fazer com que certos caracteres altamente custosos sejam preferencialmente selecionados pelo sexo oposto, o que pode fomentar a evolução de caracteres que afetam o equilíbrio energético diante de um estresse nutricional, o que pode ter um papel fundamental para manter caracteres sexualmente selecionados e dispendiosos, reduzindo o investimento nas demais estruturas, como em um trade-off (Wilkinson & Reillo, 1994; Ribak et al.2009).

Trade-offs tem sido bem documentados como mecanismo indireto de balanceamento dos custos para produzir e manter estruturas exageradas. Particularmente em casos de intensa seleção sexual, caracteres alvo e não-alvo da seleção podem apresentar correlação negativa que resultam em mudanças fenotípicas inversas pelo investimento diferencial de energia nesses caracteres (Emlen, 2001; Oufiero & Garland, 2007).

Por outro lado, em moscas de olhos pedunculados, os machos também podem compensar as desvantagens biomecânicas de seus pedúnculos oculares alongados com proporcional aumento de outras estruturas corporais, como musculatura de vôo, tórax e asa (Swallow, Wilkinson & Marden 2000; Ribak & Swallow 2007). Por mecanismos de compensação que podem ser selecionados pela correlação entre estruturas, asas e olhos podem evoluir de forma orquestrada, tanto apresentando correlação positiva, quanto negativa (Husak et al. 2011). Apesar do potencial dessa evolução em caracteres não selecionados, poucos trabalhos abordaram diretamente o grau de interdependência dos caracteres selecionados, como o pedúnculo ocular, e outros caracteres, uma vez que o primeiro é sexualmente selecionável e pode impactar não intencionalmente outras estruturas corpóreas (Swallow, Wilkinson e Marden, 2000; Husak e Swallow, 2011). Nesse trabalho, buscamos avaliar se o padrão de correlação entre os caracteres alvo e não-alvo da seleção artificial afetou a resposta à seleção, levando a uma resposta correlacionada, e se tal resposta foi

condicionada por um mecanismo de balanço energético de compensação (correlação positiva, crescimento proporcional) ou um trade-off (correlação negativa, crescimento em direções opostas) com investimento energético inversamente proporcional.

1.2.2. *Anastrepha*

O gênero de moscas-das-frutas *Anastrepha* (Shiner) é o mais comum Tephritidae na América dos Sul e com maior número de espécies de região tropical, com mais de 300 espécies, que utilizam um amplo espectro de espécies de plantas, inclusive diversas de importância econômica (Aluja, 1994; Norrbom et al., 1999).

Muitos estudos associam o potencial efeito ecológico das plantas hospedeiras em insetos aos quais estão associadas, por considerar sua relevância em seu desenvolvimento (Nel et al., 2018). Esta associação é particularmente importante em moscas-das-frutas da família Tephritidae que tanto apresentam espécies com associação específica a diversas plantas hospedeiras, como também apresentam outras espécies mais generalistas que são inclusive consideradas pragas agrícolas ocupando uma ampla variedade de frutas e culturas vegetais (Norrbom et al., 1999a, 1999b, 2015; Norrbom, 2004a; Norrbom e Korytkowski, 2009, 2011, 2012), que estão principalmente nos gêneros *Rhagoletis*, *Ceratitis*, *Bactrocera*, e *Anastrepha* (Gómez-Cendra, 2016).

O gênero *Anastrepha* é dividido em 21 grupos baseados principalmente em caracteres morfológicos (Norrbom e Korytkowski, 2009; Norrbom et al., 2012). Um recente trabalho analisou 146 espécies do gênero *Anastrepha*, que representam 19 dos 21 grupos, para investigar as relações filogenéticas de *Toxotrypanini*, incluindo *Anastrepha*, *Toxotrypana* e *Hexachaeta*, utilizando três marcadores mitocondriais (16S, CAD e COI) e três nucleares (EF1a, PER e PGD) e encontrou que o o gênero *Toxotrypana* seria monofiléticos, embora o gênero *Anastrepha* foi encontrado como parafilético, uma vez que *Toxotrypana* está inserido

no meio desse gênero (com alto suporte) (Mengual et al., 2017), o que levou à proposta recente de sinonimização desses gêneros, mantendo *Anastrepha* como um gênero e *Toxotrypana* tornando-se mais um grupo dentro desse gênero (Norrbom, et al., 2018). Apesar do grande número de espécies investigadas e do número de marcadores moleculares, diversas relações entre grupos ainda ficaram não resolvidas, mas foi possível dar suporte à relação entre os grupos *daciformis*, *dentata*, *leptozona*, *raveni* e *striata*. Já o grupo *serpentina* foi reconhecido com menor suporte, e os grupos *fraterculus* e *pseudoparallela* tiveram também suporte, com pequenas alterações. O grande clado que compreende os grupos *pseudoparallela*, *spatula*, *ramosa*, *doryphoros*, *grandis*, *serpentina*, *striata*, *fraterculus* foi recuperado, mas sem forte suporte estatístico. Embora as 20 espécies estudadas do grupo *fraterculus* tenham revelado o mesmo como monofilético, há ainda pouco suporte tanto para as relações de parentesco entre as diferentes espécies do grupo, que abrange as espécies de maior importância econômica, bem como para as relações entre diferentes grupos de espécie (Mengual et al., 2017).

Dada a importância econômica desse gênero, em especial de espécies do grupo *fraterculus*, muitos estudos já abordaram diversos aspectos genéticos e morfológicos (Bomfim et al, 2011; Hernández-Ortiz et al., 2015; Oroño et al., 2013; Perre et al., 2014), mas muitas espécies permanecem desconhecidas. Estes estudos em geral tem revelado alguns marcadores morfológicos que tem sido considerados úteis tanto para a identificação de grupos no gênero, como também para a diferenciação de espécies mais proximamente relacionadas. Em sua grande maioria, a identificação das espécies é primariamente feita considerando-se o acúleo da fêmea, o tamanho do corpo e o padrão da asas (Stone, 1942), caracteres complexos que provavelmente têm herança multifatorial (Figura 2). Muito embora vários estudos tenham abordado diferentes aspectos morfológicos (Bomfim et al., 2011;

Hernández-Ortiz et al., 2015; Oroño et al., 2013), poucos consideraram avaliar se os padrões morfológicos refletem a estrutura filogenética e como tais implicações tem repercussão na diferenciação associada à diversas características ecológicas importantes, como a exploração de hospedeiros e a escolha de parceiros durante a cópula. Esta última pode contemplar aspectos visuais, acústicos e químicos, que relacionados ao comportamento de lek apresentado por fêmeas na escolha de parceiros favorecem a existência de seleção sexual (Bachmann et al. 2015; Segura et al. 2018).

Embora diversos estudos tenham investigado padrões de diversidade de caracteres fenotípicos em moscas-das-frutas, particularmente do grupo *fraterculus*, este estudos não consideraram uma investigação multivariada da adequação dos caracteres morfológicos geralmetne usados na identificação de espécies nesse grupo e no gênero, e que podem ser alvos de seleção, natural ou sexual. Como esses caracteres podem estar sujeitos à influência de diferentes estímulos ambientais, como por exemplo os diferentes hospedeiros, podem apresentar diferentes níveis de plasticidade fenotípica, o que pode afetar a adequação do uso de tais caracteres na taxonomia, o que foi aqui investigado.

Portanto, neste trabalho buscamos estimar a robustez de diferentes caracteres morfológicos, tanto caracteres comumente considerados para a identificação de espécies de *Anastrepha*, e em especial do grupo *fraterculus*, quanto outros caracteres sujeitos a pressões diferentes de seleção, usando estratégias de genética quantitativa filogenética comparativa que nos permite prever o sinal filogenético e se a taxa de evolução dos caracteres mudou randomicamente (deriva) ou foi direcionada por seleção (Marroig and Cheverud, 2004; Adams 2013). Exploramos ainda como o efeito de diferentes hospedeiros afeta a plasticidade fenotípica e resposta à seleção em duas espécies do grupo *fraterculus*, usando uma

abordagem multivariada para prever as matrizes de Variância/ Covariância determinantes para prever a associação entre os caracteres e como respondem à seleção.



Figura 2. Dimorfismo sexual da espécie *Anastrepha obliqua* (West Indian Fruit Fly). Foto: Bureau of Plant Pest Surveillance and Pest Risk Analysis.

1.3. Objetivo Geral

A evolução morfológica em insetos está sujeita a pressões seletivas biológicas e ambientais de forma direta ou indireta e nesse trabalho buscamos investigar como diferentes caracteres respondem tanto a pressões de seleção artificial no laboratório em moscas de olhos pedunculados, quanto identificar potenciais forças que influenciaram a evolução de caracteres potencialmente importantes tanto para identificação de espécies, quanto para forças como a seleção sexual em moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*.

1.3.1. Objetivos específicos por capítulos:

Capítulo II

1. Estimar matrizes de variância e covariância genética para um *design* familiar.

2. Particionar a magnitude da seleção e a resposta à seleção para os caracteres morfológicos de interesse, para prever o efeito da seleção em caracteres não-alvo.
3. Investigar possíveis mecanismos relacionados ao contingenciamento energético após a manipulação de recursos.

Capítulo III

1. Investigar se os caracteres morfológicos de interesse (forma e distância) contêm sinal que possa indicar estruturação filogenética que poderia influenciar as análises comparativas.
2. Investigar os padrões evolutivos utilizando uma abordagem de filomorfoespaço.
3. Extrair a variação intraespecífica para avaliar a magnitude da disparidade morfológica entre as espécies.
4. Investigar se a divergência das espécies ocorreu seguindo um modelo estocástico, ou direcionada por seleção, a partir da matriz ancestral reconstruída pelas matrizes das espécies atuais ponderada pela árvore.
5. Prever plasticidade fenotípica para duas espécies do grupo *fraterculus* emergentes de hospedeiros distintos.
6. Particionar a magnitude da seleção e a resposta à seleção para os caracteres morfológicos de interesse provenientes das espécies do grupo *fraterculus* emergentes de hospedeiros distintos.
7. Prever o alinhamento entre os vetores para explorar se a diversificação morfológica seguiu a linha de menor resistência ou ação da seleção associada a plasticidade.

1.4.REFERÊNCIAS

- Aguirre, J. D., E. Hine, K. McGuigan, and M.W. Blows. 2014. Comparing G: multivariate analysis of genetic variation in multiple populations. *Heredity* 112:21–29.
- Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Neotrop. Entomol.* 39: 155–178.

- Arnold, S. J., Pfrender, M. E., & Jones, A. G. 2001. The adaptive landscape as a conceptual bridge between micro- and macro- evolution. *Genetica*, 112, 9–32. doi:10.1023/A:1013373907708.
- Arnold SJ, Phillips PC, 1999. Hierarchical comparison of genetic variance- covariance matrices. II. Coastal-inland divergence in the garter snake, *Thamnophis elegans*. *Evolution* 53:1516–1527.
- Arnold, S. J., and M. J. Wade. 1984a. On the measurement of natural and sexual selection: theory. *Evolution* 38: 709-719.
- Arnold, S. J., and M. J. Wade. 1984b. On the measurement of natural and sexual selection: Applications. *Evolution* 38:720- 734.
- Bachmann, G. E., Segura, D. F., Devescovi, F., & Juárez, M. L. 2015. Male Sexual Behavior and Pheromone Emission Is Enhanced by Exposure to Guava Fruit Volatiles in *Anastrepha fraterculus*, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124250>.
- Beldade P, Koops K, Brakefield PM. 2002. Modularity, individuality, and evo-devo in butterfly wings. *PNAS* 99(22):14262–67.
- Berlocher SH. 2000. Radiation and divergence in the *Rhagoletis pomonella* species group: inferences from allo- zymes. *Evolution* 54: 543–557.
- Blows, M. W. and Walsh, B. 2009. Spherical cows grazing in flatland: Constraints to selection and adaptation. In J. van der Werf, H. Graser, F. Frankham, and C. Gondro, eds. *Adaptation and Fitness in Animal Populations*, pp. 83–101.
- Bolstad GH, Cassara JA, Márquez E, Hansen TF, van der Linde K, et al. 2015. Complex constraints on allometry revealed by artificial selection on the wing of *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 112(43):13284–89.
- Bomfim, Z. V, Lima, K. M., Silva, J. G., Costa, M. a, & Zucchi, R. A. (2011). A morphometric and molecular study of *Anastrepha pickeli* Lima (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology*, 40(5), 587–594.
- Brodie, E.D.I. 1992. Correlational selection for color pattern and antipredator behavior in the garter snake, *Thamnophis ordinoides*. *Evolution* 46: 1284–1298.
- Burkhardt, D. & de la Motte, I. 1985 Selective pressures, variability, and sexual dimorphism in stalk-eyed flies (Diopsidae). *Naturwissenschaften* 72, 204-206.
- Burkhardt, D. & de la Motte, I. 1988. Big 'antlers' are favoured: female choice in stalk-eyed flies (Diptera, Insecta), field collected harems and laboratory experiments. *J. comp. Physiol. A* 162, 649-652.
- Cáceres C, Segura DF, Vera MT, Wornoayporn V, Cladera JL, Teal P, Sapountzis P, Bourtzis P, Zacharopoulou A, Robinson AS (2009) Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera; Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. *Biological Journal of Linnean Society* 97: 152–165. doi: 10.1111/j.1095-8312.2008.01193.x
- Careau, V., Réale, D., Humphries, M. M., & Thomas, D. W. 2010. The Pace of Life under Artificial Selection: Personality, Energy Expenditure, and Longevity Are Correlated in

- Domestic Dogs. *The American Naturalist*, 175(6), 753–758. <https://doi.org/10.1086/652435>.
- Charmantier A, Garant D. 2005. Environmental quality and evolutionary potential: lessons from wild populations. *Proc Roy Soc B* 272: 1415–1425.
- Cheverud, J. M. 1988. A comparison of genetic and phenotypic correlations. *Evolution* 42:958–968.
- Cheverud J.M. 1995. Morphological integration in the saddle-back tamarin (*Saguinus fuscicollis*) cranium. *Am. Nat.* 145:63–89.
- Cheverud, J. 1996. Developmental integration and the evolution of pleiotropy. *Am. Zool.* 36:44–50.
- Cheverud, J. M., and G. Marroig. 2007. Comparing covariance matrices: Random skewers method compared to the common principal components model. *Genet. Mol. Biol.* 30:461–469.
- Clarke, A. R., K. F. Armstrong, A. E. Carmichael, J. R. Milne, S. Raghu, G. K. Roderick, and D. K. Yeates. 2005. Invasive phytophagous pests arising through recent tropical evolutionary radiation: The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 293–319.
- Collyer, M. L., D. J. Sekora, and D. C. Adams. 2015. A method for analysis of phenotypic change for phenotypes described by high-dimensional data. *Heredity* 115: 357–365.
- Cotton, S, Fowler, K& Pomiankowski,A. 2004a. Do sexual ornaments demonstrate heightened condition-dependent expression as predicted by the handicap hypothesis? 271,771–783. (<https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2688>).
- Dai, Peng et al. “Life-History Trait Plasticity and Its Relationships with Plant Adaptation and Insect Fitness: A Case Study on the Aphid *Sitobion Avenae*.” *Scientific Reports* 6 (2016): n. pag. *Scientific Reports*. Web.
- Dochtermann, N.A. 2011. Testing Cheverud’s Conjecture for Behavioral Correlations and Behavioral Syndromes. *Evolution* 65: 1814–1820.
- Draghi, J. A. and Whitlock, M. C. 2012. Phenotypic plasticity facilitates mutational variance, genetic variance, and evolvability along the major axis of environmental variation. *Evolution*, 66(9):2891–2902.
- Emlen, D. 2001. Costs and the diversification of exaggerated animal structures. *Science* 291:1534–1536.
- Ercit, K. 2016. Temporal variation in selection on male and female traits in wild tree crickets. *Ecology and Evolution*, 6(15), 5118–5128. <https://doi.org/10.1002/ece3.2105>
- Falconer, D. S., and Mackay, T. F. C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. Longmans Green, Harlow, Essex, UK.
- Fusco, G.;Minelli, A. 2010. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 365, 547–556 (2010).

- Garcia, G., Hingst-Zaher, E., Cerqueira, R.;Marroig, G. 2014. Quantitative Genetics and 576 Modularity in Cranial and Mandibular Morphology of *Calomys expulsus*. *Evolutionary Biology* 577 41: 619–636.
- Garland Jr, T. & Kelly, S. A. 2006 Phenotypic plasticity and experimental evolution. *J. Exp. Biol.* 209, 2344–2361. (doi:10.1242/jeb.02244)
- Gómez-Cendra, P. V., Paulin, L. E., Oronõ, L., Ovruski, S. M., & Vilardi, J. C. 2016. Morphometric differentiation among *anastrepha fraterculus* (diptera: Tephritidae) exploiting sympatric alternate hosts. *Environmental Entomology*, 45(2), 508–517. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv224>.
- Guillaume, F. and M. C. Whitlock 2007. Effects of migration on the genetic covariance matrix. *Evolution* 61:2398–2409.
- Hadfield JD. 2012 The quantitative genetic theory of parental effects. In *The evolution of parental care* (eds Royle NJ, Smiseth PT, Kölliker M), pp. 267–284. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Hayward, A. D., Pemberton, J. M., Berenos, C., Wilson, A. J., Pilkington, J. G., & Kruuk, L. E. B. (2018). Evidence for selection-by-environment but not genotype-by-environment interactions for fitness-related traits in a wild mammal population. *Genetics*, 208(1), 349–364. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300498>.
- Hermisson, J. & Wagner, G.P. 2004. The population genetic theory of hidden variation and genetic robustness. *Genetics* 168: 2271–2284.
- Hernández-Ortiz V, Canal NA, Tigrero Salas JO, Ruíz-Hurtado FM, Azul-Cauich, J.F.2015. Taxonomy and phenotypic relationships of the *Anastrepha fraterculus* complex in the Mesoamerican and Pacific Neotropical dominions (Diptera, Tephritidae). In: De Meyer M, Clarke AR, Vera MT, Hendrichs J (Eds) *Resolution of Cryptic Species Complexes of Tephritid Pests to Enhance SIT Application and Facilitate International Trade*. *ZooKeys* 540: 95-124. <https://doi.org/10.3897/zookeys.540.6027>
- Hoffmann, A.A. & Merila, J. 1999. Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Trends Ecol. Evol.* 14: 96–101.
- Houle, D. 1992. Comparing evolvability and variability of quantitative traits. *Genetics* 130: 195–204.
- Husak, J. F., and J. G. Swallow. 2011. Compensatory traits and the evolution of male ornaments. *Behaviour* 148:1–29.
- Jones, A.G., Arnold. S.J., Bürger, R. 2003. Stability of the G-matrix in a population experiencing pleiotropic mutation, stabilizing selection, and genetic drift. *Evolution* 57(8): 1747–1760.
- Jones AG, Arnold SJ, Bürger R. 2004. Evolution and stability of the G-matrix on a landscape with a moving optimum. *Evolution* 58(8):1639–1654.
- Jones, A., S. Arnold, e R. Burguer. 2007. The mutation matrix and the evolution of evolvability. *Evolution*, 61:727-745.

- Kingsolver JG, Hoekstra HE, Hoekstra JM, Berrigan D, Vignieri SN, et al. 2001. The strength of phenotypic selection in natural populations. *Am. Nat.* 157(3):245–61.
- Kingsolver, J.G. & Pfennig, D.W. 2004. Individual-level selection as a cause of Cope's rule of phyletic size increase. *Evolution* 58: 1608–1612.
- Klingenberg, C. P., Debat, V., & Roff, D. A. 2010. Quantitative genetics of shape in cricket wings: Developmental integration in a functional structure. *Evolution*, 64, 2935–2951. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01030.x>
- Lande, R. 1979. Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain: Body size allometry. *Evolution*, 33, 402–412. <https://doi.org/10.2307/2407630>.
- Lande, R. 1980. Sexual dimorphism, sexual selection, and adaptation in polygenic characters. *Evolution* 33, 292–305.
- Lande, R. 1982. A quantitative genetic theory of life history evolution. *Ecology* 63:607-615.
- Lande, R. 2009. Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(7), 1435–1446. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01754.x>
- Lande, R. & Arnold, S. J. 1983 The Measurement of Selection on Correlated Characters. *Evolution* 37, 1210–1226.
- Marroig, G., and J. M. Cheverud. 2001. A comparison of phenotypic variation and covariation patterns and the role of phylogeny, ecology, and ontogeny during cranial evolution of New World monkeys. *Evolution* 55:2576–2600.
- Marroig, G., and Cheverud, J. M. 2004. Did natural selection or genetic drift produce the cranial diversification of neotropical monkeys? *American Naturalist* 163: 417–428.
- Marroig, G., and Cheverud, J. M. 2005. Size as a line of least evolutionary resistance: Diet and adaptive morphological radiation in new world monkeys. *Evolution* 59: 1128-1142.
- Meier R, Baker R. 2002. A cladistic analysis of Diopsidae (Diptera) based on morphological and DNA sequence data. *Insect Systematics and Evolution* 33: 325–336.
- Mengual, X., Kerr, P., Norrbom, A. L., Barr, N. B., Lewis, M. L., Stapelfeldt, A. M., ... Gaimari, S. (2017). Phylogenetic relationships of the tribe Toxotrypanini (Diptera: Tephritidae) based on molecular characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 113, 84–112. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.05.011>.
- Nel, P., Bertrand, S., & Nel, A. 2018. Diversification of insects since the Devonian: A new approach based on morphological disparity of mouthparts. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21938-1>
- Norrbom, A.L., 2004a. Updates to Biosystematic Database of World Diptera for Tephritidae through 1999. Diptera Data Dissemination Disk (CD-ROM) 2.
- Norrbom, A.L., Carroll, L.E., Thompson, F.C., White, I.M., Freidberg, A., 1999a. Systematic database of names. In: Thompson, F.C. (Ed.), Fruit Fly Expert Identification System and Systematic Information Database. *Myia* (1998) 9, pp. 65–251, + Diptera Data Dissemination Disk (CD-ROM) (1998).

- Norrbom, A.L., Zucchi, R.A., Hernández-Ortiz, V., 1999b. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology. In: Aluja, M., Norrbom, A.L. (Eds.), *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press, Boca Raton, pp. 299–342.
- Norrbom, A.L., Korytkowski, C.A., 2009. A revision of the *Anastrepha robusta* species group (Diptera: Tephritidae). *Zootaxa* 2182, 1–91.
- Norrbom, A. L., and C. A. Korytkowski. 2011. New species of and taxonomic notes on *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *Zootaxa* 2740: 1–23.
- Norrbom, A.L., Korytkowski, C.A., 2012. New species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae), with a key for the species of the megacantha clade. *Zootaxa* 3478, 510–552.
- Norrbom, A.L., Korytkowski, C.A., Zucchi, R.A., Uramoto, K., Venable, G.L., McCormick, J., Dallwitz, M.J., 2012 (onwards). *Anastrepha* and *Toxotrypana*: descriptions, illustrations, and interactive keys. Version: 29 May 2012. <<http://delta-intkey.com/anatox/intro.htm>> (accessed 12.08.16).
- Norrbom, A.L., Rodriguez, E.J., Steck, G.J., Sutton, B.A., Nolzco, N., 2015. New species and host plants of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) primarily from Peru and Bolivia. *Zootaxa* 4041, 1–94. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4041.1.1>.
- Nosil, P., R. Villoutreix, C.F. de Carvalho, T.E. Farkas, V. Soria-Carrasco, J.L. Feder, B.J. Crespi, and Z. Gompert. 2018. Natural selection and the predictability of evolution in *Timema* stick insects. *Science* 359: 765–770.
- Oroño, L. E., Paulin, L. E., Alberti, A. C., Hilal, M., Ovruski, S. M., Vilardi, J. C., ... Aluja, M. 2013. Effect of host plant chemistry on genetic differentiation and reduction of gene flow among *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) populations exploiting sympatric, synchronic hosts. *Environmental Entomology*, 42, 790–798. <https://doi.org/10.1603/EN13020>
- Oufiero, C.E., Garland T. Jr., 2007. Evaluating performance costs of sexually selected traits. *Functional Ecology* 21: 676–689.
- Panhuis T, Wilkinson GS. 1999. Exaggerated male eye-span influences contest outcome in stalk-eyed flies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 46: 221–227.
- Pélabon, C., Firmat, C., Bolstad, G. H., Voje, K. L., Houle, D., Cassara, J., ... Hansen, T. F. 2014. Evolution of morphological allometry. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1320(1), 58–75. <https://doi.org/10.1111/nyas.12470>.
- Perre, P., Jorge, L.R., Lewinsohn, T.M., Zucchi, R.A. 2014 Morphometric differentiation of fruit fly pest species of the *Anastrepha fraterculus* group (Diptera: Tephritidae). *Ann Entomol Soc Am* 107:490–495.
- Phillips, P.C., Whitlock, M.C., Fowler, K. 2001). Inbreeding changes the shape of the genetic covariance matrix in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 158: 1137–1145.
- Porto A, de Oliveira FB, Shirai LT, De Conto V, Marroig G. 2009. The Evolution of Modularity in the Mammalian Skull I: Morphological Integration Patterns and Magnitudes. *Evol Biol* . 36(1):118–35.

- Price, T.D., Qvarnström, A., and Irwin, D. 2003. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 1433–1440. doi: 10.1098/rspb.2003.2372.
- Ribak G, Swallow JG. 2007. Free flight maneuvers of stalk-eyed flies: Do eye-stalks affect aerial turning behavior? *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 193: 1065-1079. doi:10.1007/s00359-007-0259-1. PubMed: 17710410.
- Ribak, G., Pitts, M. L., Wilkinson, G. S., and Swallow, J. G. 2009. Wing shape, wing size, and sexual dimorphism in eye-span in stalk-eyed flies (Diopsidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 98(4), 860–871. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01326.x>
- Robinson, M. R. and A. P. Beckerman. 2013. Quantifying multivariate plasticity: genetic variation in resource acquisition drives plasticity in resource allocation to components of life history. *Ecol. Lett.* 16:281–290.
- Roff, D.A. 1995. The estimation of genetic correlations from phenotypic correlations: a test of Cheverud's conjecture. *Heredity*, 74:481-490.
- Roff D.A. 1996. The evolution of genetic correlations: an analysis of patterns. *Evolution* 50: 1392–1403.
- Roff, D. A. 2002 Comparing G matrices: a MANOVA method. *Evolution* 56: 1286–1291.
- Roff, D. 2003. Evolutionary quantitative genetics: Are we in danger of throwing out the baby with the bathwater? *Annales Zoologici Fennici*, 40(4), 315-320.
- Roff, D. 2009. Modeling experimental evolution using individual-based variance-components models. Pp. 31-63 in T. Garland and M. Rose, eds. *Experimental evolution*. University of California Press, Berkeley.
- Roff, D.A; Fairbairn, D.J. 2011. Path analysis of the genetic integration of traits in the sand cricket: a novel use of BLUPs. *Journal of Evolutionary Biology* p 1–13, DOI 10.1111/j.1420-9101.2011.02315.x.
- Roff DA, Prokkola JM, Krams I, Rantala MJ. 2012. There is more than one way to skin a G matrix: comparing G matrices. *J Evol Biol* 25: 1113–1126.
- Rowiński, P. K., and B. Rogell, 2017 Environmental stress correlates with increases in both genetic and residual variances: A meta-analysis of animal studies. *Evolution* 71: 1339-1351.
- Scheiner, S.M. 2002. Selection experiments and the study of phenotypic plasticity. *J. Evol. Biol.* 15: 889–898.
- Schluter, D. 1996. Adaptive radiation along genetic lines of least resistance. *Evolution* 50:1766–1774.
- Segura, D. F., Belliard, S. A., Vera, M. T., Bachmann, G. E., Ruiz, M. J., Jofre-barud, F., ... Shelly, T. E. (2018). Plant Chemicals and the Sexual Behavior of Male Tephritid Fruit Flies, (July), 1–26. <https://doi.org/10.1093/aesa/say024>.
- Shillito, J. F. 1971. The genera of Diopsidae (Insecta: Diptera). *Zool. J. Linn. Soc.* 50:287–295.

- Steppan, S.J. 1997. Phylogenetic analysis of phenotypic covariance structure. 2. Reconstructing matrix evolution. *Evolution* 51: 587–594.
- Stone, A. 1942. The fruit flies of the genus *Anastrepha*. United States Department of Agriculture Miscellaneous Publications 439: 1–112. doi: 10.1007/978-1-4757-2278-9_2 Sundberg.
- Swallow, J.G., Wilkinson, G.S. & Marden, J.H. (2000) Aerial performance of stalk-eyed flies that differ in eyespan. *Journal of Comparative Physiology B*, 170, 481–487.
- Vera, T., C. Cáceres, V. Wornoayporn, A. Islam, A. S. Robinson, M. H. de la Vega, J. Hendrichs, and J.-P. Cayol. 2006. Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99: 387–397.
- Vera, M. T., Ruiz, M. J., Oviedo, A., Abraham, S., Mendoza, M., Segura, D. F., ... Willink, E. (2013). Fruit compounds affect male sexual success in the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*, 137(SUPPL.1), 2–10. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01516.x>
- Virgilio, M., T. Backeljau, N. Barr, and M. DeMeyer. 2008. Molecular evaluation of nominal species in the *Ceratitis fasciventris*, *C. anonae*, *C. rosa* complex (Diptera: Tephritidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 48: 270–280.
- Watt, D. E., and Levin, D. A. 1998. Genetic and phenotypic correlations in plants: a botanical test of Cheverud's conjecture. *Heredity* 80: 310–319.
- Wilkinson GS, Reillo PR. 1994. Female choice response to artificial selection on an exaggerated male trait in a stalk-eyed fly. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 255: 1–6.
- Wilkinson, G.S. & Dodson, G.N. 1997. Function and evolution of antlers and eye stalks in flies. In: *The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids* (J. Choe & B. Crespi, eds), pp. 310–328. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wolf, J. B. 2002. The geometry of phenotypic evolution in developmental hyperspace *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 15849–15851.
- Wood, C. & Brodie, E.D III. 2015. Environmental effects on the structure of the G-matrix. *Evolution*, 69, 2927–2940.
- Wood, C. W., & Brodie, E. D. III. 2016. Evolutionary response when selection and genetic variation covary across environments. *Ecology Letters*, 19(10), 1189–1200. <https://doi.org/10.1111/ele.12662>.

CAPÍTULO II

Forensic quantitative genetic analysis reveals unintended index selection as the cause of wing-shape evolution induced by artificial selection on eye-span in a stalk-eyed fly

Emanuele C. Gustani-Buss¹, Diogo Melo², Reinaldo A. de Brito¹, W. Edwin Harris³, Nick J. Royle⁴, Gerard S. Wilkinson⁵, Jason B. Wolf⁶

¹Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil.

²Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Sao Paulo, Brazil.

³School of Science and Environment, Manchester Metropolitan University, Manchester, UK.

⁴Centre for Ecology and Conservation, School of Biosciences, University of Exeter, Cornwall Campus, Penryn, UK.

⁵Department of Biology, University of Maryland, College Park, Maryland, USA.

⁶Milner Centre for Evolution and Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, Bath, UK.

2.1. INTRODUCTION

Evolutionary change is inherently multivariate, where combinations of traits together determined the fitness of an organism and jointly change in response to selection. Traits are tied together evolutionarily by shared genetic influences, which reflect processes such as common developmental or physiological pathways (Falconer and Mackay 1996; Lynch and Walsh 1998; Armbruster et al. 2014). In the quantitative genetics framework, these shared genetic influences are captured by the genetic covariance structure of traits, which summarizes how genotypic variation in a population generates a pattern of associations between traits (Turelli and Barton, 1994). Selection on one or more of these traits is then filtered through the genetic covariance structure to produce evolutionary changes in the entire suite of traits. Hence, observed changes in a trait across generations can potentially be attributed to selection acting on that particular trait or on other genetically correlated traits, or possibly both simultaneously (Stillwell et al. 2016).

To understand the causes of evolutionary change we need to be able to separate the influence of directional selection from the influence of genetic covariance structure. This separation can be achieved by applying a framework for measuring selection (Lande and Arnold 1983) and genetic covariance structure, or by controlling the influence of selection by imposing artificial selection (Hine et al. 2011). While both approaches have contributed to our understanding of multivariate evolutionary change, both suffer from a potential shortcoming arising from unmeasured or unintended selection (Scheiner 2002). The presence of such 'hidden' selection could potentially lead to a biased, or worse, a fundamentally incorrect, inference about the evolutionary process (Storz et al. 2015). Studies that identify a correlated response to selection often interpret such a response as evidence for the presence

of a genetic correlation between traits, which could potentially provide evidence for or against a hypothesis such as the presence or lack of trade-offs between traits (Allen et al. 2008; Condon et al. 2015). However, if there is hidden selection directly altering those other traits, then such a conclusion could be incorrect and any interpretation of the result with respect to hypothesis testing would be misleading (Sinervo and Svensson 2002; Garland 2003).

Given the risk of misinterpreting the outcome of an artificial selection experiment, what can be done to address this problem? This question is especially relevant when an unexpected or unexplained response is identified in selection experiment. It is possible that the presence of hidden selection could be identified through the retrospective application of the quantitative genetics framework to test competing hypotheses (Careau et al. 2010). The targeted selection would lead to an evolutionary response in some other trait, a retrospective analysis could estimate the genetic correlation between the two traits to test whether the change in the off-target trait is consistent with a correlated response to selection (Sinervo and Svensson 2002). More generally, the full genetic variance-covariance matrix could be estimated and used to estimate the vector of selection required to generate the observed change across traits. If selection on a secondary trait were suggested by such an analysis, the selection framework could be re-examined for sources of that unintended selection (perhaps due to lab adaptation or some other process)(Chevin and Lande 2015). We refer to this sort of post hoc analysis of quantitative genetic parameters as ‘forensic quantitative genetics’, where different explanations for an observed pattern of evolutionary change are explicitly stated within the framework of multivariate quantitative genetics and these competing hypotheses are evaluated to identify the most parsimonious explanation.

We focus on a case of artificial ‘univariate’ selection that targeted eye-span in the stalk-eyed fly, *Teleopsis dalmanni*. This univariate selection led to a correlated response to selection in the size of wings. Given the pattern of selection, we would assume that this pattern could reflect a functional trade-off, such as might arise from resource allocation. The original selection regime targeted eye-span while holding body size constant. However, despite this targeted selection, it is possible that the attempt to hold size constant inadvertently generated selection on size (by creating a selection index that ended up including size). In this scenario the evolutionary change in wings would merely reflect this unintended source of selection, rather than the presence of a trade-off. To evaluate competing explanation for the observed correlated response to selection we combine estimates of genetic parameters from a controlled breeding design and environmental manipulation of resource availability. This approach allows us to disentangle the influence of intended, unintended selection, and a possible resource trade-off.

2.2. MATERIAL AND METHODS

2.2.1. Population studied and breeding design

2.2.1.2. Population

Original population of Stalk-eyed flies (*T. dalmanni*) were collected near Kuala Lumpur, Malaysia in 1989 and maintained at Wilkinson’s laboratory, University of Maryland, College Park, Maryland, USA. Adults were housed in cubic cages in a room maintained at 25° C, around 75% relative humidity and light/dark regime LD 12:12 h. Adults were fed twice a week on a mixture of pureed corn containing 1% methylparaben (Wilkinson, 1993; Christianson 2005). The population was held for seven generations before starting the first selection experiment, on March 1991 (Wilkinson 1993).

2.2.2. Artificial Selection

Bidirectional eye-span selection was imposed on males each generation. For body size control, the selection was based on the ratio of eye-span to body length. This form of selection aimed to influence ‘relative’ eye-span (Index selection). Selection for larger (denoted as the high, or ‘H’ lines) or smaller (denoted as the low, or ‘L’ lines) relative eye-span in males was performed with two independent replicates in each direction. To control for the scaling of eye-span with body size (i.e., to avoid simply selecting for the largest males), the selection criteria was based on the ratio of eye-span to body length. In each replicate, fifty males were measured each generation and the ten most extreme (largest or smallest relative eye-span, depending on the direction of selection) were kept for breeding. These selected males were housed with 25 randomly selected virgin females in 40 x 40 x 40 cm cages. A control (unselected) line was maintained by combining ten randomly chosen males and 25 females in a similar setting as the selected lines.

2.2.3. Trait measurement

Eye span (ES) was measured from the outer edges of the ommatidia to the nearest 0.01 mm, using image-digitizing microscope from flies anaesthetized with CO₂. Body Length (BL) was the measurement from face to wing tip. RES was calculated as eye-span divided by body length. Wings were separated, placed in a flat position on a glass slide and covered with a coverslip, and subsequently analyzed by a digital image microscope under magnification (x25–35). The landmark configurations (Ldks) for wings were captured using tpsDIG2, with a set of 18 landmarks (Rohlf 2014). The Wing Length (WL) was the distance between Lkds 1 and 16, and Wing Width (WW) between Ldks 4 and 18. The aspect ratio (AR) of the wing was calculated by dividing wing length by wing width; Relative eye-span (RES) was calculated as

eye-span (ES) divided by body length (BL). The traits were scaled to mean zero and standard deviation of one for the analyses described below.

2.2.4. Breeding design

After 20 generations of selection, animals from two of the selection-line replicates (one H and one L line) and the control line were used in controlled breeding experiments to estimate patterns of genetic (co)variation. Male ('sires') were each mated to two or three females ('dams') from the same line, creating a half-sibling family structure (Falconer and Mackay, 1996). This breeding design resulted in the following sample sizes: control line = 76 sires each mated to 2 females that produced 926 offspring, High line = 18 sires each mated to 2 or 3 females to produce 163 total offspring, and Low line = 28 sires each crossed with 2 or 3 females to produce 283 offspring.

2.2.5. Statistical analyses

To evaluate the repeatability for each trait, we measured the error following procedures of Lessels and Boag (1987) using CalcRepeatability in evolqg (Melo et al. 2015). To understand the genetic relationship among the traits, we estimated the genetic variance-covariance (G) matrix using a combination of half-sibling families derived from the Control, H and L lines, which showed a significant high correlation using Random Skewers comparison (RandomSkewers in evolqg). For this, we applied a general linear model with Bayesian approach with sex and lineages as fixed effect with families as a random effect. The model was run for 200,000 MCMC iterations sampled at 1,000 iteration intervals after a burn-in of 15,000 iterations to estimate the variance components and genetic correlations, implemented in the MCMCglmm package with Gaussian distribution (Hadfield 2010).

The estimated G-matrix was used to infer whether among trait covariation would influence the patterns of response to selection. The direction of phenotypic divergence related

to the matrices is a good prediction of the direction of selection. Lande's equation was used to estimate selection gradients and responses to selection. The equation describes the evolutionary response of a set of quantitative traits:

$$\Delta z = G\beta, \quad (1)$$

where Δz is the vector of mean phenotypic differences between generations, β is the expected selection gradient vector, and G is the additive genetic V/CV matrix (Lande 1979). In order to estimate the G matrix, we compared the expected vector of morphological response to selection (Δz) based on the covariation structure with the observed Δz , which indicates whether there is a correlated response to selection. We inferred Δz values by reconstructing selection gradient vectors using G^{-1} , which is the inverse of the G matrix. For Δz prediction both, using family design in selected lines, or in the experiment with resource manipulation, we reconstructed selection gradient vectors using G^{-1} as the inverse of the G matrix in Lande's equation (Lande 1979; Lofsvold 1988; Cheverud 1996).

2.2.6. Resource Manipulation

To investigate whether traits that were under directional selection have responded differently to traits supposedly not under directional selection because of resource competition among different traits, we used selected lines that were maintained using the same bidirectional selection regimen described above for 120 generations, at which time progeny from lines H and L were reared under different resource conditions. Sets of eleven eggs from each line, being two replicates for each direction of selection, were placed onto plates that contained one of three different quantities of corn puree: small portion (Sm) = 0.175mg, medium portion (Me) = 0.33mg, and large portion (Lg) = 0.66mg. We estimated the per capita food available to each individual by dividing the amount of food available by the number of flies eclosing from each plate, because of mortality at the egg and larval stages.

Overall, this analysis included 1509 flies that eclosed from the three resource conditions: Sm N=576, Me N=574 and Lg N=359. As above, we estimated responses (Δz) as well as selection vectors (β) for these treatments, comparing Δz s inferred from the selected lines H and L with and without food manipulation, to investigate whether the response to selection changed depending on resource availability, due to differential resource allocation (non-traditional trade-off, a compensation process) as a correlated response among traits due to unintended selection (Hadfield 2012). All analyses were performed on R version 3.3.3 (R Core Team 2017).

2.3. RESULTS

Repeatabilities calculated using data from the selected lines were good (0.88 for Body Length, 0.98 for Eye Span, 0.79 for Wing Length, and 0.69 for Wing Width). Strains selected for high male relative eye-span (H) increased the stalk ratio as well as the Eye Span average (ES) and Wing Width (WW), while the lineage selected to have smaller relative eye-span (RES) (L) showed shorter stalk-ratio and Eye Span (ES), with an increase in Wing Length (WL). Females showed similar patterns, though they showed slightly smaller Body Length in the H lines when compared to L lines, and no difference on Wing Width among these lines. Female Wing Width and Wing Length in the control line were larger than the values from females derived from the selected lines (Table 1).

The changes detected in Eye Span ratio is evidence that selection acted on the target trait, but it also changed other traits as well. We then estimated a G-matrix for *T. dalmanni* combining the 1371 offspring derived from all three different strains for both sexes (Table 2), in order to increase confidence on the G matrix estimation since individual G-matrices for each of the three lines (Control, H line and L line) showed positive and significant

correlations by Random Skewers (all comparison showed $r > 0.93$ with $p < 0.002$). We also found the same correlation patterns for matrices inferred from different sexes ($r = 0.96$ with $p = 0.0001$). The G-matrix estimate revealed that the Eye Span is positively correlated with Wing Length, Wing Width, Body Length and Relative Eye Span, while Wing Width was negatively correlated with Wing Length. These correlations suggest the selection for longer and shorter stalk-eyes on lines H and L, respectively may have induced unintended effects on traits not targeted by selection.

The null hypothesis that the response to selection on the target trait did not produce any correlated responses due to an unintended selection on non-target traits was rejected in both selected lines, H (long-stalk) and L (short-stalk). Rather, our results indicated that all traits showed a positive response to selection. Another indication that bidirectional index selection affected other traits was that the β gradients showed that selection affected Wing Length and Body Length showed negative values and in the same direction as β_{ES} , pointing to a response on the same direction. However, β_{WW} showed positive values of selection gradients with greater magnitude than other traits (Table 3). Δz showed highly associated with β ($\theta_{\text{mean}} = 0.6571$) (Table S1) which suggests the evolutionary response is aligned to selection either natural selection affects the evolutionary trajectories (Marroig and Cheverud, 2005).

The results of phenotypic trait changes (Table 1), positive correlations (Table 2), and correlated selection responses (Table 3) showed that there are unintended responses to selection on different traits. When we subjected lineages that were selected for long- and short- stalk ratio to different amounts of resources, they responded differently, revealing a hidden balance mechanism that showed that evolutionary responses were affected by resource allocation. In general, traits increased with the increase in resource per capita, but

proportionally, at different paces, that is, the allocation of resources actually changed the proportionate allocation on different traits (Table 4). The H line allocated more resources to eye-span than the L line, so much so that the eye span ratio increased with the increase in resource availability, but it actually decreased in L lines, even more so on females, and this is because Body Length proportionately increased more on L lines and even more so on females when there was more food available. The only trait that failed to respond to an increase in resource availability was the wing aspect ratio, for either line (Table 4, Figure 2, Figure S1).

A decomposition of the vectors of response to selection showed changes in the traits with positive values Δz_{WL} (Wing Length) and Δz_{WW} (Wing Width) indicating an increase in Wing Length and Wing Width in H and L lines. Conversely, response to selection in Eye Span (Δz_{ES}) was more negative than in other traits for both selected lines, suggesting the resource manipulation induced a decrease in Eye Span in both lines, indicating an energetic balance for both but with the magnitude was smaller in the High line (HR). Meanwhile, β_{WL} , β_{WW} and β_{AR} showed larger values than that estimated for the β_{ES} (Table 5). In addition, we found that Δz and β are aligned ($\theta_{\text{mean}}=0.8042$), suggesting that selection may have acted to increase wing components in the long-term, revealing a mechanism of balance cost to compensate the high energy to maintain large eye spans.

2.4. DISCUSSION

The bidirectional artificial selection that favored, on one end, an increase in the eye-stalk ratio, and on the other end, its decrease, effectively led to the increase of eye-stalk ratio and eye-stalk length in the H lineages, and the decrease of these traits in the L lineages, but these were not the only traits that were influenced by this artificial selection. For instance, the

wing size increased significantly in the L lineage and wing width increased in lineage H, leading to a change in the wing aspect-ratio, which decreased in H and increased in L. These phenotypic changes emphasize that even non-target traits experienced an unintended consequence of the eye-stalk selection, reinforcing the importance of artificial selection experiments to help understand the genetic architecture of complex characters. Artificial selection is a very powerful tool since it may enable the test, under much simpler laboratory conditions, whether interdependencies among traits are a consequence of correlations and integration between characters, or a response to performance-targeting mechanisms such as trade-offs and compensation (Storz et al., 2015), which may be commonplace in nature.

Changes that occur in non-targeted traits may be consequence of a positive correlation between the target trait under selection, in this case, eye-span ratio, with non-target traits such as wing length, wing width and body length, and this may be a consequence of a functional integration between distinct traits which can be fostered or maintained by pleiotropy and/or linkage disequilibrium, allowing traits to respond in a correlated way and be concurrently selected (Sinervo and Svensson 2002, Sinervo and Calsbeek 2010, Montiglio et al., 2017).

Our results indicate that the selected trait, eye-span ratio, is only correlated to eye-span length, but to no other trait. This happens in spite of the fact that almost all other traits show significant correlation amongst themselves, even to eye-span length. This suggests that selection that affects eye-span may affect other traits due to correlation (Table 2), even though it should still be modulated by its genetic architecture to modify their growth relative to other structures (Pomiankowski and Moller 1995). We found that wing size increased significantly in the L lineage and wing width increased in lineage H, reflecting on changes in the wing aspect-ratio, which decreased in H and increased in L.

A decomposition of the response to selection to predict the direction of phenotypic changes rejected the null hypothesis that the selective regime affected eye-span, but did not produce any correlated response due to unintended selection on other traits. In both selected lines, H and L, non-selected traits showed a positive response to selection. This response was present in both sexes, though it was stronger in males, which is not surprising considering that this was the sex in which selection was effected (Table 3). The negative β gradients found for Wing Length, Wing Width, body length, and Relative Eye Span, indicate them to be affected by similar selection pressures, whereas it was positive for Eye Span, and it was larger than for about any trait. When we compare these results with Δz estimates, we found correlation between these vectors ($\theta_{\text{mean}} = 0.6519$) suggesting that the evolutionary change followed the selection pressure (Table S1).

The association between Eye-Span and wing components in stalk-eyed flies has been shown elsewhere, particularly in males of dimorphic species that tend to show bigger eye spans associated with larger wings (Ribak et al. 2009; Husak et al., 2011b; Husak et al. 2013). Therefore, a pressure due to sexual selection on a target ornament may cause other traits to respond in a correlated way and be concurrently selected, indicating that even when selection is directly acting on a single trait, the response may be multivariate (Husak et al. 2013; Storz et al. 2015).

Since we found responses to selection affecting different traits with different magnitudes for H and L lines (Table 3), which may have been a consequence of an unintended correlated selective response, we sought to evaluate if resource allocation to these characters could alter these associations and lead to a better understanding of the mechanism involved with the response of H and L lines to a long-term selection process.

In order to identify potential impact of resource allocation on targeted and non-targeted traits, individuals were submitted to resource manipulation that promoted a relevant caloric limitation to them, which can be depicted from the large average reduction in body size and several other phenotypes that happened to both lineages. Thus, individuals were submitted to differential resource availability which led to a differential allocation of the scarce resources among target and non-target traits, indicating a possible disproportionate allocation between the antagonistically selected lines (Table 4). We observed that eye-span increased as more resources were available for L and H lines, but this effect was proportionally higher in the H line, so that eye-span ratio increased in H with the increase in resource availability and decreased in L, particularly because body size in the latter increased proportionally more than eye-span (Figure S1 B). Wing length increased in both lines, but proportionally more in L, while wing width increased proportionally more than wing length and led to a decrease in the wing aspect ratio in both, an effect that was stronger in line L (Table 4). Thus, as more resources become available, a higher proportion was allocated to eye-span and wing width for males in line H, when compared to line L. As an exaggerated character, eye-span it is likely more sensitive to resource availability, and individuals would try to allocate to this trait the maximum possible amount of resources, causing developmental plasticity that could be used as an honest signal either to females or to predators (Emlen et al., 2012). This nutritional association plays a critical role in correlated characters, especially in the direction of selection, determining that the evolutionary response follows the environment over time (Chenoweth et al., 2010). It should be further noted here that a selection favoring larger eye stalks may not have been restricted to males, since in nature males also seem to use this aspect to choose females, due to its association with fertility (Cotton et al. 2014).

During development, the growth of exaggerated traits may interfere with the development of other correlated phenotypes, but also affect phenotypes in general when there is a need to balance energy costs, leading to a decrease or increase of other structures, depending on the correlation. Previous work has suggested that the response of selection on animals that exhibit large ornamental structures would be multivariate and promote correlated responses to other body structures, in such a way that the targeted trait would only evolve if there is a globally (or at least locally, in structured populations) efficient performance, otherwise it would not be favored (LeBas et al., 2004).

Exaggerated stalk-eyes in general may be selectively advantageous for breeding, but they affect male locomotion performance, such as in flight maneuverability, that would affect access to resources or even in disputes with other males during mating. Thus, a compensatory mechanism may be favored due to unintended correlational selection (Painting and Houle 2013). Indeed, we found antagonistic responses to selection on different traits when the lineages were subjected to resource manipulation, such that eye span and body length would decrease in size when there is less food available, but wing width proportionally shows increased growth. On the other hand, an increase in food availability would lead to a disproportionate increase in eye length on the H lineage, selected for big stalk-eye ratio, and a bigger body on the L lineage, selected for small stalk-eye ratio.

The alternative allocation of resources may show the unintended effect of selection on wings, allowing for a new resource allocation and an alternative evolutionary trajectory (Table 5, Figure S2) by an evolutionary compensatory mechanism that is not meant to hinder individual performances. This may have favored wing length and wing width growth because it has been suggested that Stalk-eyed males improve balance for flight and courtship

performance by a compensatory wing-size mechanism (Ribak et al., 2009), possibly because stronger flight muscles and larger wings would potentially promote more thrust to overcome the inertia created by exaggerated eyestalks (Ribak and Swallow, 2007; Ribak et al., 2009; Husak et al., 2011b; 2013). Since selection was for eye-span ratio, which is a measure of the eye-span divided by the body length, there may have been inadvertent selection for smaller body length, limiting the length of wings that could be selected, and thereby, limiting wing adaptation on the direction of wing length, but not on wing width.

In conclusion, our results indicate changes in non-target phenotypes as an unintended effect of selection, likely promoted by positive correlation between target and non-target traits. Furthermore, our results indicate that resource allocation would be preferably directed to different traits depending on the underlying selective regime, so that eye span and wing components would be favored during the evolution of lines selected for high and low stalk-eyed ratios, but in such a way that is determined by the variance/covariance matrix to maintain an efficient flight performance.

Table 1. Linear models for lineages after 20 generations of bidirectional selection and posteriorly used for breeding design. Six distances were analysed separated by sex (M=male; F=female).

ES_M	Estimate	Std.	t	P- value	F _{2,650}	R	P-value
(Intercept)	9.361	0.020	470.93	2.00E-16	427.7	0.566	2.20E-16
DirectionH	1.119	0.053	20.92	2.00E-16			
DirectionL	-0.684	0.042	-16.4	2.00E-16			
BL_M	Estimate	Std.	t	P- value	F _{2,650}	R	P-value
(Intercept)	7.463	0.012	601.276	2.00E-16	1.748	0.002	0.1749
DirectionH	0.01133	0.03339	0.339	0.7345			
DirectionL	0.049	0.026	1.87	0.06			
RES_M	Estimate	Std.	t	P- value	F _{2,650}	R	P-value
(Intercept)	1.255	0.002	518.39	2.00E-16	544.5	0.622	2.00E-16
DirectionH	0.147	0.007	22.64	2.00E-16			
DirectionL	-0.100	0.005	-19.62	2.00E-16			
WL_M	Estimate	Std.	t	P- value	F _{2,650}	R	P-value
(Intercept)	2.517	0.004	614.152	2.00E-16	27.00	0.006	5.42E-12
DirectionH	0.001	0.011	0.066	0.95			
DirectionL	0.062	0.009	7.244	1.24E-12			
WW_M	Estimate	Std.	t	P- value	F _{2,650}	R	P-value
(Intercept)	0.862633	0.001644	524.628	2.00E-16	3.03	0.006	0.049
DirectionH	0.010	0.004	2.242	0.03			
DirectionL	-0.002	0.003	-0.603	0.55			
AR_M	Estimate	Std.	t	P- value	F _{2,650}	R	P-value
(Intercept)	2.921	0.005	604.381	2.00E-16	38.29	0.11	2.00E-16
DirectionH	-0.033	0.013	-2.561	0.01			
DirectionL	0.078903	0.01014	7.782	2.82E-14			
ES_F	Estimate	Std.	t	P- value	F _{2,715}	R	P-value
(Intercept)	6.306	0.011	566.48	2.00E-16	284.7	0.44	2.00E-16
DirectionH	0.414	0.028	14.82	1.00E+00			
DirectionL	-0.351	0.023	-15.45	2.00E+00			
BL_F	Estimate	Std.	t	P- value	F _{2,715}	R	P-value
(Intercept)	7.15995	0.01097	652.691	2.00E-16		0.01	2.00E-16
DirectionH	-0.08358	0.02753	-3.035	0.00249			
DirectionL	0.03479	0.02237	1.555	0.12032			
RES_F	Estimate	Std.	t	P- value	F _{2,715}	R	P-value
(Intercept)	0.881124	0.001441	611.26	2.00E-16	428.7	0.544	2.00E-16
DirectionH	0.068933	0.003618	19.05	2.00E-16			
DirectionL	-0.053165	0.00294	-18.09	2.00E-16			
WL_F	Estimate	Std.	t	P- value	F _{2,715}	R	P-value
(Intercept)	2.523407	0.003908	645.784	2.00E-16	189.7	0.34	2.00E-16
DirectionH	-0.180359	0.009808	-18.389	2.00E-16			
DirectionL	-0.078785	0.007969	-9.887	2.00E-16			
WW_F	Estimate	Std.	t	P- value	F _{2,715}	R	P-value
(Intercept)	0.865079	0.001572	550.19	2.00E-16	157.4	0.3	2.00E-16
DirectionH	-0.057341	0.003947	-14.53	2.00E-16			
DirectionL	-0.04114	0.003207	-12.83	2.00E-16			
AR_F	Estimate	Std.	t	P- value	F _{2,715}	R	P-value
(Intercept)	2.91937	0.004401	663.273	2.00E-16	18.78	0.048	1.12E-08
DirectionH	-0.01678	0.011048	-1.519	0.129			
DirectionL	0.049609	0.008976	5.527	4.57E-08			

ES=Eye Span, BL= Body Length, E.ratio=ES/BL, WL=Wing Length, WW=Wing Width, W.ratio= WL/WW.

Table 2. Genetic variances, covariances and correlations from G-matrix estimated for different traits of *Teleopsis dalmanni*.

Trait	WL	WW	AR	ES	BL	RES
WL	0.1248	0.4478*	0.3063	0.2647*	0.5513*	-0.0271
WW	0.0623	0.1550	-0.5993	0.2920*	0.3242*	0.1496
AR	0.0479	-0.1044	0.1958	-0.0766	0.1415	-0.1828
ES	0.0162	0.0199	-0.0058	0.0300	0.4507*	0.3819*
BL	0.0931	0.0610	0.0299	0.0373	0.2288	-0.0465
RES	-0.0015	0.0095	-0.0131	0.0107	-0.0036	0.0264

WL, Wing Length; WW, Wing Width; AR, Aspect ratio of wings,; ES, Eye Span, BL, Body Length; RES, Relative Eye-Span. Genetic variances (diagonal, gray), covariances (Lower-diagonal) and correlation (Upper-diagonal). For significance, * is $p < 0.05$.

Table 3. The normalized Δz vectors as a magnitude of morphological change and directional phenotypic selection gradients (β), also estimated as the norm from the P matrix and Δz on traits.

	Vector	WL	WW	AR	ES	BL	RES
Δz	$\Delta z_{_H_m}$	0.1453	0.0106	0.1638	0.7998	0.5301	0.1762
	$\Delta z_{_H_f}$	0.1756	0.0074	0.2201	0.6643	0.6667	0.1863
	$\Delta z_{_L_m}$	0.1944	0.0094	0.2375	0.6086	0.7087	0.1812
	$\Delta z_{_L_f}$	0.1691	0.01099	0.1941	0.7368	0.5997	0.5997
β	$\beta_{_H_m}$	-0.0271	-0.0489	0.0330	0.9776	-0.0764	-0.1849
	$\beta_{_H_f}$	-0.0564	-0.0497	0.0578	0.9911	-0.0216	-0.0899
	$\beta_{_L_m}$	-0.0338	-0.0518	0.04051	0.9836	-0.0554	-0.1546
	$\beta_{_L_f}$	-0.0622	-0.0554	0.0649	0.9930	0.0061	-0.0505

WL, Wing Length; WW, Wing Width; AR, Aspect ratio of wing; ES, Eye Span, BL, Body Length; RES, Relative eye-span; f= female; m=male.

Table 4. Linear models for lineages selected for H (High eye-stalk ratio) and L (Low eye-stalk ratio) for 120 generations subjected to resource manipulation

ES	Estimate	Std.	t	P- value	F_{8,1499}	R	P-value
(Intercept)	3.68711	0.05407	68.194	2.00E-16	381.10	0.66	2.20E-16
lper	0.23436	0.01764	13.288	2.00E-16			
sexM	1.32614	0.05113	25.937	2.00E-16			
H2	-0.05884	0.04384	-1.342	1.80E-01			
L1	-0.25124	0.04431	-5.67	1.71E-08			
L2	-0.27821	0.04301	-6.469	1.33E-10			
sexM:H2	-0.1915	0.06665	-2.873	0.00412			
sexM:L1	-0.16646	0.06889	-2.416	0.0158			
sexM:L2	-0.32901	0.06878	-4.783	1.90E-06			
BL	Estimate	Std.	t	P- value	F_{8,1499}	R	P-value
(Intercept)	7.42511	0.0542	136.991	2.00E-16	82.24	0.30	2.00E-16
lper	0.367	0.01768	20.758	2.00E-16			
sexM	0.25909	0.05125	5.055	4.83E-07			
H2	-0.08417	0.04394	-1.915	0.05563			
L1	-0.12461	0.04442	-2.806	0.00509			
L2	-0.06901	0.04311	-1.601	0.10967			
sexM:H2	0.01527	0.06681	0.229	0.81927			
sexM:L1	0.08159	0.06906	1.181	0.23764			
sexM:L2	0.03687	0.06895	0.535	0.5929			
RES	Estimate	Std.	t	P- value	F_{8,1499}	R	P-value
(Intercept)	0.492973	0.006346	77.688	2.00E-16	437.60	0.69	2.00E-16
lper	0.00683	0.00207	3.3	0.000991			
sexM	0.176563	0.006001	29.425	2.00E-16			
H2	-0.002766	0.005145	-0.538	0.590864			
L1	-0.029111	0.0052	-5.598	2.57E-08			
L2	-0.03835	0.005048	-7.598	5.28E-14			
sexM:H2	-0.027524	0.007822	-3.519	0.000446			
sexM:L1	-0.029032	0.008085	-3.591	0.00034			
sexM:L2	-0.047831	0.008073	-5.925	3.87E-09			
WL	Estimate	Std.	t	P- value	F_{8,1499}	R	P-value
(Intercept)	4.241798	0.029572	143.438	2.00E-16	106.60	0.36	2.00E-16
lper	0.208788	0.009646	21.644	2.00E-16			
sexM	0.185692	0.027965	6.64	4.37E-11			
H2	-0.010635	0.023976	-0.444	0.65743			
L1	0.030085	0.024234	1.241	0.21464			
L2	0.068009	0.023523	2.891	0.00389			
sexM:H2	0.032016	0.036453	0.878	0.37993			
sexM:L1	0.047068	0.03768	1.249	0.21181			
sexM:L2	0.044377	0.037621	1.18	0.23836			
WW	Estimate	Std.	t	P- value	F_{8,1499}	R	P-value
(Intercept)	2.05839	0.01456	141.364	2.00E-16	98.91	0.34	2.00E-16
lper	0.09964	0.00475	20.979	2.00E-16			
sexM	0.08169	0.01377	5.933	3.69E-09			
H2	-0.02637	0.0118	-2.234	0.0257			
L1	-0.0187	0.01193	-1.567	0.1173			
L2	0.02763	0.01158	2.385	0.0172			
sexM:H2	0.01595	0.01795	0.889	0.3743			
sexM:L1	0.02486	0.01855	1.34	0.1804			
sexM:L2	0.02529	0.01852	1.365	0.1724			
AR	Estimate	Std.	t	P- value	F_{8,1499}	R	P-value
(Intercept)	2.059179	0.005242	392.847	2.00E-16	22.03	0.10	2.00E-16
lper	0.001021	0.00171	0.597	0.5503			
sexM	0.009741	0.004957	1.965	0.0496			
H2	0.023774	0.00425	5.594	2.63E-08			
L1	0.037955	0.004295	8.836	2.00E-16			
L2	0.006232	0.004169	1.495	0.1352			
sexM:H2	-0.001514	0.006461	-0.234	0.8148			
sexM:L1	-0.004118	0.006679	-0.617	0.5376			
sexM:L2	-0.004884	0.006668	-0.732	0.464			

ES=Eye Span, BL= Body Length, RES=ES/BL, WL=Wing Length, WW=Wing Width, AR = WL/WW. H, H line; L, L Line; lper (logarithmic transformation of per capita resource)

Table 5. The normalized Δz vectors for lineages submitted to resource allocation as a magnitude of morphological change and directional phenotypic selection gradients (β), also estimated as the norm from the P matrix and Δz and traits.

	Vector	WL	WW	AR	ES	BL	RES
Δz resource manipulation	$\Delta z_{_H_m}$	0.2155	0.1559	-0.124	-0.9425	-0.1082	-0.1174
	$\Delta z_{_H_f}$	0.4925	0.3368	-0.2565	-0.7467	-0.1006	-0.097
	$\Delta z_{_L_m}$	0.2774	0.2122	-0.1900	-0.8977	-0.1563	-0.1065
	$\Delta z_{_L_f}$	0.5580	0.4028	-0.3357	-0.6162	-0.1665	-0.0714
β resource manipulation	$\beta_{_H_Hh_m}$	0.1138	-0.0222	-0.0801	-0.9402	0.1189	0.2853
	$\beta_{_H_Hh_f}$	0.2884	-0.1252	-0.1904	-0.8907	0.0798	0.2541
	$\beta_{_L_Lh_m}$	0.1593	-0.0486	-0.1103	-0.9324	0.1049	0.2817
	$\beta_{_L_Lh_f}$	0.3877	-0.1811	-0.2539	-0.8333	0.0437	0.2340

WL, Wing Length; WW, Wing Width; AR, Aspect ratio of wing; ES, Eye Span, BL, Body Length; RES, Relative eye-span; f, female; m, male.

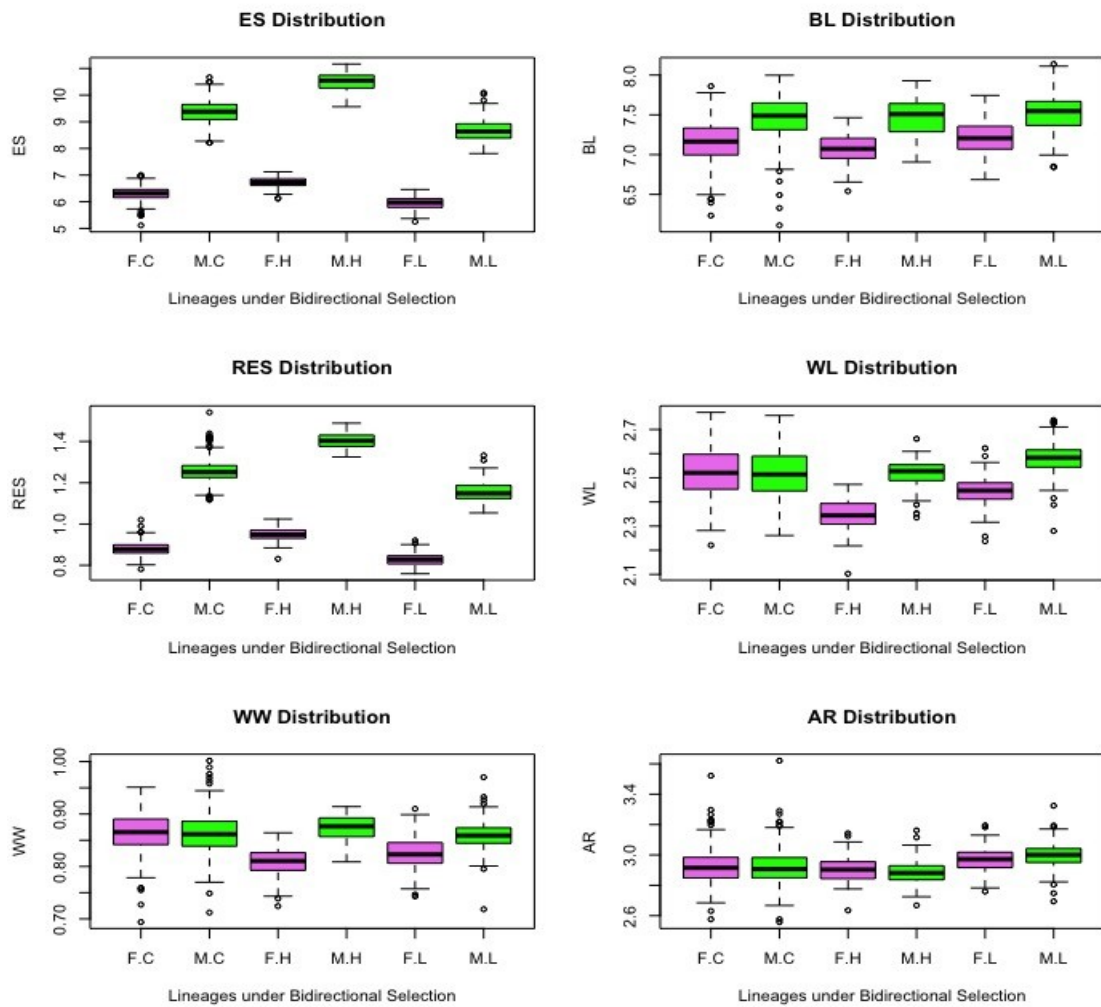


Figure 1. Box-plot distribution of different traits measured on an unselected control (C) line, an H line selected for high eye-stalk ratio and an L line, selected for low eye-stalk ratio, separated by sex.

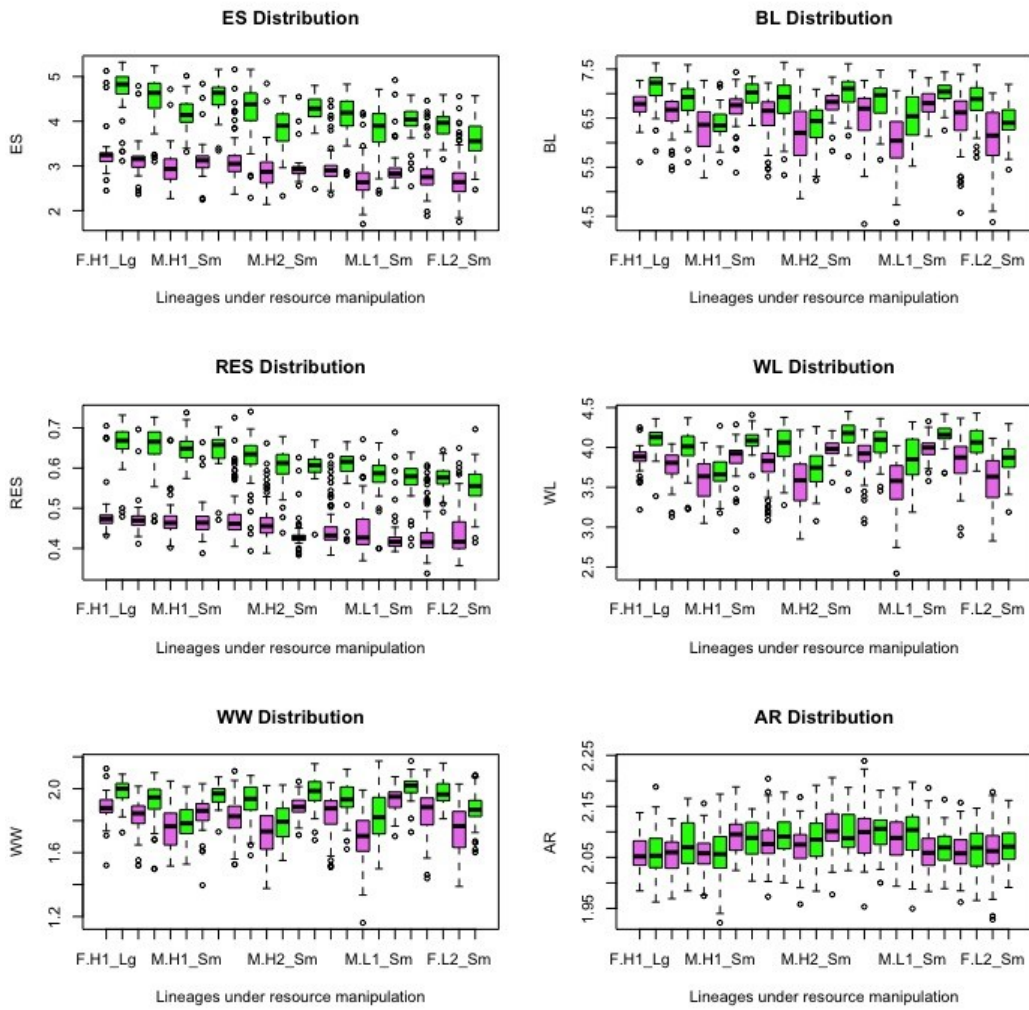


Figure 2. Box-plot distribution of the distance, representing the geometric mean of distance for measured on lines selected for H (high eye-stalk ratio) and L (low eye-stalk ratio) subjected to resource manipulation. A. ES= Eye Span. B.BL= Body Length. C.RES= Relative eye-span. D.WL= Wing Length. E. WW= Wing Width. F. AR= Wing ratio.

Supplementary information

Table S1. Vector correlations between response to selection ($\Delta\mathbf{z}$), gradient selection (β). The vectors were constructed based on multivariate Breeder's equation (Lande Equation).

Vectors	$\beta \times \Delta\mathbf{z}$
$\beta_{_H2_F_o}, \Delta\mathbf{z}_{_fam_H2_F_o}$	0.6297
$\beta_{_L2_F_o}, \Delta\mathbf{z}_{_fam_L2_F_o}$	0.6024
$\beta_{_H2_M_o}, \Delta\mathbf{z}_{_fam_H2_M_o}$	0.7097
$\beta_{_L2_M_o}, \Delta\mathbf{z}_{_fam_L2_M_o}$	0.6659
$\beta_{_H1_Hh_m}, \Delta\mathbf{z}_{_mean_H1_Hh_m}$	0.8707
$\beta_{_H3_Hh_m}, \Delta\mathbf{z}_{_mean_H3_Hh_m}$	0.8709
$\beta_{_H1_Hh_f}, \Delta\mathbf{z}_{_mean_H1_Hh_f}$	0.7732
$\beta_{_H3_Hh_f}, \Delta\mathbf{z}_{_mean_H3_Hh_f}$	0.7896
$\beta_{_L1_Lh_m}, \Delta\mathbf{z}_{_mean_L1_Lh_m}$	0.8441
$\beta_{_L3_Lh_m}, \Delta\mathbf{z}_{_mean_L3_Lh_m}$	0.8470
$\beta_{_L1_Lh_f}, \Delta\mathbf{z}_{_mean_L1_Lh_f}$	0.7057
$\beta_{_L3_Lh_f}, \Delta\mathbf{z}_{_mean_L3_Lh_f}$	0.7323

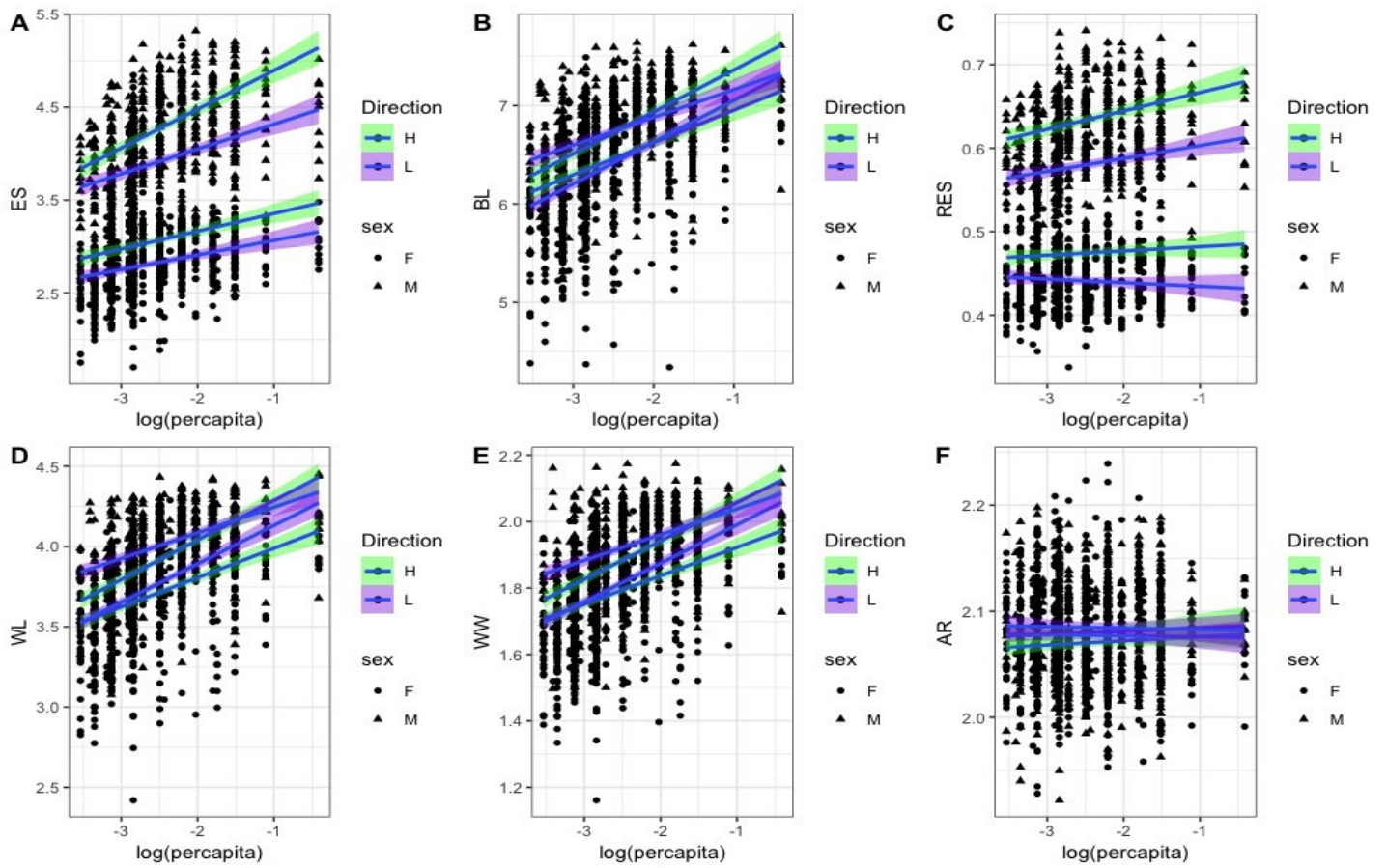


Figure S1. Regression slopes for six traits evaluated for each replicate from two antagonistically selected lineages (colors: H= shaded emerald; L= light blue) for males (triangles) and females (circles) submitted to resource availability gradients (per capita = food allocation per individual). A. ES= Eye Span. B. BL= Body Length. C. RES= Relative eye-span . D. WL= Wing Length. E. WW= Wing Width. F. AR= Aspect ratio.

2.5. REFERENCES

- Allen, C. E., Beldade, P., Zwaan, B. J., and Brakefield, P. M. 2008. Differences in the selection response of serially repeated color pattern characters: Standing variation, development, and evolution. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-94>.
- Armbruster, W. S., Pélabon, C., Bolstad, G. H., and Hansen, T. F. 2014. Integrated phenotypes: Understanding trait covariation in plants and animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1649). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0245>.
- Careau, V., Réale, D., Humphries, M. M., and Thomas, D. W. 2010. The Pace of Life under Artificial Selection: Personality, Energy Expenditure, and Longevity Are Correlated in Domestic Dogs. *The American Naturalist*, 175(6), 753–758. <https://doi.org/10.1086/652435>.
- Chenoweth, S. F., Rundle, H. D., and Blows, M. W. 2010. The contribution of selection and genetic constraints to phenotypic divergence. *The American Naturalist* 175: 186–196.
- Chevin, L., and Lande, R. 2015. Evolution of environmental cues for phenotypic plasticity, 2767–2775. <https://doi.org/10.1111/evo.12755>.
- Cheverud, J.M. 1996. Quantitative genetic analysis of cranial morphology in the cotton-top (*Saguinus oedipus*) and saddle-back (*S. fuscicollis*) tamarins. *J. Evol. Biol.* 9: 5–42.
- Condon, C., Acharya, A., Adrian, G. J., Hurliman, A. M., Malekooti, D., Nguyen, P., Angilletta, M. J. 2015. Indirect selection of thermal tolerance during experimental evolution of *Drosophila melanogaster*. *Ecology and Evolution*, 5(9), 1873–1880. <https://doi.org/10.1002/ece3.1472>.

- Cotton, A. J., Cotton, S., Small, J., & Pomiankowski, A. 2015. Male mate preference for female eyespan and fecundity in the stalk-eyed fly, *Teleopsis dalmanni*. *Behavioral Ecology*, 26(2), 376–385. <https://doi.org/10.1093/beheco/aru192>
- Christianson SJ, Swallow JG, Wilkinson GS. 2005. Rapid evolution of postzygotic reproductive isolation in stalk-eyed flies. *Evolution* 59:849–857
- Emlen, D. J., I. J. Warren, A. Johns, I. Dworkin, and L. C. Lavine. 2012. A mechanism of extreme growth and reliable signalling in sexually selected ornaments and weapons. *Science* 337:860–964.
- Falconer, D. S., and Mackay, T. F. C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. Longmans Green, Harlow, Essex, UK.
- Garland, T., Jr. 2003. Selection experiments: An under-utilized tool in biomechanics and organismal biology. Pages 23–56 in V. L. Bels, J.-P. Gasc, A. Casinos, eds. *Vertebrate Biomechanics and Evolution*. Oxford: BIOS Scientific.
- Hadfield, J. 2010. MCMC methods for multi-response generalized linear mixed models: The MCMCglmm R package, (Brown), 1–23.
- Hadfield, J. 2012. The quantitative genetic theory of parental effects. In *The Evolution of Parental Care* (pp. 267–284). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199692576.003.0015>.
- Hine, E., McGuigan, K., and Blows, M. W. 2011. Natural selection stops the evolution of male attractiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(9), 3659 LP-3664.

- Husak, J.F., Ribak, G., Wilkinson, G.S. & Swallow, J.G. 2011b. Sexual dimorphism in wing beat frequency in relation to eye span in stalk-eyed flies (Diopsidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 104: 670–679.
- Husak, J. F., Ribak, G., Baker, R. H., Rivera, G. , Wilkinson, G. S. and Swallow, J. G. 2013. Effects of ornamentation and phylogeny on the evolution of wing shape in stalk-eyed flies (Diopsidae). *J. Evol. Biol.*, 26: 1281-1293. doi:10.1111/jeb.12133
- Lande, R. 1979. Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain : body size allometry. *Evolution* 33:402–416.
- Lande, R. and Arnold, S. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37(6), 1210–1226.
- LeBas, N. R., Hockham, L. R., Ritchie, M. G. 2004. Sexual selection in the gift-giving dance fly, *Rhamphomyia sulcata*, favors small males carrying small gifts. *Evolution* 58:1763–1772.
- Lessels CM, Boag PT. Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk*. 1987; 104:116–121.
- Lynch, M., and B. Walsh. 1998. *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Lofsvold, D. 1988. Quantitative genetics of morphological differentiation in *Peromyscus*. II. Analysis of selection and drift. *Evolution* 42: 54–67.
- Marroig, G., and Cheverud, J. M. 2005. Size as a line of least evolutionary resistance: Diet and adaptive morphological radiation in new world monkeys. *Evolution* 59: 1128-1142.
- Melo, D., G. Garcia, A. Hubbe, A. P. Assis, and G. Marroig, 2015. *Evolqg* - an r package for evolutionary quantitative genetics [version 3; referees: 2 approved, 1 approved with reservations]. *F1000Res.* 4:925.

- Montiglio, P. O., Wey, T. W., Chang, A. T., Fogarty, S., and Sih, A. 2017. Correlational selection on personality and social plasticity: morphology and social context determine behavioural effects on mating success. *Journal of Animal Ecology*, 86: 213–226.
- R Core Team. 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.
- Painting, C. J., and Holwell, G. I. 2013. Exaggerated trait allometry, compensation and trade-offs in the New Zealand giraffe weevil (*Lasiornychus barbicornis*). *PLoS ONE* 8: 1–13.
- Pomiankowski, A. & Moller, A. (1995) A resolution of the lek paradox. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 260, 21–29.
- Ribak G, Swallow JG. 2007. Free flight maneuvers of stalk-eyed flies: Do eye-stalks affect aerial turning behavior? *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 193: 1065-1079. doi:10.1007/s00359-007-0259-1. PubMed: 17710410.
- Ribak, G., Pitts, M. L., Wilkinson, G. S., and Swallow, J. G. 2009. Wing shape, wing size, and sexual dimorphism in eye-span in stalk-eyed flies (Diopsidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 98(4), 860–871. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01326.x>
- Rohlf FJ. 2014. tpsDIG2, version 2.17.
- Scheiner, S.M. 2002. Selection experiments and the study of phenotypic plasticity. *J. Evol. Biol.* 15: 889–898.
- Sinervo, B., and Svensson, E. 2002. Correlational selection and the evolution of genomic architecture. *Heredity*, 89(5), 329–338. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800148>.
- Sinervo, B., and Calsbeek, R. 2010. Behavioral concepts of selection in *Evolutionary Behavioural Ecology*, eds Westneat, D. and Fox, C., Oxford University Press, Oxford, U.K.

- Stillwell, R. C., Shingleton, A. W., Dworkin, I. and Frankino, W. A. (2016), Tipping the scales: Evolution of the allometric slope independent of average trait size. *Evolution*, 70: 433-444. doi:[10.1111/evo.12865](https://doi.org/10.1111/evo.12865).
- Storz, J. F., Bridgham, J. T., Kelly, S. A., and Garland, T. 2015. Genetic approaches in comparative and evolutionary physiology. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 309(3), R197–R214. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00100.2015>.
- Wilkinson, G. S. 1993. Artificial sexual selection alters allometry in the stalk-eyed fly *Cyrtodiopsis dalmanni* (Diptera: Diopsidae). *Genetical Research*, 62(3), 213–222. <https://doi.org/10.1017/S001667230003192X>.
- Turelli, M., and Barton, N.H. 1994. Genetic and statistical analyses of strong selection on polygenic traits: what, me normal? *Genetics* 138: 913–941.

CAPÍTULO III

Evidência de plasticidade fenotípica em caracteres morfológicos de espécies do grupo

Anastrepha fraterculus

3.1.INTRODUÇÃO

A evolução fenotípica multivariada é central para a biologia evolutiva ao estabelecer um arcabouço teórico-prático implementação da genética quantitativa, integrando diversos campos de pesquisa para explicar a dinâmica da variação morfológica (Lande, 1982; Márquez et al., 2012). Tal arcabouço tem sido usado com sucesso para explicar tanto padrões de variação (Walsh e Lynch 1998; Morrissey, 2016) quanto a magnitude da seleção fenotípica (Calsbeek et al. 2012; Engen et al. 2012; Aguirre et al., 2014).

A análise quantitativa permite particionar componentes importantes que determinam a variação fenotípica, como a fração que é passada para os descendentes, ou variação aditiva, e também a influência ambiental, visto que o ambiente é dos principais fatores que agem na evolução fenotípica (Wood e Brodie 2016). A quantidade de variação genética aditiva determinará o potencial de resposta de uma espécie a pressões do meio. Por sua vez, em caracteres complexos, a seleção age sobre um determinado o fenótipo e pode atuar não intencionalmente em outras estruturas, ou até no organismo inteiro, modulado pelo valor adaptativo (Lande e Arnold, 1983; Scheiner, 2002). Isso acontece porque caracteres complexos são moldados por pleiotropia e desequilíbrio de ligação (Lynch and Walsh, 1998) que criam correlações entre diferentes caracteres e podem estabelecer uma integração fenotípica que influencia a adaptação em um ambiente (Collyer et al., 2015).

Como fenótipos multivariados tendem a refletir correlações entre diferentes caracteres que tanto modulam quanto são modulados pelo processo evolutivo, isso implica que, em geral, espécies filogeneticamente mais próximas tendem a apresentar valores mais similares, a não ser que alguma força evolutiva tenha modificado tal padrão. A existência desse sinal filogenético entre espécies pode ajudar a mapear mudanças dos caracteres no contexto de sua diferenciação, permitindo melhor inferência sobre congruências históricas e magnitude da

mudança adaptativa e com isso permitir melhor entendimento das forças evolutivas subjacentes.

A influência do ambiente nas espécies é pervasivo, por vezes modificando diferencialmente suas performances ao longo do tempo, principalmente pela implementação de modificações nas estratégias de sobrevivência e reprodução, que eventualmente podem evoluir para uma ampla variedade de características morfológicas e ecológicas (Relyea et al., 2018). Essa plasticidade fenotípica, que representa como determinados genótipos se expressam em ambientes distintos, reflete a influência do meio na amplitude da variação fenotípica (Pigliucci, 2001).

A sensibilidade ao ambiente desempenha um papel crucial na adaptação fenotípica, uma vez que a plasticidade fenotípica, ao afetar os fenótipos sujeitos à pressões de seleção, influenciará como a seleção afeta a variância genética disponível para uma resposta adaptativa. Da mesma forma que a variação genética disponível, o padrão de plasticidade fenotípica também é mais próximo em espécies filogeneticamente mais próximas, refletindo, grosso modo, a relação filogenética entre as espécies (Chevin e Lande, 2010; Wood e Brodie, 2016). Por esse motivo, inferências filogenéticas entre espécies podem ajudar a mapear mudanças dos caracteres no contexto de sua diferenciação, permitindo melhor inferência sobre congruências históricas e magnitude da mudança adaptativa e com isso permitir melhor entendimento das forças evolutivas subjacentes e do sinal filogenético existente nos caracteres estudados.

Associar estudos filogenéticos e abordagens que quantificam a plasticidade fenotípica, assim, é relevante para avaliar as repercussões do sinal filogenético em caracteres morfológicos ou ecológicos e pode revelar a influência da plasticidade e restrições evolutivas

em sua evolução (Blomberg, 2003; Gómez-Cendra et al., 2016; Gomez-Mestre et al., 2008; Relyea, 2018).

Muitos estudos associam o potencial efeito ecológico das plantas hospedeiras no desenvolvimento de insetos à elas associadas (Nel et al., 2018). Esta associação é particularmente importante em moscas-das-frutas da família Tephritidae que tanto apresentam espécies com associação específica a uma ou poucas plantas hospedeiras, como também apresentam outras espécies mais generalistas que são inclusive consideradas pragas agrícolas infestando uma ampla variedade de frutas e culturas vegetais (Norrbon et al., 1999a, 2015; Norrbom, 2004a; Norrbom e Korytkowski, 2009, 2011, 2012), que estão principalmente nos gêneros *Rhagoletis*, *Ceratitis*, *Bactrocera*, e *Anastrepha* (Shiner) (Gómez-Cendra, 2016).

O gênero *Anastrepha* (Shiner), que em recente revisão incorporou *Toxotrypana*, que era considerado sua espécie irmã (Norrbon et al., 2018) é o mais comum na América dos Sul e com maior número de espécies de moscas-das-frutas de região tropical, com mais de 300 espécies (Aluja, 1994; Norrbom et al., 1999). *Anastrepha* é dividido em 23 grupos baseados principalmente por caracteres morfológicos (Norrbon e Korytkowski, 2009; Norrbom et al., 2012; Norrbom et al., 2018). Um recente trabalho analisou 146 espécies do gênero *Anastrepha*, que representam 19 dos 23 grupos, para investigar as relações filogenéticas de *Toxotrypanini*, incluindo *Anastrepha*, *Toxotrypana* e *Hexachaeta*, utilizando três marcadores mitocondriais (16S, CAD e COI) e três nucleares (EF1a, PER e PGD) e encontrou que o gênero *Anastrepha+Toxotrypana* e o gênero *Toxotrypana* são monofiléticos, este último originado dentro de *Anastrepha* (com alto suporte) sugerindo sua parafilia (Mengual et al., 2017), o que levou à sinonimização de destes dois gêneros. Apesar do grande número de espécies investigadas e do número de marcadores moleculares, diversas relações entre grupos

ainda ficaram não resolvidas, mas foi possível dar suporte à relação dos grupos *daciformis*, *dentata*, *leptozona*, *raveni* e *striata*. Já o grupo *serpentina* foi reconhecido com menor suporte, e os grupos *fraterculus* e *pseudoparallela* em geral tiveram bom suporte com pequenas alterações. O grande clado que compreende os grupos *pseudoparallela*, *spatula*, *ramosa*, *doryphoros*, *grandis*, *serpentina*, *striata*, *fraterculus* foi recuperado, mas sem forte suporte estatístico. Embora as 20 espécies do grupo *fraterculus* estudadas tenham formado um grupo monofilético, há ainda pouco suporte tanto para as relações de parentesco entre as diferentes espécies do grupo, que abrange as espécies de maior importância econômica, bem como para as relações com diferentes grupos (Mengual et al., 2017).

Dada a importância econômica de *Anastrepha*, em especial do grupo *fraterculus*, muitos estudos já abordaram seus aspectos genéticos e morfológicos (Bomfim et al, 2011; Hernández-Ortiz et al., 2015; Oroño et al., 2013; Perre et al., 2014). Estes estudos em geral têm revelado alguns marcadores morfológicos considerados úteis tanto para a identificação de grupos no gênero, como também para a identificação de espécies mais proximamente relacionadas. Em sua grande maioria, a identificação das espécies é primariamente feita considerando-se o acúleo da fêmea, o tamanho do corpo e o padrão da asas, caracteres complexos que provavelmente têm herança multifatorial (Stone, 1942). Muito embora, vários estudos tenham abordados diversos aspectos morfológicos (Bomfim et al, 2011; Hernández-Ortiz et al., 2015; Oroño et al., 2013), falta ainda uma análise mais rigorosa do sinal filogenético presente em tais caracteres e suas implicações na diferenciação associada à exploração de hospedeiros.

Um aspecto que tem sido pouco investigado na caracterização morfológica de espécies de *Anastrepha* do grupo *fraterculus* é a influência da planta hospedeira no seu desenvolvimento, principalmente a influência dessa interação em características bioquímicas,

genéticas e mesmo morfológicas que pode indicar um processo de plasticidade fenotípica reflexo de sua adaptação (Norrbon et al., 2015). Alguns trabalhos encontraram diferenças genéticas em moscas derivadas de hospedeiros diferentes, utilizando loci ISSR (Oroño et al., 2013) que foram associadas a diferenças em caracteres morfológicos entre moscas adultas das mesmas populações usando uma abordagem multivariada (Gómez-Cendra, et al. 2016). Por sua vez, um estudo feito em pomares brasileiros com *A. fraterculus* não encontrou diferenças genéticas em análises de isozimas de moscas derivadas de frutos diferentes (Malavasi e Morgante, 1983).

Moscas do gênero *Anastrepha*, principalmente do grupo *fraterculus*, assim como outros insetos fitófagos, são importantes modelos para o estudo de mecanismos de adaptação a hospedeiro e seu papel na divergência interespecífica, devido à íntima relação destes com plantas hospedeiras ao longo de seu desenvolvimento que tem consequências na vida adulta (Schoonhoven, 2005). Em um modelo como esse, a utilização de estratégias da genética quantitativa para fazer o particionamento de gradientes de seleção pode revelar a influência de cada hospedeiro sob caracteres sob seleção (Gómez-Cendra, 2016; Wood e Brodie, 2016) e indicar não apenas que caracteres apresentariam maior plasticidade fenotípica e adaptação a diferentes hospedeiros e que caracteres seriam mais fiéis à contingência histórica, ou seja às relações filogenéticas. Assim, a combinação de abordagens de análise morfométrica (testando o sinal filogenético, métodos filogenético comparativo – Adams e Collyer, 2018) com estratégias para se medir a resposta à seleção (aplicando a equação de Lande, 1979) tem o potencial de auxiliar no entendimento de processos adaptativos e identificar os caracteres mais confiáveis para a identificação de espécies e que caracteres seriam mais plásticos, e que poderiam até mesmo ser úteis para indicar de que hospedeiros determinadas moscas teriam eclodido.

A caracterização das mudanças morfológicas que diferenciam espécies pode ser obtida pelo uso de métodos morfométricos geométricos (GM), que capturam as variáveis de forma multidimensional e as quantificam em um contexto filogenético (Collyer et al., 2015). Por outro lado, para investigar a resposta de características, estudos de plasticidade fenotípica permitem explorar os efeitos ambientais por meio de uma matriz de variância-covariância fenotípica (P) para entender a evolução de características complexas (Roff et al., 2000; Chevin e Lande, 2015). A estrutura de covariância da matriz P baseada na equação de Lande (1982) quando invertida permite extrair a magnitude dos gradientes de seleção diretamente dos caracteres. A covariância também revela a correlação devido a um potencial efeito pleiotrópico em uma estrutura genética e permite prever tanto padrões de respostas compartilhadas à seleção, quando identificar tendências específicas das características em um contexto evolutivo (Savell et al., 2016).

No presente estudo, utilizamos de uma abordagem multivariada para analisar padrões de evolução de diversos caracteres morfológicos em espécies do gênero *Anastrepha*. O objetivo principal desse estudo é testar a existência de sinal filogenético em caracteres frequentemente utilizados na identificação e diferenciação de espécies desse gênero e comparar com o padrão encontrado em outros caracteres morfológicos. Assim, a avaliação da presença de sinal filogenético nestas estruturas permite identificar se a variação morfológica apresenta estruturação filogenética, indicando sua adequação para identificação de espécies, ou se esta é diluída por influência ambiental, indicando plasticidade. Para tanto, avaliamos inicialmente padrões morfológicos em um contexto filogenético de diversas espécies representativas da diversidade do gênero *Anastrepha*, mas também testamos e quantificamos a influência ambiental de diferentes hospedeiros sobre duas das mais importantes espécies do grupo *fraterculus*, *A. obliqua* e *A. fraterculus* sp 2. Primeiramente, dentro de uma abordagem

univariada inferimos se há diferenças entre nove medidas lineares de moscas advindas de três hospedeiros de uma mesma população que possam refletir adaptação e plasticidade a diferentes hospedeiros que possam interferir em nossa capacidade de identificação e separação de espécies no grupo.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Dados para análise do sinal filogenético da forma e distâncias lineares

A coleta de frutos contemplou uma diversidade de hospedeiros que permitisse amostrar a maior amplitude de grupos de espécies do gênero *Anastrepha*, priorizando espécies do grupo *fraterculus*. Os frutos coletados foram mantidos em recipientes com vermiculita até as larvas de mosca-das-frutas empuparem, quando estas eram então transferidas a recipientes de 30 x 30 x 40 cm, onde o ciclo é completado até a emergência e maturação dos adultos, a uma temperatura de 27°C com 70% de umidade e fotoperíodo natural.

Os indivíduos sexualmente maduros foram identificados seguindo a descrição taxonômica de Zucchi (2000) e posteriormente congelados em freezer -20°C para o procedimentos de montagem e medição. Em função da importância do acúleo como caráter taxonômico, restringimos nossas análises a fêmeas sexualmente maduras.

Amostras de diversos frutos hospedeiros permitiram a amostragem de nove espécies de *Anastrepha* pertencentes a cinco grupos diferentes: grupo *striata* (*Anastrepha bistrigata* - Abis, n=19); grupo *grandis* (*A. grandis* - Agra, n=19); grupo *pseudoparallela* (*A. pseudoparallela* - Apse, n=9); grupo *serpentina* (*A. serpentina* - Aser, n=13); grupo *fraterculus* (*A. distinta* - Adis, n=33; *A. sp2 aff. fraterculus* - Afra, 45; *A. sororcula* - Asor, n=18; *A. obliqua* - Aobl, n=296; *A. turpiniae* - Atur, n=31) (Tabela S1).

Cada indivíduo foi seccionado em quatro estruturas: asa direita e acúleo foram permanentemente montados em um lâmina sob uma lamínula com bálsamo do Canadá, a cabeça e tórax foram montados em um suporte com régua visível para evitar distorção durante a digitalização. As imagens foram digitalizadas usando o estereomicroscópio Olympus (Olympus SZX7) com câmera acoplada. As coordenadas de “landmarks” e as medidas lineares das estruturas foram adquiridas usando tpsDIG2 (Rohlf, 2014), os marcos anatômicos (*landmarks*) e medidas euclidianas utilizados estão descritos na Tabela S2 e na Figura S1, compreendendo um total de 14 marcos anatômicos posicionados na asa direita, 7 no acúleo, quatro na perna, 16 na cabeça e quatro no tórax. Estes marcos anatômicos foram alinhados usando uma análise generalizada de Procrustes (GPA; Rohlf e Slice, 1990), em que as superposições removem fatores de tamanho, posição e orientação das coordenadas da forma. A GPA foi realizado utilizando o pacote geomorph v.3.06 (Adams et al., 2016), no qual foi também feita a checagem de “outliers” com a ferramenta plotOutliers. Nove distâncias lineares foram medidas, três no acúleo (AA, AWS e AWN), duas na cabeça (HEL e HW), duas na asa (WL e WW) e duas no tórax (TL e TW). Para ambas as abordagens utilizadas nas análises morfológicas, de marcos anatômicos e distâncias euclidianas, medimos a associação entre as duas réplicas dos indivíduos usando procedimento de Lessels e Boag (1987) na função CalcRepeatability do pacote evolqg (Melo et al., 2015).

3.2.2. Dados para avaliar a plasticidade

As mesmas medidas descritas acima também foram utilizadas para avaliar o efeito de diferentes hospedeiros em duas espécies polífagas, analisando matrizes de variância e covariância morfológicas que permitem particionar o efeito da plasticidade (van der Linde e Houle, 2009; Márquez et al., 2012) (Table S1, S2). As espécies utilizadas nesta análise foram *Anastrepha obliqua*, n = 296 (total nascido de três hospedeiros distintos) e *Anastrepha sp2*

aff. fraterculus, n = 89 (total nascido de três hospedeiros distintos), que são frequentemente encontradas explorando diferentes plantas hospedeiras. Nesta análise, comparamos indivíduos de uma população de *Anastrepha sp2 aff. fraterculus* coletadas de três hospedeiros, *Eugenia uniflora* (Af_Eu), *Eugenia brasiliensis* (Af_Eb) e *Psidium guajava* (Af_Pg) na cidade de Belo Horizonte-MG (19°51'9"S 43°59'37"W). Analisamos também uma população de *Anastrepha obliqua* coletada de três hospedeiros distintos, *Spondias dulcis* (Ao_Sd), *Eugenia pyriformes* (Ao_Ep) e *Averrhoa carambola* (Ao_Ac) na cidade de São Carlos, SP (22°1'34"S 47°54'27"W) (Table S1, S2).

3.2.3. Análise Estatística

3.2.4. Métodos Comparativos Filogenéticos

As divergências inferidas por marcos anatômicos e por distâncias euclidianas foram comparadas com a divergência filogenética inferida por dados genéticos para avaliar o sinal filogenético destes caracteres.

Dados de transcriptomas gerados de indivíduos das mesmas populações das nove espécies aqui investigadas (Congrains, 2017), coletados à mesma época, foram utilizados para se fazer uma inferência das relações filogenéticas entre as mesmas (Figura S2). A montagem e alinhamento foram feitos de acordo com procedimentos descrito em Congrains (2017). Foram retidos apenas genes para os quais todo o CDS estivesse completo e presente em cada uma das espécies aqui estudadas, perfazendo um total de 3964 genes. Os dados destas sequências foram alinhados por MAFFT (Katoh, 2017) e as árvores filogenéticas foram inferidas para cada gene por máxima verossimilhança usando RAxMLv8 (Stamatakis, 2014) sob o modelo GTRGAMMA. As topologias inferidas para cada gene foram utilizadas como input para a inferência de uma árvore de espécies utilizando o software Astral (Zhang et al., 2017) dado o conjunto de árvores de genes não-enraizadas sob um modelo coalescente.

Para a edição de ramos, utilizamos a função “drop.tip” do pacote ape v.5 no ambiente R (Paradis, 2004, 2017).

Para testarmos sinal para a forma das estruturas aplicamos uma estatística K generalizada multivariada com teste de permutação em que valores randomizados de K (Blomberg’s K) são obtidos em cada permutação, com 1.000.000 de iterações (Kmult, Adams 2014) sob um modelo de evolução Browniano (BM) (Blomberg et al., 2003; Harmon e Glor 2010), de forma que valores de $K_{observado} < 1.0$ demonstram um menor sinal filogenético do que o esperado, enquanto $K_{observado} > 1$ indicam dados com maior sinal filogenético do que o esperado.

Para as distâncias euclidianas, aplicamos os índices λ (Lambda) (Pagel 1999), K , $K.star$ (Blomberg et al. 2003), Índice I de Moran (Gittleman e Kot 1990) e $Cmean$ (Abouheif 1999), utilizando o pacote phylosignal (Keck et al., 2016) em R version 3.3.3 (R Core Team 2017). Os três primeiros parâmetros assumem o modelo BM para evolução dos caracteres. O λ de Pagel fornece a dependência filogenética nos caracteres observados assumindo o BM como modelo evolutivo, para estimar a matriz de covariância esperada, testando se os dados se encaixam em BM, e pode apresentar valores maiores que 1 (não frequentemente, por utilizar a diagonal das matrizes), indicando maior similaridade esperada. Já o K de Blomberg funciona como acima descrito, indicando a magnitude do sinal, sendo que valores altos de K indicam forte similaridade entre as espécies relatadas seguindo BM (Blomberg et al., 2003). O índice $K.star$ mede é a razão entre os quadrados médios calculados a partir dos dados observados assumindo uma filogenia estrela com pontas contemporâneas ou a topologia de fato observada (Blomberg et al., 2003).

Os índices I de Moran e o $Cmean$ de Abouheif são índices de autocorrelação não baseados em modelos evolutivos e não fornecem informação da magnitude do sinal

filogenético (Munkemuller, 2012). O índice I de Moran compara o valor de cada caráter de um táxon com média ponderada de outros *taxa* relacionados para detectar autocorrelação filogenética (Gittleman and Kot 1990), sendo que o valor esperado sob a hipótese nula é dado por $I_0 = 1/(n-1)$. Se o valor observado de I for significativamente maior que I_0 , os valores de x serão positivamente autocorrelacionados indicando similaridade, enquanto se $I < I_0$, indicará autocorrelação negativa, ou uma dissimilaridade, já valores próximos de zero indicam uma possível distribuição aleatória. O teste C_{mean} de Abouheif é um teste de interdependência baseado no quadrado das diferenças das espécies mais próximas, sendo uma adaptação da autocorrelação para aplicação filogenética e quantifica o nível de correlação dos caracteres observados sem providenciar um modelo para explicar a variação.

Para visualizar e investigar os padrões evolutivos utilizamos a abordagem filomorfoespaço (sensu Sidlauskas, 2008), na qual a filogenia foi projetada no morfoespaço (médio) inferido dos marcos anatômicos mensurados e distâncias euclidianas, permitindo detectar a trajetória das mudanças evolutivas nas formas e distâncias nos dois primeiros eixos do espaço usando Análises de Componentes Principais (PCA) (Serb et al., 2017). Para testar as diferenças entre as formas e distâncias das espécies do grupo *fraterculus*, usamos MANOVA nos scores dos PCs (componentes principais).

Para testar se a divergência das espécies ocorreu seguindo um modelo aleatório, ou foi direcionada por seleção em função da matriz ancestral, reconstruída a partir das espécies de interesse, realizamos testes de deriva usando o pacote *evolqg* (Melo, 2015). A regressão compara se as matrizes W (matrizes ponderadas dentro dos ramos, construída usando a ferramenta *PhyloW*) e B (matriz inferida pelos comprimentos entre os ramos, correspondente a variância dos contrastes filogenéticos independentes – *phylogenetic independent contrasts* – PIC) apresentam desvios de proporcionalidade. A hipótese nula de deriva só é rejeitada se a

inclinação nos nós da filogenia estiver significativamente acima ou abaixo dos limites da deriva (Ackermann e Cheverud, 2000).

Subsequentemente, aplicamos o teste de correlação dos PCs, no qual o produto da correlação de Pearson é aplicado sobre os PCs da matriz (o autovetor da matriz W, usando PIC), sendo que a existência de correlação pode indicar pressões seletivas correlacionando ou co- selecionado as dimensões. A hipótese nula de deriva só é rejeitada quando em pelo menos um par de comparações houver correlação significativa após a correção de Bonferroni ($n-1$, n =número de espécies).

3.2.5. Análises de plasticidade

Para testarmos a presença de seleção e plasticidade nos caracteres em resposta a diferentes hospedeiros, aplicamos modelos lineares gerais ajustados para investigar o efeito da plasticidade fenotípica em resposta a diferentes hospedeiros em duas espécies polípagas do grupo *fraterculus*, *A. obliqua* e *A. sp2 aff. fraterculus*, além de testes com regressão linear simples (Tabela S7). Nós ajustamos o modelo considerando o fruto hospedeiro como efeito fixo, permitindo prever a plasticidade dos nove caracteres. Assim, o modelo misto Bayesiano além de permitir extrair os vetores de plasticidade para as três frutas hospedeiras utilizadas por cada espécie, também avalia a matriz de variância/covariância genética (matriz P) para cada espécie amostrada. O vetores de plasticidade consistem em uma distância inferida para cada característica que foi construído com base na distribuição do modo posterior do modelo (Lind et al., 2015). O modelo foi executado em 200.000 iterações MCMC amostradas em intervalos de 1.000 iterações após um *burn-in* de 15.000 iterações para estimar os componentes de variância e suas correlações genéticas, implementado no pacote MCMCglmm com distribuição Gaussiana (Hadfield, 2010).

A matriz P inferida para cada espécie permite prever a direção da divergência fenotípica, uma boa predição da direção de seleção. A resposta evolutiva de uma decomposição de um conjunto de características quantitativas pode ser descrita pela equação:

$$\Delta z = G\beta, \quad (1)$$

em que Δz é o vetor de diferenças em médias fenotípicas para características entre gerações, β é o vetor de gradiente esperado de seleção e G é a matriz genética aditiva de variância/covariância (Lande, 1979). No caso, utilizamos a matriz P (matriz fenotípica) seguindo a “Conjectura de Cheverud”, no qual as matrizes G e P são altamente similares e correlacionadas, pela dinâmica evolutiva a que ambas são submetidas, de forma que P pode ser potencial substituta de G devido às dificuldades em se estimar a matriz G (Cheverud, 1988; 1996).

Uma vez obtida a matriz P, podemos prever os Δz esperados com base na estrutura de covariância para comparar com os Δz observados para cada fruto hospedeiro, reconstruídos a partir dos vetores de gradiente de seleção usando P^{-1} (inverso da matriz P) (Lande, 1979; Lofsvold, 1988; Cheverud, 1996).

Em geral, insetos herbívoros podem exibir plasticidade fenotípica quando emergem de plantas hospedeiras diferentes e isso pode ter um efeito significativo sobre a mudança evolutiva no uso do hospedeiro. Testamos a hipótese nula de que indivíduos da mesma espécie provenientes de frutos hospedeiros diferentes não apresentam diferença morfológica significativa. Alternativamente se detectamos diferença significativa, estimamos o quanto desta mudança é em função da plasticidade, a qual pode conduzir a uma associação adaptativa à planta hospedeira por uma resposta evolutiva à seleção (Wang et al., 2017).

Assim, nós predizemos os vetores de plasticidade para cada hospedeiro (baseados na distribuição posterior de cada modelo) e inferimos a correlação destes vetores (e ângulos

entre as respostas) com a resposta de plasticidade à seleção (Δz para cada hospedeiro); gradientes de seleção (β), e o maior eixo de variação da matriz P de variância-covariância (V-CV) de cada espécie (P_{\max}) (primeiro componente da matriz fenotípica) (Robinson e Beckerman, 2013).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Métodos comparativos filogenéticos

A repetibilidade variou entre 0.92 e 0.997 para a forma das estruturas analisadas (acúleo, asa, cabeça e tórax), enquanto para as nove distâncias euclidianas variou entre 0.72 e 0.94, indicando que a variância devido ao erro é baixa. Nós analisamos 486 indivíduos para a forma das quatro estruturas e 418 indivíduos para as nove distâncias entre nove espécies para cada estrutura. A média e desvio-padrão dos fenótipos aqui utilizados estão na tabela S4).

Para avaliarmos a tendência do padrão filogenético na evolução morfológica, nós combinamos os dados morfológicos, com a árvore filogenética, a qual representa a distância resultante estimada por CDS completos (3964) (Congrains, 2017) para todas as espécies aqui estudadas,. O teste de sinal filogenético para as nove espécies entre grupos e dentro do grupo *fraterculus* para forma e tamanho do centróide utilizando a estatística K de Blomberg mostrou que a forma da asa é menos similar do que o esperado sob movimento Browniano ($K < 1$) quando comparamos os grupos de espécie amostrados aqui e mais similar do que esperado entre espécies do grupo *fraterculus* (Tabela 1), enquanto o tamanho do centróide, que representaria as diferenças alométricas, não apresentou índice significativo. Os testes para avaliar sinal filogenético para forma e tamanho do centróide para acúleo, cabeça e tórax não indicaram índices significativos. Os testes filogenéticos para as distâncias euclidianas, por se tratar de tamanhos amostrais restritos, foram computados incluindo outros métodos

(CMeans, Índice I de Moran, K-Star e λ de Pagel). O índice CMeans indicou que AA e AWN podem ser mais similares entre os grupos do que o esperado; já o Índice I de Moran e o K-star indicam que as espécies se assemelham mais do que esperado para AA, AWN e HEL, enquanto HW, WL e WW se assemelham menos do que esperado. Já o K de Blomberg e o λ de Pagel mostram que a variação em AA é compatível com as relações filogenéticas sob BM. Um λ de Pagel maior que 1 sugere que a taxa de evolução de uma característica é maior na raiz do que nas pontas (Tabela 1). A comparação dentro do grupo *fraterculus* revelou que de acordo com os testes K de Blomberg e K.star apenas AA pode apresentar estruturação filogenética, enquanto o I de Moran evidencia menor autocorrelação do que esperado, no entanto, a ausência de sinal para as outras medidas sugere que a distribuição da variação morfológica provavelmente não é explicada unicamente pela estrutura filogenética sob BM (Tabela 1) (Keck et al., 2016).

Os gráficos do filomorfoespaço (combinação das médias com a árvore filogenética) para as distâncias euclidianas mostraram o grupo *fraterculus* estruturado e separado dos outros grupos, embora esta separação apresente ramos mais curtos para acúleo e asa, evidenciando alta proximidade entre as espécies dentro do grupo. Já os gráficos do filomorfoespaço da forma não mostraram a mesma estruturação para o grupo *fraterculus*, uma vez que observamos alguns ramos cruzando o morfoespaço de outros grupos, como *A. sororcula* na forma do acúleo (Figura 1 - B) ou inter cruzando o morfoespaço do grupo *fraterculus*, como *A. bistrigata* para a forma da asa (Figura 1 - D) ou até mesmo apresentando ramos muito curtos com sobreposição como para o tórax (Figura 1 - H).

A Análise de Componentes Principais (PCA) realizada para as distâncias euclidianas (Figuras 2 a, c, e, g) e para os dados de marcos anatômicos (análise da forma) do acúleo, asa, cabeça e tórax (Figura 2 b, d, f, h) mostraram pouca divergência na distribuição da variação,

sendo insuficiente para separar completamente as espécies do grupo *fraterculus*, principalmente, pela ampla variação intraespecífica (Figura 2) (distâncias euclidianas- PC1: 62.07-90.25%; forma- PC1: 35.31-65.4%).

Apesar da pouca divergência dentro do grupo *fraterculus*, as MANOVAs realizadas nos escores dos PCs para os dados da forma de cada estrutura demonstram diferenças significativas dentro do grupo *fraterculus* para acúleo ($F_{4,345} = 24.082$, Pillai = 1.66, $p = 2.2e-16$), asa ($F_{4,406} = 18.214$, Pillai = 2.1243, $p = 2.2e-16$), cabeça ($F_{4,358} = 7.2154$, Pillai = 1.5076, $p = 2.2e-16$) e tórax ($F_{4,417} = 73.45$, Pillai = 1.6702, $p = 2.2e-16$). Da mesma forma, as MANOVAs feitas a partir os PCs derivados das distâncias euclidianas evidenciaram separação para acúleo ($F_{4, 361} = 156.51$, Pillai = 1.90, $p = 2.2e-16$), asa ($F_{4,361} = 195$, Pillai = 1.3672, $p = 2.2e-16$), cabeça ($F_{4,361} = 88.597$, Pillai = 0.99076, $p = 2.2e-16$), tórax ($F_{4,361} = 29.383$, Pillai = 0.49122, $p = 2.2e-16$). Portanto, as MANOVAs realizadas para os PCs da forma da estruturas e para as distâncias euclidianas não evidenciaram diferenças robustas que nos permitissem identificar diferentes espécies do grupo *fraterculus*.

Após a obtenção das matrizes baseadas em nove caracteres para todas as espécies e os testes acima descritos, reconstruímos a matriz ancestral, aplicamos o teste de regressão entre as matrizes B e W, o qual apontou deriva como uma das principais forças atuantes na mudança morfológica ao longo da estruturação dos grupos. No entanto, o teste de correlação dos PCs da matriz ancestral indicou que a seleção pode ter conduzido a evolução morfológica para estas espécies em uma dada direção, porque revelou que os PC1, PC2 e PC3 foram correlacionados para o nó 10 (mais basal), bem como os PC2 e PC3, da mesma forma que outros nós mostraram correlação significativa em pelo menos uma comparação entre os PCs de maiores e menores valores (Tabela S5, Figura S2).

3.3.2. Plasticidade

Os resultados sugerem ampla distribuição da variação intraespecífica para diversos dos caracteres aqui investigados, desta forma testamos o efeito da plasticidade fenotípica e da seleção como fator preponderante em direcionar a variação, possivelmente dissipando o sinal filogenético para os caracteres e espécies do grupo *fraterculus* aqui estudados.

Nas análises de regressão linear aplicadas nas distâncias fenotípicas (com médias e desvio-padrão na Tabela S4) de *A.obliqua* ($n_{Uvaia}= 32$; $n_{Cajamanga} = 20$; $n_{Carambola}=243$) e *A. sp2 aff. fraterculus* ($n_{grumichama} = 10$; $n_{goiaba}=38$; $n_{pitanga}=41$), encontramos indícios de plasticidade, já que a maioria das distâncias lineares indicou influência significativa da planta hospedeira e apresentou diferenças entre os espécimes que exploraram distintos hospedeiros (Tabela S7, Figura S3 e S4).

Buscando entender o efeito das plantas hospedeiras sobre as características, estimamos as matrizes de variância-covariância fenotípica (P) de cada espécie. Para *A. obliqua*, os caracteres do acúleo não apresentaram correlação entre si e nem com outros caracteres. O comprimento do olho (HEL) foi positivamente correlacionado com a largura da cabeça (HW), e também com o comprimento (WL) e largura da asa (WW), comprimento (TL) e largura do tórax (TW). WL apresentou significativa correlação positiva com WW, TL e TW, enquanto os caracteres do tórax foram correlacionados entre si. Comparações em *A. fraterculus* revelaram mais associação entre medidas das mesmas estruturas, mostrando correlações positivas entre AWS-AWN, HEL-HW, WL-WW e TL-TW. Para a comparação entre estruturas, foram encontradas correlações positivas significativas em HEL com TL e TW (Tabela 2).

O vetor normalizado de plasticidade baseado em múltiplos caracteres, extraído da distribuição posterior após aplicação do modelo geral misto completo, permitiu particionar o efeito de cada hospedeiro nas duas espécies, indicando que as plantas hospedeiras impactaram as distâncias lineares em diferentes magnitudes (Tabela 3). Moscas *A. obliqua*

criadas em uvaia (Ao_Ep) apresentaram o maior efeito negativo (no ápice do acúleo), enquanto moscas de cajamanga (Ao_Sd) o maior efeito positivo (no comprimento dos olhos). Já em *A. fraterculus*, moscas emergidas de pitanga (Af_Eu) mostraram maior efeito negativo (no comprimento das asas), enquanto moscas nascidas de goiaba (Af_Pg) o maior efeito positivo, no ápice do acúleo.

Para testarmos a hipótese de associação adaptativa ao hospedeiro, testamos o alinhamento dos vetores normalizados entre moscas que eclodiram de frutos diferentes. Para *A. obliqua*, moscas que saíram de carambola (Ao_Ac) mostraram correlação negativa ($\theta = -0,95$) tanto com moscas que saíram de uvaia (Ao_Ep), quanto com moscas derivadas de cajamanga (Ao_Sd), revelando que os vetores estão em direção oposta, impactando as características das populações distintamente. Por outro lado, moscas de uvaia e cajamanga exibiram correlação positiva ($\theta = 0,84$) que indica um alinhamento entre esses vetores que possivelmente afeta os caracteres de forma semelhante. Em *A. fraterculus*, o teste de alinhamento aplicado entre vetores de moscas derivadas de grumichama (Af_Eb) revelou correlação negativa na comparação com moscas saídas de pitanga (Af_Eu) ($\theta = -0,91$), bem como com moscas criadas em goiaba (Af_Pg) ($\theta = -0,84$), evidenciando potencial impacto distinto. Por sua vez, moscas eclodidas dessas duas últimas (pitanga e goiaba) mostraram correlação positiva, indicando impactos similares nos caracteres medidos ($\theta = 0,59$).

Para avaliarmos se a variância genética apresentou associação significativa à plasticidade fenotípica, testamos o alinhamento entre o vetor de plasticidade de cada hospedeiro (Plast) e o maior eixo de variação da matriz de variância e covariância de cada espécie (P_{\max}). Encontramos um alinhamento moderado positivo entre o vetor de plasticidade de carambola (Ao_Ac) e P_{\max_Ao} ($\theta = 0,38$, PC1 = 37.69%) em *A. obliqua*, entre o vetor de grumichama (Af_Eb) e o P_{\max_Af} ($\theta = 0,48$, PC1=27.68%) em *A. sp2 aff. fraterculus*. Para as

outras plantas-hospedeiras não conseguimos encontrar um alinhamento positivo (Tabela 3). Além disso, testamos a associação dos vetores de plasticidade com a resposta evolutiva (Δz), bem como os gradientes de seleção (β), nesta predição encontramos tanto os vetores de resposta à seleção quanto de seleção altamente correlacionados com os vetores de plasticidade para ambas as espécies na maioria dos hospedeiros, dado que indica possível adaptação ao hospedeiro (Tabela 4, Tabela S6).

3.4. DISCUSSÃO

A investigação da variação morfológica intra- e interespecífica utilizando uma abordagem multivariada permite compreender padrões adaptativos e a magnitude da resposta à seleção e da plasticidade fenotípica (King, Roff e Fairbairn, 2011). Com base em um modelo linear misto, investigamos a influência de diferentes plantas hospedeiras na morfologia de duas espécies polífagas, *A. sp2 aff. fraterculus* e *A. obliqua*, que revelaram diferenças entre diferentes hospedeiros, cuja a magnitude variou entre os diversos caracteres mensurados. Esse índice, medido pela plasticidade de moscas emergidas de diferentes espécies de hospedeiros, influenciou principalmente o ápice (AA) e a largura da seção não-serrada do acúleo (AWN), o tamanho do olho (HEL), a largura da cabeça (HW), e o tamanho (WL) e largura da asa (WW) para ambas as espécies, que também mostraram efeito significativo dos hospedeiros por modelos lineares simples (Tabela S7). As características foram escolhidas não apenas porque são relevantes na identificação de espécies e grupos de espécie de *Anastrepha* (Hernández-Ortiz et al., 2004, 2012, 2015) mas também por estarem envolvidas direta ou indiretamente em diferentes funções, tais como na escolha de parceiro, corte, acasalamento e oviposição, o que faz com que possam estar sujeitas a diferentes mecanismos seletivos (Rodríguez et al., 2002a, b).

O alinhamento entre os vetores de plasticidade também evidenciou que os hospedeiros impactam os caracteres em diferentes magnitudes nas duas espécies estudadas. Em *A. obliqua*, moscas derivadas de cajamanga (Ao_Ep) e uvaia (Ao_Sd) mostraram uma correlação positiva ($\theta = 0.84$), indicando que seus caracteres respondem similarmente a estes hospedeiros (Tabela 3), enquanto correlações negativas entre os vetores indicam que os hospedeiros impactam os caracteres de maneira oposta. Também encontramos um padrão semelhante para *A. sp2 aff. fraterculus*, em que moscas emergidas de pitanga e goiaba apresentaram correlação positiva ($\theta = 0.59$), indicando que seus caracteres medidos foram impactados de forma semelhante.

Encontramos associação entre as espécies e seus hospedeiros quando os vetores de plasticidade estão alinhados com os vetores Δz (resposta à seleção), o que foi observado para a maioria dos hospedeiros tanto em *A. fraterculus* como em *A. obliqua*. Como as moscas derivadas de hospedeiros diferentes não foram investigadas para avaliar se apresentam diferenças genéticas, é possível que esteja havendo adaptação a frutas distintas, ou mesmo diferenciação populacional, refletindo uma subestrutura populacional. Embora isso tenha sido reportado em moscas *A. fraterculus* derivadas de hospedeiros diferentes na Argentina (Oroño et al. 2013), consideramos que isso seja pouco provável que esteja acontecendo entre estas populações, não apenas porque outros estudos realizados com *A. fraterculus* no Brasil (Malavasi e Morgante, 1983), ou com *A. obliqua* na Colômbia (Aguirre-Ramirez et al., 2017), não encontraram esta diferenciação entre moscas emergidas de hospedeiros diferentes. Como *A. fraterculus* e *A. obliqua* são polípagas e multivoltinas, é possível que as moscas surgidas de frutas diferentes em áreas próximas representem uma única população genética, particularmente em se considerando a grande similaridade genética encontrada para essas

espécies mesmo para áreas muito mais extensas (Sobrinho e de Brito, 2010, 2012; Díaz et al., 2018).

Como nossos dados sugerem que haja uma diferença morfológica entre moscas emergidas de hospedeiros diferentes, e é pouco provável que isso esteja associado a uma subestrutura populacional, é possível que esta diferenciação seja reflexo de plasticidade fenotípica que pode estar modulando e promovendo a evolução de caracteres alinhada a resposta à seleção (Draghi e Whitlock, 2012). Contudo, devemos considerar que a matriz de variância / covariância determina o padrão de resposta dos fenótipos a pressões de seleção. Dependendo do grau de integração entre caracteres distintos, a resposta destes caracteres a pressões de seleção poderá ser limitada, quando há pouca integração entre estes (Marroig e Cheverud, 2005), ou pode acontecer seguindo “caminhos de menor resistência evolutiva” (“Lines of Least Evolutionary Resistance”). A determinação de correlações significativas entre caracteres distintos auxilia a encontrar estas LLER, que podem ser descritas como vias pelas quais as populações respondem a pressões de seleção mais facilmente e de forma mais integrada, uma vez que há mais variação genética aditiva nesse sentido, favorecendo a resposta adaptativa. Assim, a correlação positiva encontrada em *A. obliqua* entre a largura da cabeça (HW), largura da asa (HW), comprimento da asa (WL), comprimento do tórax e também largura do tórax (TW), que pode ser simplesmente alométrica, facilita com que respondessem na mesma direção da seleção para hospedeiros diferentes (Tabelas 2 e 4) (Lind et al., 2015).

O perfil de ação da seleção nas características ao longo do tempo pode revelar se a adaptação foi modulada pela variação genética, tendo sido reprimida ou favorecida (McGuigan e Blows, 2007; McGuigan e Sgro 2009; Pemberton 2010; Wood e Brodie, 2016). Nós encontramos uma correlação positiva moderada com o maior eixo de variação (P_{max}) em

A. obliqua emergidas de carambola (Ao_Ac), com um alinhamento moderado de $\theta=0,38$ e com *A. sp2 aff. fraterculus* emergidas de grumichama (Af_Ep), com um alinhamento de $\theta=0,48$. Em ambos os casos, este alinhamento moderado sugere que a adaptação destas espécies a estes hospedeiros foi favorecida e seguiu a linha de maior variação (alométrica) (Marroig e Cheverud, 2005). No entanto, para os outros hospedeiros que apresentaram uma correlação negativa com P_{max} , é possível que houvesse menor variância genética disponível para estas adaptações, já que a seleção favoreceu divergência na direção oposta de P_{max} , tendo uma taxa de evolução mais lenta e não seguindo o componente alométrico (Schluter, 1996; Marroig e Cheverud, 2005), sugerindo que a mudança possa ter seguido em outras dimensões (nos PCs de menor proporção de variância) ou mesmo em menor ritmo (Marroig e Cheverud, 2005).

A extensão da mudança é relacionada ao efeito da variância e covariância entre caracteres associada às variáveis ambientais, consequentemente determinando a resposta à seleção, relacionadas ao processo adaptativo, ou seja, as forças que modulam a diferenciação morfológica (Chevin et al., 2015). Nosso estudo mostrou que os vetores de plasticidade e de seleção estão alinhados para a maioria dos hospedeiros nas duas espécies (Tabela 4), indicando que a direção da seleção está alinhada à plasticidade, como nas medidas do acúleo que apresentaram mudanças em maior magnitude nas duas espécies, evidenciando que as mudanças dos caracteres podem ter sido na direção da adaptação aos hospedeiros (Tabela 3), e não seguindo expectativa de evolução modulada por deriva segundo um modelo Browniano.

Uma vez que a seleção a hospedeiros distintos pode ter tido um papel preponderante na diferenciação em *A. obliqua* e *A. sp2 aff. fraterculus*, é possível que o mesmo tenha ocorrido em outras espécies do grupo *fraterculus*, ou mesmo em espécies de grupos diferentes no

gênero *Anastrepha*, principalmente para adaptação aos hospedeiros, uma vez que detectamos correlação dos PCs da matriz ancestral (matriz W) em um dos testes de deriva. Essa associação indica que modelos evolutivos aleatórios em caracteres correlacionados e co-selecionados não são suficientes para explicar a diferenciação morfológica entre espécies do grupo, o que faz sugerir que a seleção pode ter moldado a evolução fenotípica (Assis et al. 2017), pelo menos para alguns dos caracteres aqui investigados em *Anastrepha*.

Algumas espécies de *Anastrepha* utilizam-se de fato de um reduzido número de hospedeiros, como *A. grandis*, que é preferencialmente encontrada em Cucurbitaceae, *A. serpentina*, preferencialmente encontrada em Sapotaceae e *A. pseudoparallela*, normalmente encontrada em Passifloraceae, o que pode fazer com que uma pressão de seleção favorecendo sua adaptação e especificidade a estes hospedeiros tenha promovido um desvio de nossa expectativa de evolução neutra para caracteres importantes a tal adaptação. Já outras espécies apresentam uma grande amplitude de hospedeiros, particularmente no grupo *fraterculus*, o que torna possível que adaptações locais a diferentes hospedeiros criem diversidade e variabilidade dentro de espécies, e potencial convergência entre espécies que se utilizam de hospedeiros comuns. Trabalhos prévios indicam variação intra- e interespecífica em medidas de acúleo, e mesmo sobreposição entre medidas de espécies diferentes em uma comparação de *A. sororcula*, *A. obliqua*, *A. fraterculus*, *A. zenildae* e *A. turpiniae* (Araújo e Zucchi, 2006). Uma exceção no padrão polífago do grupo *fraterculus* é *A. distincta*, que é preferencialmente associada a espécies de ingá (Fabaceae) (Zucchi, 2000). Em geral, a ampla exploração de hospedeiros estaria associada a diversificação morfológica em insetos fitófagos, bem como como comportamentos de cópula e quanto com estratégia de oviposição, como resposta a diferentes condições abióticas e bióticas (Otte et al., 2018).

O processo de adaptação a diferentes hospedeiros pode envolver diversos caracteres morfológicos, genéticos e bioquímicos, alguns que estão diretamente envolvidos com a adaptação ao hospedeiro, mas também outros que estão envolvidos com seleção sexual por influenciar a probabilidade de cópula entre indivíduos derivados dos mesmos hospedeiros (Segura et al. 2018). Diversas espécies apresentam preferência por parceiros que derivam dos mesmos hospedeiros, o que parece ser modulado por compostos secundários e outros derivados obtidos destes hospedeiros que conferem odores e feromônios específicos que são mais, ou menos, atrativos para parceiros sexuais (Papadopoulos et al., 2006; 2008), já demonstrado em diversos Tephritidae (Katsoyannos et al., 1997; Tan et al., 2014) e até mesmo em *Anastrepha* (Robacker et al., 1992). Além disso, outros odores quando presentes influenciaram também o sucesso da cópula (Vera et al., 2013; Bachmann et al., 2015). Da mesma forma, moscas de *Anastrepha ludens* (Loew) (Robacker e Fraser 2002a, 2002b, 2003; Malo et al. 2005), *Anastrepha suspensa* (Loew) (Nigg et al. 1994) e *A. obliqua* (Cruz-López et al. 2006, Malo et al. 2012) demonstram atratividade específica em machos por determinados frutos (Segura et al., 2018). Este processo reforça o potencial de que processos comportamentais ou fisiológicos que influenciam a cópula sejam influenciados pela adaptação a determinados hospedeiros (Dias et al., 2016).

Alguns destes caracteres podem não ser diretamente influenciados pelo hospedeiro, mas estão sujeitos à seleção sexual, como o tamanho dos olhos (HEL), que são utilizados por fêmeas como caráter importante na escolha de parceiros para a reprodução (Sciurano et al., 2007; Segura et al., 2007), ou o comprimento das asas (WL) que está diretamente relacionado aos sinais acústicos da asa e sustentação na performance da corte (Bachmann et al., 2015), e apresentaram bastante plasticidade entre espécies de *Anastrepha*.

Um balanço entre seleção natural e seleção sexual agindo em caracteres distintos, ou até mesmo sinérgica- ou antagonisticamente nos mesmos caracteres, pode ser determinante para a manutenção dos padrões do sistema de cópula em espécies de Tephritidae em geral, e de *Anastrepha* em particular, sendo influenciados por aspectos visuais (como o tamanho do olho), químicos (compatibilidade por feromônio) e físicos (sinais acústicos) (Segura, 2018).

Padrões de compatibilidade associados à plasticidade de alguns fenótipos, induzidos pela influência ambiental (particularmente o hospedeiro), possivelmente imprimem marcas (mudanças) de comportamento que podem ser herdadas pela transferência para a prole por padrão alternativo ao Mendeliano, transgeracional, por epigenética. Estas marcas epigenéticas como metilação ou acetilação podem permitir que o estímulo ambiental que propiciou mudanças comportamentais possa ser herdado determinando a especificidade ao hospedeiro e por ventura pode culminar em processos de especiação (Frias,2014).

Por outro lado, a independência ou não da evolução dos caracteres em um contexto filogenético é um questão central para se determinar a influência da seleção na diferenciação morfológica das espécies, principalmente na adaptação. Uma vez que espécies de *Anastrepha* não apenas divergiram recentemente, mas também compartilham diversos hospedeiros (Blomberg, 2003, Mengual et al., 2017), expostas à seleção sexual em função de reprodução por *leks* (Segura et al., 2007), a presença de sinal filogenético pode revelar se a evolução dos caracteres seguiu uma tendência aleatória ao longo dos ramos da árvore utilizando um modelo de movimento Browniano (BM), enquanto a ausência desse sinal filogenético revela que a evolução desses caracteres foi modulada por outras forças direcionando a variação fora da neutralidade (Revell et al., 2008).

Nós encontramos sinal filogenético significativo apenas em caracteres do acúleo (AA e AWS) e da asa (WL) entre os grupos do gênero *Anastrepha*, evidenciando a importância

destas características na separação entre os grupos, além de HEL, que é pouco considerada para análises taxonômicas, embora seja importante caráter na seleção sexual. No entanto, dentro do grupo *fraterculus*, apenas o ápice do acúleo (AA) e a forma da asa apresentaram sinal filogenético robusto, indicando que estas características podem ser utilizadas em análises taxonômicas, embora com precaução, já que outros caracteres medidos não apresentaram a tendência da estruturação filogenética reproduzida na variação morfológica (Adams, 2014).

Não surpreendentemente, em função da maior proximidade evolutiva entre membros do grupo *fraterculus*, detectamos que a separação entre espécies desse grupo é menos evidente do que entre espécies pertencentes a diferentes grupos no gênero *Anastrepha* nas demonstrações do filomorfoespaço das estruturas, mesmo quando considerando-se acúleo e asa, que são comumente utilizadas como caracteres-chave, mas mostraram ramos muito curtos que dificultam uma separação robusta entre espécies (Figura 1).

A ampla distribuição da variação intraespecífica visualizada nas Análises de Componentes Principais (PCA) para vários caracteres aqui investigados, quer seja usando dados de forma ou distâncias euclidianas (Figura 2), indicam na MANOVA dos PCs pouca divergência entre espécies do grupo *fraterculus*, o que possivelmente dificulta uma separação robusta utilizando apenas uma das abordagens ou limitando o número de caracteres utilizados para a identificação. Estratégias que vêm tendo sucesso em identificar e separar espécies do grupo *fraterculus*, e mesmo espécies crípticas na espécie *A. fraterculus*, têm utilizado análises discriminantes (Araújo et al. 1998; Hernández-Ortiz et al., 2004; 2012). Tem sido inclusive sugerido que a caracterização de alguns taxa de Tephritidae, inclusive em *Anastrepha*, seja feita pelo que se refere como sendo uma taxonomia integrativa (Schutze et al., 2017), que

propõe que uma multitude de evidências distintas seja considerada para o processo de identificação de espécies.

A falta de sinal filogenético pode ser também explicada pela existência de fluxo gênico entre espécies de *Anastrepha*, o que já foi sugerido entre algumas espécies do grupo *fraterculus*, como *A. fraterculus*, *A. obliqua* e *A. sororcula* (Scally et al., 2016; Díaz et al., 2018). Na verdade, já foram encontrados sinais de introgressão utilizando os mesmos dados aqui utilizados até mesmo entre espécies de *Anastrepha* de grupos filogeneticamente mais distantes como entre *A. serpentina* e espécies de grupo *fraterculus* (Congrains, 2017). A existência de fluxo gênico entre espécies próximas modifica nossa expectativa filogenética e dificulta a integração entre a filogenia e a evolução de caracteres morfológicos, uma vez que esta vai depender da história dos genes que estão envolvidos na determinação dessa estrutura, o que não necessariamente será comum para as diversas estruturas existentes (Sólis-Lemus et al., 2015).

Não obstante, a alta variação intraespecífica com estruturação filogenética para apenas alguns caracteres (sem sinal filogenético significativo para a maioria) e a detecção de plasticidade nas espécies polípagas associada com a resposta à seleção, bem como a caracterização da maioria dos caracteres testados, sugerem que propriedades dos hospedeiros podem ter tido um papel crucial no processo de adaptação de *Anastrepha*, além de dificultar o processo de identificação das espécies diferentes, particularmente aquelas que divergiram há pouco tempo. Este processo se mostrou importante particularmente para os caracteres ápice do acúleo (AA), largura da seção não-serrada do acúleo (AWN), tamanho (WL) e largura da asa (WW), tamanho do olho (HEL) e largura da cabeça (HW), o que é relevante uma vez que os primeiros são comumente utilizados para a identificação das espécies (Hernández-Ortiz et al., 2004; 2012; Araújo e Zucchi, 2006; Dias et al., 2016).

A existência de plasticidade fenotípica modulada por uma heterogeneidade ambiental, como, por exemplo, o uso de hospedeiros diferentes, pode diminuir as diferenças entre espécies e reduzir o sinal filogenético, principalmente em espécies que abrangem uma diversidade de ambientes, ou hospedeiros, como algumas aqui estudadas do grupo *fraterculus* (Messier et al. 2010; Burns e Strauss, 2012; Klingenberg, 2011). O sinal filogenético pode ser diluído pela alta variação intraespecífica, resultante das diferenças genéticas constitutivas dentro das espécies e da própria plasticidade fenotípica, que, influenciada pelo ambiente, pode tornar diferentes espécies mais similares e correlacionadas a fatores ecológicos (Messier et al., 2010; Burns e Strauss, 2012).

Diante da plasticidade apresentada por diversos caracteres morfológicos investigados entre espécies de *Anastrepha*, a evolução morfológica pode não ter seguido modelo Browniano de evolução, sendo mais compatível com uma resposta à seleção direcional, que pode ter sido por uma exploração dos hospedeiros. Especificamente, evidenciamos que alguns caracteres frequentemente utilizados para identificação de espécies de *Anastrepha*, em especial medidas da asa e acúleo, apresentam sinal filogenético, indicando que em geral são úteis para tal fim, mas devem ser considerados com precaução para esta identificação, uma vez que também apresentaram significativa plasticidade quando indivíduos emergidos de hospedeiros diferentes foram investigados.

Assim, um aspecto importante que deve ser considerado na identificação dessas espécies é uma avaliação de qual hospedeiro tais moscas eclodiram e a variação intraespecífica que podem apresentar, o que pode facilitar a identificação por estes caracteres mesmo de espécies crípticas reconhecidas para o grupo *fraterculus*, ainda que dependendo de uma abordagem quantitativa para um diagnóstico robusto.

Tabela 1. Teste de Sinal Filogenético para o total das espécies e para o grupo fraterculus, para a Forma, Tamanho do Centróide e Distâncias Euclidiana.

grupos	Cmean	I	K	K.star	Lambda	Forma	K
AA	0.4766*	0.0959*	1.124*	1.302*	1.1804*	Wing_sh	0.767(*)
AWS	0.1802*	0.0934*	0.93	1.236*	1.00	Wing_cs	0.753
AWN	-0.03	-0.03	0.72	0.78	0.56	Aculeus_sh	0.902
HEL	0.20	0.0638*	0.73	1.016*	0.81	Aculeus_cs	0.837
HW	0.07	-0.02*	0.47	0.78*	1.12	Head_sh	1.05
WL	0.22	0.04*	0.59	0.96	1.11	Head_cs	1.283
WW	-0.09	-0.12*	0.38	0.63*	0.00	Thorax_sh	0.884
TL	0.11	0.03	0.57	0.90	0.85	Thorax_cs	0.871
TW	0.244	0.07	0.353	0.094	0.19		
g.frat	Cmean	I	K	K.star	Lambda	Forma	K
AA	0.31954	-0.1173*	1.487327*	1.42718*	1.65058	Wing_sh	1.029548(*)
AWS	-0.50701	-0.31354	0.75058	0.77557	0.00005	Wing_cs	0.753
AWN	-0.06541	-0.21142	1.01411	1.01513	0.10253	Aculeus_sh	0.43
HEL	-0.53165	-0.30922	0.76319	0.78457	0.00005	Aculeus_cs	0.7529
HW	-0.53204	-0.30601	0.77031	0.79118	0.00005	Head_sh	0.3586046
WL	-0.58158	-0.31312	0.74882	0.77450	0.00005	Head_cs	0.3003383
WW	-0.31618	-0.26097	0.87521	0.88177	0.00005	Thorax_sh	0.3175666
TL	-0.63881	-0.32259	0.73243	0.75673	0.00005	Thorax_cs	0.378029
TW	-0.60304	-0.31794	0.74364	0.76576	0.00005		

AA, Ápice do Acúleo; AWS, Largura da seção serrada do Acúleo; AWN, Largura da seção não-serrada do Acúleo ; HEL, Tamanho do Olho; HW, Largura da cabeça; WL, Comprimento da Asa; WW, Largura da Asa; TL, Comprimento do Tórax; TW, Largura do tórax. Wing_sh, forma da asa; Wing_cs, centróide da asa; Aculeus_sh, forma do acúleo; Aculeus_cs, centróide do acúleo; Head_sh, forma da cabeça; Head_cs, centróide da cabeça; Thorax_sh, forma do tórax, Thorax_cs, centróide do tórax. (*)Significância para a forma com $p \leq 0.05$.

Tabela 2. Matrizes de Variância / Covariância e Correlação Entre caracteres mensurados em nove espécies

<i>A.obliqua</i>	AA	AWS	AWN	HEL	HW	WL	WW	TL	TW
AA	0.22	-0.22	0.16	0.07	0.10	0.10	0.08	0.06	-0.01
AWS	-0.08	0.55	0.22	-0.05	-0.09	-0.08	-0.04	-0.05	0.06
AWN	0.06	0.12	0.53	0.03	0.02	0.01	0.01	-0.08	-0.08
HEL	0.01	-0.01	0.01	0.08	0.41	0.17	0.18	0.21	0.21
HW	0.04	-0.05	0.01	0.09	0.52	0.46	0.47	0.41	0.40
WL	0.03	-0.04	0.01	0.03	0.24	0.51	0.75	0.39	0.39
WW	0.03	-0.02	0.00	0.04	0.24	0.38	0.51	0.42	0.41
TL	0.02	-0.03	-0.04	0.04	0.21	0.20	0.21	0.52	0.63
TW	0.00	0.03	-0.04	0.04	0.19	0.18	0.19	0.29	0.42
<i>A.fraterculus</i>	AA	AWS	AWN	HEL	HW	WL	WW	TL	TW
AA	0.65	-0.09	0	0.11	0.12	0.17	0.15	0.09	0.07
AWS	-0.06	0.67	0.49	0.09	0.06	0.05	0.11	-0.05	-0.05
AWN	0	0.33	0.65	0.07	0.03	0.1	0.16	0	-0.04
HEL	0.07	0.06	0.05	0.68	0.56	0.1	0.08	0.42	0.38
HW	0.08	0.04	0.02	0.37	0.63	0	0.02	0.42	0.44
WL	0.11	0.03	0.06	0.06	0	0.61	0.64	0.09	0.06
WW	0.1	0.07	0.1	0.06	0.02	0.41	0.66	0.11	0.1
TL	0.06	-0.04	0	0.29	0.28	0.06	0.07	0.69	0.59
TW	0.05	-0.03	-0.02	0.24	0.28	0.04	0.06	0.39	0.62

AA, Ápice do Acúleo; AWS, Largura da seção serrada do Acúleo ; AWN, Largura da seção não-serrada do Acúleo ; HEL, Tamanho do Olho; HW, Largura da cabeça; WL, Comprimento da Asa; WW, Largura da Asa; TL, Comprimento do Tórax; TW, Largura do tórax. Matrizes de Variância (diagonal, cinza escuro)/ Covariância(Triângulo de baixo, cinza claro) e Correlação(Triângulo de cima em branco).

Tabela 3. Estimativa dos vetores de plasticidade da média da posteriori do efeito fixo para cada hospedeiro para cada espécie.

A. obl	<i>A. carambola</i> (Carambola)/ (95%)(Ao_Ac)			<i>E. pyriformis</i> (Uvaia)/ (95%)(Ao_Ep)			<i>S. dulcis</i> (Cajamanga)/ (95%)(Ao_Sd)		
Caracter	M	CI-	CI+	M	CI-	CI+	M	CI-	CI+
AA	0.33	0.26	0.43	-2.95	-3.25	-2.66	-1.32	-1.59	-1.09
AWS	0.05	-0.1	0.15	0.07	-0.42	0.52	-0.37	-0.71	0.07
AWN	0.07	-0.12	0.12	-0.71	-1.15	-0.26	0.48	0.06	0.79
HEL	-0.45	-0.49	-0.4	2.45	2.24	2.63	2.61	2.45	2.76
HW	0.09	-0.02	0.24	-0.96	-1.3	-0.35	-0.44	-0.83	-0.08
WL	0.13	0.002	0.25	-0.64	-1.05	-0.12	-0.93	-1.15	-0.42
WW	0.08	-0.02	0.23	-0.38	-0.7	0.22	-0.82	-1.2	-0.44
TL	0.09	0.00	0.25	-0.65	-1.24	-0.33	-0.64	-1.03	-0.29
TW	0.23	0.11	0.34	-0.89	-1.36	-0.52	-1.52	-1.9	-1.23
A. fra	<i>E. brasiliensis</i> (Grumichama)/ (95%)(Af_Eb)			<i>E. uniflora</i> (Pitanga)/ (95%)(Af_Eu)			<i>P. guajava</i> (Goiaba)/ (95%)(Af_Pg)		
Caracter	M	CI-	CI+	M	CI-	CI+	M	CI-	CI+
AA	-0.62	-1.11	0.29	0.28	-0.47	1.06	0.94	-0.07	1.5
AWS	0.69	-0.13	1.29	-0.48	-1.42	0.14	-0.82	-1.53	0.04
AWN	0.54	-0.37	1.05	-0.83	-1.52	0.12	-0.04	-0.93	0.68
HEL	0.51	-0.34	1.13	-0.39	-1.3	0.31	-0.52	-1.36	0.28
HW	0.66	0.08	1.48	-1.12	-1.89	-0.35	-0.47	-1.33	0.23
WL	0.69	0.01	1.38	-1.18	-1.85	-0.4	-0.29	-1.18	0.33
WW	0.37	-0.25	1.14	-0.73	-1.44	0.12	-0.37	-1.11	0.44
TL	0.32	-0.37	1.08	-0.45	-1.24	0.34	-0.19	-1.24	0.37
TW	-0.1	-0.76	0.62	0.37	-0.42	1.14	-0.32	-1.16	0.36

AA, Ápice do Acúleo; AWS, Largura da seção serrada do Acúleo ; AWN, Largura da seção não-serrada do Acúleo ; HEL, Tamanho do Olho; HW, Largura da cabeça; WL, Comprimento da Asa; WW, Largura da Asa; TL, Comprimento do Tórax; TW, Largura do tórax.

Tabela 4. Teste de alinhamento entre os vetores de plasticidade com vetor de máxima variação fenotípica da P-matrix de cada espécie (Pmax), resposta à seleção para cada hospedeiro (Δz), gradiente de seleção para cada hospedeiro (β). O alinhamento é expresso como modo de correlação entre os vetores normalizados (θ) para ambas as espécies, *A. obliqua* and *A. fraterculus* sp2.

Espécie	Vetores (θ)	P _{max}	Δz	β
<i>A. obliqua</i>	Ao_Ac	0.38	0.80*	0.74*
	Ao_Sd	-0.34	0.67*	0.64*
	Ao_Ep	-0.47	0.83*	0.75*
<i>A. fraterculus</i> sp2	Af_Eb	0.48	0.74*	0.56
	Af_Eu	-0.51	0.75*	0.53*
	Af_Pg	0.75	-0.32	-0.11

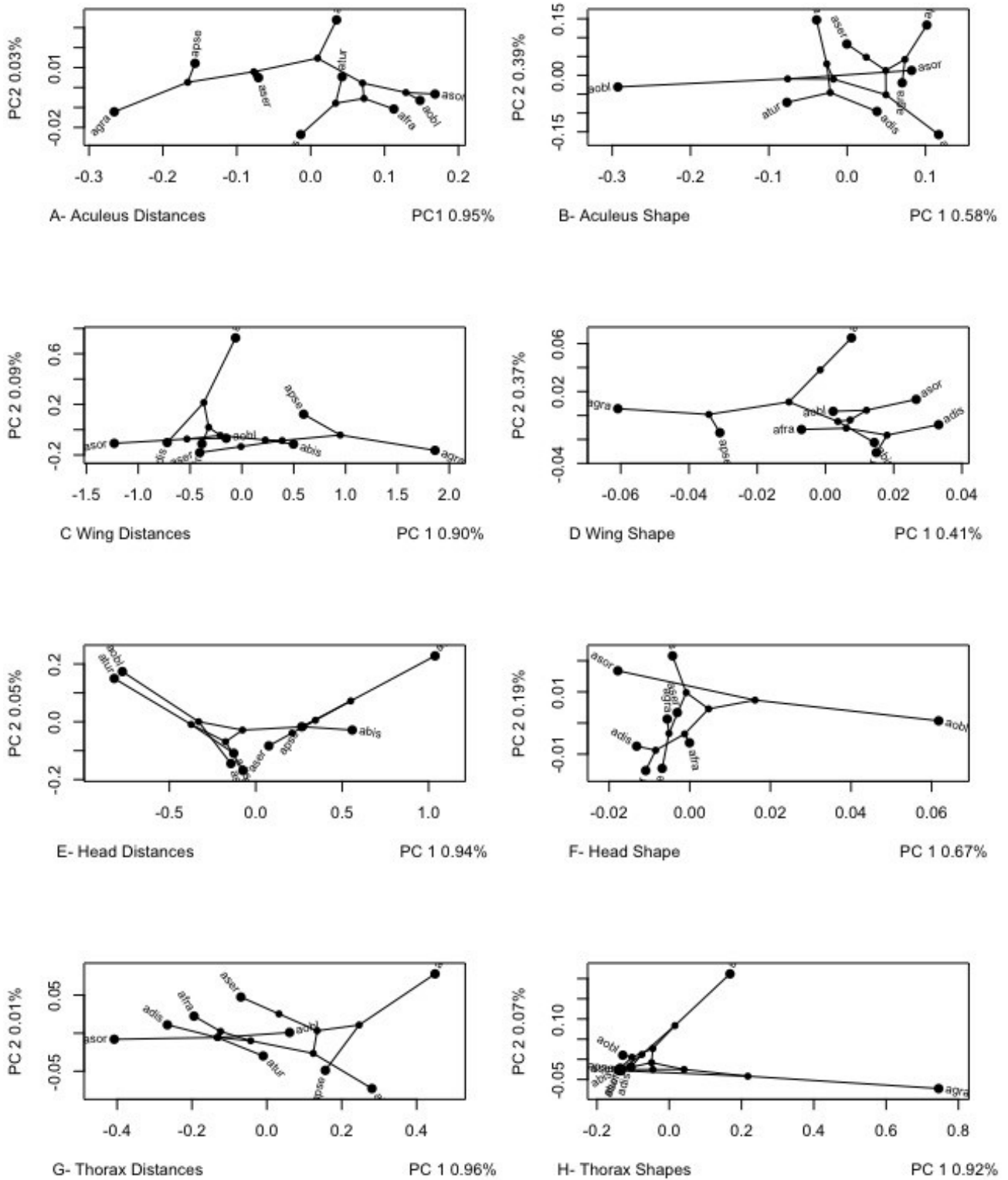


Figura 1. Filomorfoespaço demonstrando os primeiros eixos de variação no morfoespaço (PC1 e PC2) nas duas abordagens (Distâncias e Landmarks) para as nove espécies aqui estudadas.

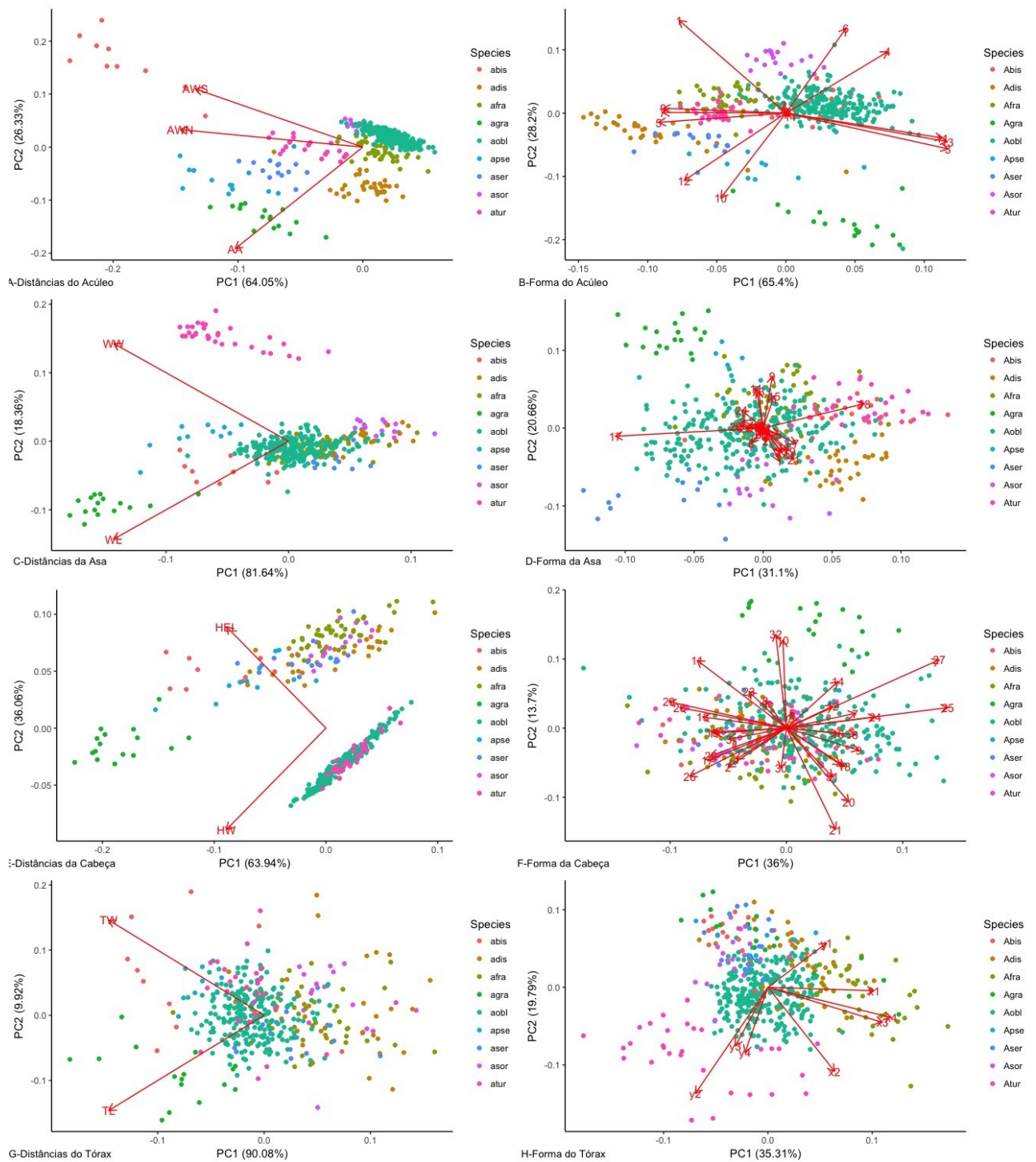


Figura 2. Análise de Componentes principais para dados das medidas e forma de nove espécies do gênero *Anastrepha*. A-Medidas do Acúleo. B-Forma do Acúleo. C-Medidas da Asa. D-Forma da Asa. E-Medidas da Cabeça. F-Forma da Cabeça. G-Medidas do Tórax. H-Forma do Tórax. Cores: abis, *A.bistrigata* (Vermelho); adis, *A.distincta* (amarelo escuro); Agra, *A.grandis* (verde claro); Aobl, *A.obliqua* (verde escuro); Apse, *A.pseudoparalella* (azul claro); aser, *A.serpentina* (Violeta); asor, *A.sororcula* (Rosa); atur, *A.turpiniae* (Pink).

INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR

Tabela S1. Amostra de moscas-da-fruta, *Anastrepha.sp*

Espécie	Grupo	N	Hospedeiro	Localidade
<i>A. pseudoparallela</i>	<i>pseudoparallela</i>	23	Passion- <i>Passiflora edulis</i>	São Carlos-SP
<i>A. distincta</i>	<i>fraterculus</i>	34	Ingá- <i>Inga edulis</i>	Pirassununga-SP
<i>A. grandis</i>	<i>grandis</i>	30	Abóbora - <i>Cucurbita spp</i>	Porto Ferreira-SP
<i>A. bistrigata</i>	<i>striata</i>	19	Goiaba- <i>Psidium guajava</i>	São Carlos-SP
<i>A. sororcula</i>	<i>fraterculus</i>	18	Goiaba- <i>Psidium guajava</i>	Porto Ferreira-SP
<i>A. serpentina</i>	<i>serpentina</i>	23	Apricot - <i>Mimusops coriacea</i>	Barra do Sahy-SP
<i>A. fraterculus</i>	<i>fraterculus</i>	41-45	Pitanga – <i>Eugenia uniflora</i>	Belo Horizonte-MG
<i>A. fraterculus</i>	<i>fraterculus</i>	10	Grumixama - <i>Eugenia brasiliensis</i>	Belo Horizonte-MG
<i>A. fraterculus</i>	<i>fraterculus</i>	38	Goiaba- <i>Psidium guajava</i>	Belo Horizonte-MG
<i>A. obliqua</i>	<i>fraterculus</i>	243-296	Carambola – <i>Averrhoa carambola</i>	São Carlos-SP
<i>A. obliqua</i>	<i>fraterculus</i>	32	Uvaia - <i>Eugenia pyriformis</i>	São Carlos-SP
<i>A. obliqua</i>	<i>fraterculus</i>	20	Cajamanga – <i>Spondias dulcis</i>	São Carlos-SP
<i>A. turpiniae</i>	<i>fraterculus</i>	33	Goiaba- <i>Psidium guajava</i>	Rio das contas - BA

Tabela S2. Caracteres utilizados nas distâncias Euclidianas.

Distância	Landmarks	Descrição	Estrutura
1-HEL	14-16	Comprimento do olho	Cabeça
2-HW	12-15	Largura da cabeça	Cabeça
3-AA	1-4	Ápice do acúleo	Acúleo
4-AWS	2-6	Largura do acúleo na região serreada	Acúleo
5-AWN	3-5	Largura do acúleo na região não-serreada	Acúleo
6-TL	1-4	Comprimento do tórax	Tórax
7-TW	2-3	Largura do tórax	Tórax
8-WL	1-4	Comprimento da asa	Asa
9-WW	3-5	Largura da asa	Asa

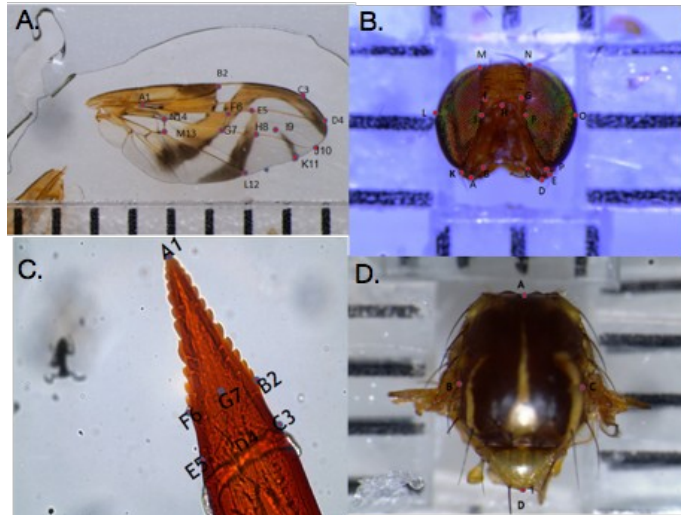


Figura S1. Descrição das localização das landmarks para capturar a forma e as distâncias lineares. A.Asa, 14 landmarks. B.Cabeça, 16 landmarks. C. Acúleo, 7 landmarks. D. Tórax, 4 landmarks.

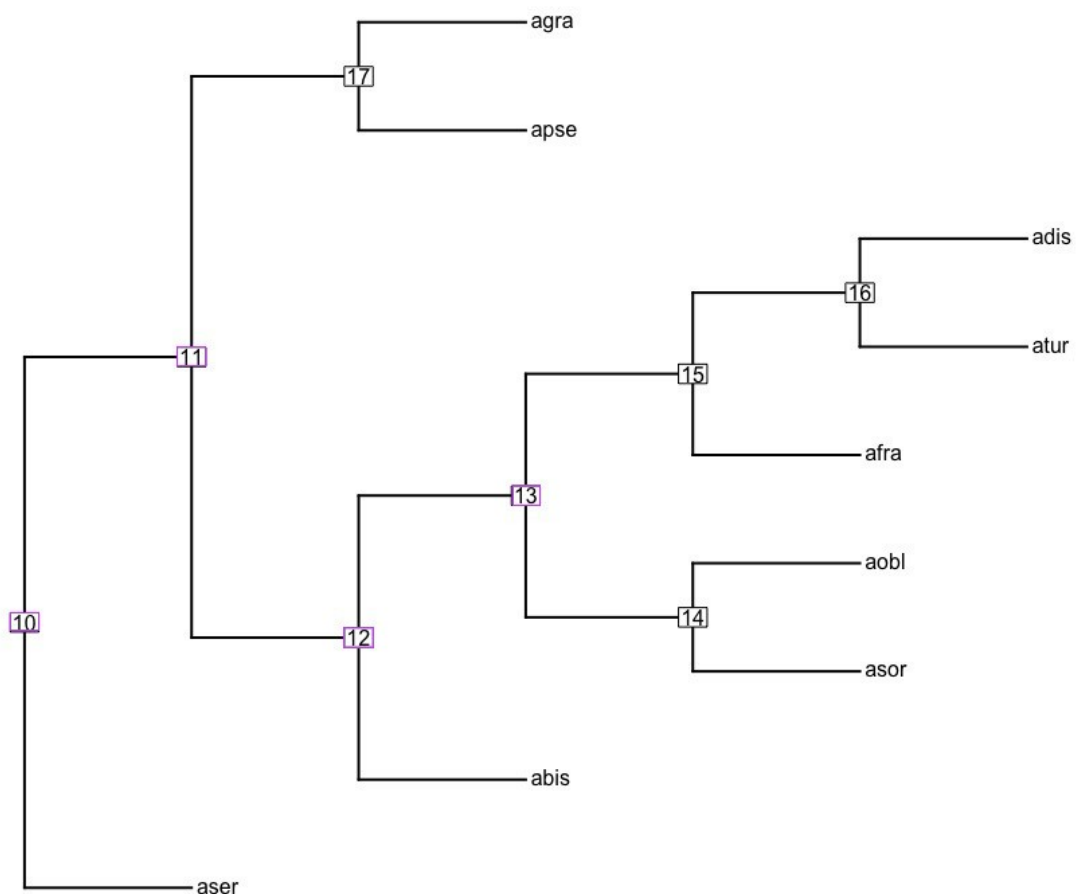


Figura S2. Árvore filogenética para as nove espécies do gênero *Anastrepha*. Aser, *A. serpentina*; agra, *A. grandis*; apse, *A. pseudoparallela*; abis, *A. bistrigata*; adis, *A. distinta*; atur, *A. turpiniae*; afra, *A. fraterculus*; aobl, *A. obliqua*; asor, *A. sororcula*. Árvore de espécies inferida no Astral a partir de árvores de máxima de verossimilhança de 3945 genes para nove espécies do gênero *Anastrepha*. Os nós em destaque 10, 11, 12 e 13 (Rosa) foram testados porque tinham mais que 4 descendentes e apresentaram correlação dos PCs da matriz ancestral (W)

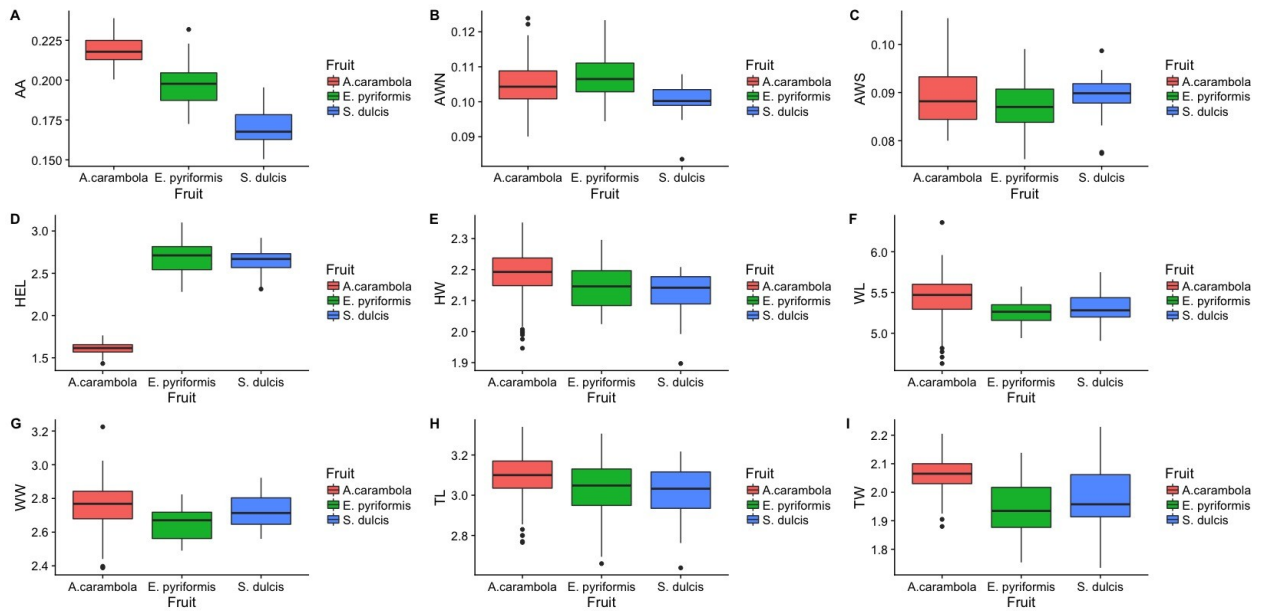


Figura S3. Média fenotípica para cada caráter avaliado em três hospedeiros: *A. carambola*, *E. pyriformis* e *S. dulcis* para *Anastrepha obliqua*.

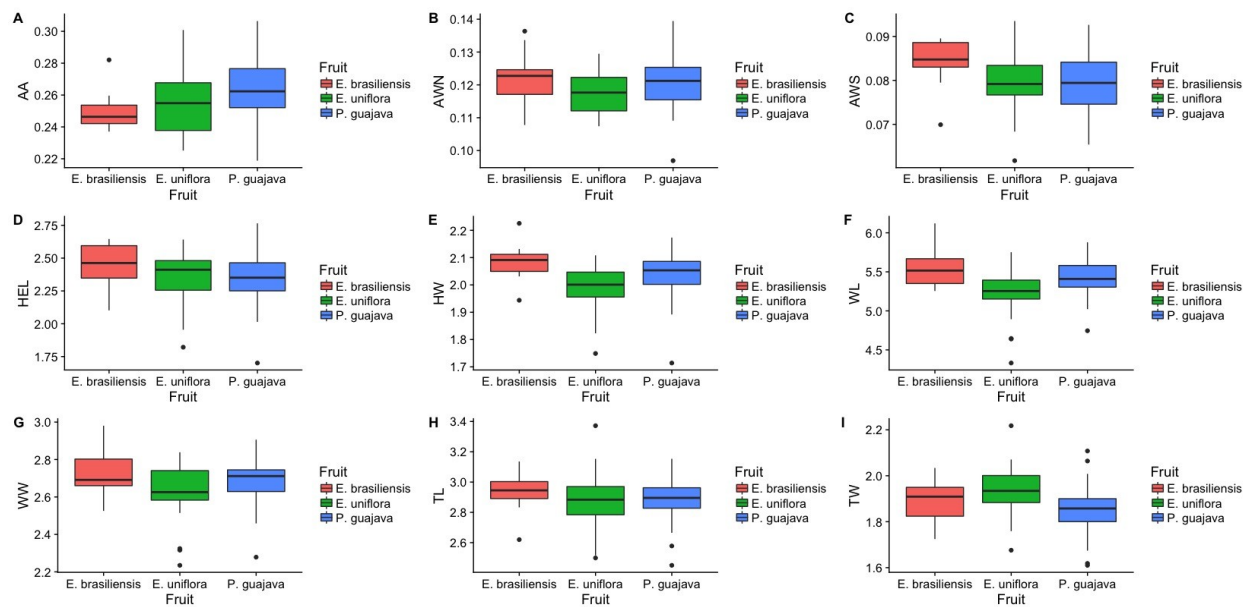


Figura S4. Média fenotípica para cada caráter avaliado em três hospedeiros: *E. brasiliensis*, *E. uniflora* e *P. guajava* para *Anastrepha fraterculus*.

Table S3. Estimativa da forma média para o conjunto de espécimes alinhados

Ldks		Coordenadas X e Y para cada espécie																	
ac	Abis.1	Abis.2	Adis.1	Adis.2	Afra.1	Afra.2	Agra.1	Agra.2	Aobl.1	Aobl.2	Apse.1	Apse.2	Aser.1	Aser.2	Asor.1	Asor.2	Atur.1	Atur.2	
1	-0.73	-0.003	-0.69	-0.001	-0.68	-0.004	-0.90	-0.01	-0.74	-0.002	-0.79	-0.0024	-0.72	-0.0018	-0.65	-0.01	-0.69	0.00	
2	-0.05	0.23	-0.16	0.11	-0.11	0.16	0.03	0.11	-0.04	0.21	-0.06	0.12	-0.12	0.13	-0.09	0.22	-0.11	0.15	
3	0.29	0.24	0.38	0.17	0.33	0.24	0.28	0.12	0.27	0.25	0.32	0.15	0.35	0.17	0.30	0.31	0.35	0.21	
4	0.29	0.00	0.38	0.00	0.34	0.00	0.28	0.00	0.29	0.00	0.33	0.00	0.36	0.00	0.32	0.00	0.35	0.00	
5	0.29	-0.23	0.39	-0.16	0.34	-0.24	0.27	-0.12	0.29	-0.25	0.33	-0.15	0.36	-0.16	0.31	-0.30	0.34	-0.21	
6	-0.05	-0.23	-0.15	-0.11	-0.11	-0.16	0.02	-0.11	-0.04	-0.21	-0.06	-0.12	-0.12	-0.13	-0.09	-0.22	-0.11	-0.16	
7	-0.04	0.00	-0.15	0.00	-0.10	0.00	0.03	0.00	-0.03	0.00	-0.06	0.00	-0.12	0.00	-0.09	0.00	-0.11	0.00	
w	Abis.1	Abis.2	Adis.1	Adis.2	Afra.1	Afra.2	Agra.1	Agra.2	Aobl.1	Aobl.2	Apse.1	Apse.2	Aser.1	Aser.2	Asor.1	Asor.2	Atur.1	Atur.2	
1	-0.47	0.03	-0.45	0.03	-0.47	0.03	-0.48	0.02	-0.47	0.03	-0.47	0.02	-0.47	0.03	-0.45	0.04	-0.47	0.03	
2	-0.13	0.16	-0.14	0.16	-0.13	0.16	-0.12	0.15	-0.13	0.16	-0.13	0.17	-0.12	0.15	-0.14	0.16	-0.14	0.16	
3	0.21	0.16	0.23	0.16	0.21	0.16	0.22	0.15	0.22	0.16	0.21	0.17	0.22	0.15	0.21	0.16	0.22	0.16	
4	0.37	0.05	0.37	0.06	0.36	0.06	0.35	0.05	0.36	0.06	0.34	0.05	0.36	0.05	0.36	0.06	0.37	0.05	
5	0.05	0.07	0.05	0.07	0.06	0.08	0.07	0.07	0.05	0.07	0.07	0.08	0.02	0.07	0.04	0.08	0.05	0.07	
6	-0.07	0.05	-0.08	0.05	-0.07	0.05	-0.06	0.05	-0.07	0.05	-0.06	0.05	-0.09	0.05	-0.08	0.05	-0.07	0.05	
7	-0.08	-0.02	-0.10	-0.02	-0.08	-0.02	-0.07	-0.03	-0.08	-0.02	-0.07	-0.02	-0.09	-0.02	-0.09	-0.02	-0.08	-0.02	
8	0.05	-0.04	0.04	-0.04	0.05	-0.03	0.06	-0.03	0.05	-0.04	0.06	-0.03	0.02	-0.03	0.04	-0.03	0.05	-0.04	
9	0.12	0.02	0.13	0.02	0.15	0.01	0.18	0.01	0.15	0.00	0.16	0.00	0.19	0.00	0.16	0.01	0.13	0.03	
10	0.34	-0.05	0.34	-0.06	0.33	-0.06	0.32	-0.04	0.33	-0.05	0.32	-0.06	0.34	-0.04	0.33	-0.06	0.33	-0.06	
11	0.25	-0.11	0.26	-0.11	0.25	-0.11	0.23	-0.11	0.26	-0.11	0.25	-0.12	0.25	-0.11	0.27	-0.12	0.26	-0.11	
12	0.04	-0.21	0.04	-0.22	0.03	-0.22	0.04	-0.20	0.04	-0.22	0.04	-0.22	0.04	-0.22	0.04	-0.23	0.04	-0.22	
13	-0.34	-0.08	-0.34	-0.08	-0.35	-0.08	-0.36	-0.08	-0.34	-0.08	-0.35	-0.08	-0.34	-0.08	-0.34	-0.07	-0.34	-0.08	
14	-0.35	-0.02	-0.34	-0.02	-0.35	-0.02	-0.37	-0.02	-0.35	-0.02	-0.35	-0.02	-0.34	-0.02	-0.34	-0.02	-0.34	-0.02	
h	Abis.1	Abis.2	Adis.1	Adis.2	Afra.1	Afra.2	Agra.1	Agra.2	Aobl.1	Aobl.2	Apse.1	Apse.2	Aser.1	Aser.2	Asor.1	Asor.2	Atur.1	Atur.2	
1	0.11	-0.25	0.10	-0.25	0.11	-0.25	0.10	-0.26	0.11	-0.26	0.11	-0.25	0.10	-0.25	0.10	-0.25	0.11	-0.25	
2	0.08	-0.18	0.08	-0.18	0.08	-0.17	0.08	-0.18	0.07	-0.19	0.09	-0.18	0.08	-0.18	0.08	-0.17	0.08	-0.17	
3	0.19	-0.01	0.18	-0.01	0.18	-0.01	0.19	-0.01	0.19	0.00	0.19	-0.02	0.18	-0.01	0.18	-0.01	0.18	-0.01	
4	0.26	0.01	0.26	0.01	0.26	0.01	0.26	0.01	0.27	0.01	0.26	0.00	0.25	0.01	0.25	0.01	0.26	0.01	
5	0.26	0.08	0.26	0.08	0.26	0.07	0.26	0.09	0.27	0.08	0.26	0.08	0.26	0.08	0.26	0.07	0.26	0.07	
6	0.00	0.10	0.00	0.10	0.00	0.10	0.01	0.12	0.00	0.10	0.00	0.11	0.01	0.09	0.01	0.10	0.00	0.10	
7	-0.11	0.14	-0.10	0.13	-0.11	0.14	-0.11	0.16	-0.11	0.14	-0.11	0.15	-0.11	0.14	-0.11	0.15	-0.11	0.14	
8	-0.13	0.06	-0.14	0.06	-0.13	0.06	-0.14	0.06	-0.13	0.06	-0.15	0.06	-0.14	0.06	-0.13	0.06	-0.14	0.06	
9	-0.19	0.00	-0.19	-0.01	-0.19	0.00	-0.21	-0.01	-0.19	0.00	-0.20	0.00	-0.20	0.00	-0.19	0.00	-0.19	0.00	
10	-0.11	-0.08	-0.11	-0.08	-0.11	-0.08	-0.12	-0.10	-0.11	-0.08	-0.11	-0.08	-0.10	-0.09	-0.10	-0.09	-0.11	-0.08	
11	0.05	-0.28	0.04	-0.28	0.06	-0.28	0.03	-0.29	0.05	-0.29	0.05	-0.29	0.05	-0.28	0.05	-0.28	0.05	-0.28	
12	-0.22	-0.27	-0.22	-0.28	-0.22	-0.27	-0.22	-0.26	-0.22	-0.26	-0.22	-0.27	-0.21	-0.28	-0.22	-0.28	-0.22	-0.28	
13	-0.33	0.06	-0.33	0.06	-0.34	0.06	-0.32	0.04	-0.32	0.06	-0.32	0.05	-0.33	0.07	-0.33	0.06	-0.33	0.06	
14	-0.22	0.24	-0.22	0.25	-0.23	0.24	-0.19	0.24	-0.22	0.24	-0.21	0.24	-0.23	0.24	-0.22	0.24	-0.22	0.24	
15	0.12	0.30	0.13	0.31	0.13	0.30	0.12	0.29	0.12	0.30	0.12	0.30	0.14	0.31	0.13	0.30	0.13	0.30	
16	0.24	0.08	0.24	0.09	0.24	0.08	0.23	1.29	0.24	0.09	0.24	0.09	0.24	0.08	0.24	0.09	0.24	0.08	
t	Abis.1	Abis.2	Adis.1	Adis.2	Afra.1	Afra.2	Agra.1	2.29	Aobl.1	Aobl.2	Apse.1	Apse.2	Aser.1	Aser.2	Asor.1	Asor.2	Atur.1	Atur.2	
1	-0.58	0.03	-0.58	0.03	-0.58	0.03	-0.59	3.29	-0.54	-0.13	-0.58	0.03	-0.56	0.03	-0.57	0.03	-0.26	-0.41	
2	-0.06	-0.40	-0.05	-0.41	-0.06	-0.40	-0.05	4.29	-0.13	-0.11	-0.06	-0.41	-0.08	-0.39	-0.06	-0.41	-0.58	0.07	
3	0.00	0.41	0.00	0.41	0.00	0.41	-0.01	5.29	-0.05	0.36	0.00	0.41	-0.02	0.40	-0.01	0.41	0.06	0.50	

Tabela S4. Médias e desvio-padrão de diversas medidas para espécies (E) e hospedeiros (H) aqui estudadas.

E	H	AA	AWS	AWN	HEL	HW	WL	WW	TL	TW
abis	<i>P. guajava</i>	0.329±0.081	0.128±0.054	0.131±0.057	2.953±0.369	2.260±0.12	2.952±0.2	3.270±0.2	2.219±0.14	1.966±0.14
adis	<i>Inga edulis</i>	0.381±0.027	0.075±0.008	0.115±0.006	2.298±0.275	2.041±0.11	2.517±0.1	2.804±0.2	1.921±0.11	2.146±0.11
afra	<i>E. uniflora</i>	0.255±0.019	0.080±0.006	0.117±0.006	2.363±0.181	1.993±0.08	2.631±0.1	2.874±0.1	1.939±0.09	2.218±0.09
agra	<i>Cucurbitaspp</i>	0.632±0.022	0.106±0.008	0.116±0.008	3.369±0.214	2.610±0.07	3.407±0.1	3.485±0.1	2.150±0.10	2.062±0.10
aobl	<i>A.carambola</i>	0.219±0.009	0.089±0.006	0.105±0.006	1.610±0.063	2.185±0.07	2.758±0.1	3.098±0.1	2.062±0.05	1.920±0.05
apse	<i>P. edulis</i>	0.522±0.058	0.112±0.007	0.141±0.013	2.665±0.304	2.211±0.12	3.208±0.1	3.166±0.1	2.147±0.08	1.939±0.08
aser	<i>M.coriacea</i>	0.436±0.025	0.102±0.006	0.133±0.004	2.492±0.228	2.107±0.08	2.559±0.1	2.998±0.1	1.967±0.07	1.933±0.07
asor	<i>P. guajava</i>	0.197±0.008	0.089±0.004	0.124±0.005	2.312±0.110	2.017±0.06	2.424±0.1	2.815±0.1	1.933±0.08	2.149±0.07
atur	<i>P. guajava</i>	0.323±0.01	0.096±0.007	0.130±0.008	1.569±0.056	2.152±0.06	3.529±0.2	3.022±0.1	2.61±0.10	2.061±0.10
aobl	<i>A.carambola</i>	0.22±0.01	0.09±0.01	0.10±0.01	1.61±0.06	2.18±0.07	2.76±0.13	3.10±0.10	2.06±0.06	2.0623±0.05
aobl	<i>E. pyriformis</i>	0.20±0.01	0.09±0.01	0.11±0.01	2.70±0.22	2.15±0.08	2.65±0.10	3.02±0.16	1.94±0.10	1.9368±0.10
aobl	<i>S. dulcis</i>	0.17±0.01	0.09±0.01	0.10±0.01	2.63±0.17	2.12±0.08	2.73±0.11	3.01±0.15	1.98±0.12	1.9849±0.12
afra	<i>E.brasiliensis</i>	0.25±0.01	0.08±0.01	0.12±0.01	2.44±0.18	2.08±0.07	2.72±0.15	2.94±0.15	1.89±0.10	1.894±0.09
afra	<i>E. uniflora</i>	0.25±0.02	0.08±0.01	0.12±0.01	2.36±0.18	1.99±0.08	2.63±0.14	2.87±0.16	1.94±0.10	1.939±0.09
afra	<i>P. guajava</i>	0.26±0.02	0.08±0.01	0.12±0.01	2.34±0.19	2.04±0.08	2.68±0.12	2.88±0.14	1.86±0.11	1.855±0.10

Aser, *A. serpentina*; agra, *A. grandis*; apse, *A. pseudoparallela*; abis, *A. bistrigata*; adis, *A. distinta*; atur, *A. turpinae*; afra, *A. fraterculus*; aobl, *A. obliqua*; asor, *A. sororcula*. AA, Ápice do Acúleo; AWS, Largura da seção serrada do Acúleo; AWN, Largura da seção não-serrada do Acúleo; HEL, Tamanho do Olho; HW, Largura da cabeça; WL, Comprimento da Asa; WW, Largura da Asa; TL, Comprimento do Tórax; TW, Largura do tórax.

Table S5. Matriz de correlacao dos escores dos componentes principais e valores de significância para cada ramo com ao menos quatro descendentes. O triângulo de baixo representa as correlacoes, enquanto o triângulo superior os valores de significância, em que as que superam valores corrigidos por Bonferroni estão em negrito.

Node 10	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
PC1	1.0000	0.00002	0.0002	0.2432	0.6616	0.2001	0.0002	0.1886
PC2	0.9831	1.0000	0.0008	0.3642	0.7706	0.3149	0.0000	0.1883
PC3	-0.9337	-0.9059	1.0000	0.2224	0.2404	0.0321	0.0106	0.5780
PC4	-0.4340	-0.3443	0.4515	1.0000	0.1784	0.1208	0.4259	0.7184
PC5	-0.1702	-0.1138	0.4363	0.4921	1.0000	0.0553	0.8078	0.0260
PC6	-0.4715	-0.3787	0.7099	0.5551	0.6554	1.0000	0.5424	0.5266
PC7	-0.9401	-0.9600	0.7939	0.3043	-0.0951	0.2352	1.0000	0.0607
PC8	-0.4823	-0.4826	0.2153	-0.1405	-0.7284	-0.2442	0.6450	1.0000
Node 11	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
PC1	1.0000	0.0000	0.0012	0.0030	0.9461	0.0006	0.0002	0.1904
PC2	0.9824	1.0000	0.0030	0.0015	0.9584	0.0014	0.0001	0.1996
PC3	-0.8929	-0.8598	1.0000	0.0017	0.2512	0.0050	0.0264	0.8164
PC4	-0.8592	-0.8856	0.8803	1.0000	0.6058	0.0178	0.0203	0.5061
PC5	-0.0265	0.0204	0.4274	0.2000	1.0000	0.8295	0.5768	0.0087
PC6	-0.9138	-0.8884	0.8356	0.7587	-0.0842	1.0000	0.0014	0.1583
PC7	-0.9415	-0.9558	0.7273	0.7484	-0.2159	0.8866	1.0000	0.0731
PC8	-0.4805	-0.4719	0.0908	0.2560	-0.8060	0.5125	0.6230	1.0000
Node 12	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
PC1	1.0000	0.0000	0.7530	0.0005	0.5037	0.1718	0.0141	0.0941
PC2	0.9766	1.0000	0.9857	0.0009	0.6655	0.1523	0.0096	0.0739
PC3	-0.1228	0.0070	1.0000	0.8756	0.6186	0.1098	0.4813	0.4304
PC4	0.9151	0.9018	0.0612	1.0000	0.1281	0.3727	0.1672	0.4733
PC5	-0.2574	-0.1681	-0.1931	-0.5463	1.0000	0.2543	0.4193	0.0896
PC6	-0.4987	-0.5189	0.5691	-0.3386	-0.4249	1.0000	0.0489	0.0251
PC7	-0.7754	-0.7999	0.2706	-0.5033	-0.3085	0.6688	1.0000	0.0028
PC8	0.5905	0.6217	-0.3015	0.2753	0.5971	-0.7316	-0.8624	1.0000
Node 13	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
PC1	1.0000	0.0000	0.0162	0.0153	0.0468	0.0012	0.0089	0.1594
PC2	0.9638	1.0000	0.0183	0.0522	0.0375	0.0035	0.0096	0.1829
PC3	0.7656	0.7566	1.0000	0.0007	0.7605	0.1752	0.4614	0.7577
PC4	-0.7696	-0.6617	-0.9078	1.0000	0.7752	0.1151	0.3780	0.8829
PC5	-0.6733	-0.6955	-0.1190	0.1115	1.0000	0.0022	0.0020	0.0004
PC6	0.8937	0.8524	0.4953	-0.5622	-0.8707	1.0000	0.0014	0.0300
PC7	-0.8046	-0.8004	-0.2825	0.3351	0.8757	-0.8886	1.0000	0.0074
PC8	-0.5113	-0.4877	0.1204	-0.0577	0.9224	-0.7161	0.8155	1.0000

Valores em negrito foram significativos após a correção por bonferoni, $\alpha = 0.007$

Table S6. Vetores de resposta à seleção e gradientes de seleção inferidas para *A.obliqua* e *A. fraterculus* emergidas de hospedeiros distintos. hospedeiro em duas espécies polífagas.

Aobl	Δz_{Ao_Ac}	Δz_{Ao_Ep}	Δz_{Ao_Sd}	β_{Ao_Ac}	β_{Ao_Ep}	β_{Ao_Sd}
AA	0.0145	0.0016	-0.0252	0.0176	-0.0099	-0.0367
AWS	0.0004	-0.0011	0.0006	-0.0074	0.0102	0.0024
AWN	0.0006	0.0033	-0.0039	0.0125	-0.0127	-0.0108
HEL	-0.7005	0.3859	0.3146	-0.9872	0.9888	0.9835
HW	0.0327	-0.0029	-0.0298	0.1505	-0.1362	-0.1671
WL	0.1104	-0.0865	-0.0239	0.0131	-0.0146	-0.0112
WW	0.0464	-0.0635	0.0171	-0.0207	0.0011	0.0444
TL	0.0568	-0.0218	-0.035	0.0136	0.0016	-0.0316
TW	0.0676	-0.0578	-0.0097	0.0386	-0.0555	-0.0186
Afrat	Δz_{Af_Eb}	Δz_{Af_Eu}	Δz_{Af_Pg}	β_{Af_Eb}	β_{Af_Eu}	β_{Af_Pg}
AA	-0.0198	-0.0154	-0.0252	-0.2464	0.0713	-0.0396
AWS	0.004	-0.0001	0.0006	-0.0195	0.0148	-0.0436
AWN	0.0019	-0.0027	-0.0039	-0.0183	0.0122	-0.0272
HEL	0.0605	-0.0169	0.3146	0.0824	0.0706	0.8462
HW	0.0545	-0.0372	-0.0298	0.2510	-0.2637	-0.4329
WL	0.1442	-0.1645	-0.0239	0.8442	-0.8271	-0.1750
WW	0.0524	-0.0386	0.0171	-0.2707	0.3591	0.1190
TL	0.0494	-0.0161	-0.035	0.1769	-0.1252	-0.2169
TW	0.0045	0.0401	-0.0097	-0.2272	0.3022	-0.0248

Ao,Aobl, *A.obliqua*; Af, Afrat, *A.fraterculus*; AA, Ápice do Acúleo; AWS, Largura da seção serrada do Acúleo ; AWN, Largura da seção não-serrada do Acúleo ; HEL, Tamanho do Olho; HW, Largura da cabeça; WL, Comprimento da Asa; WW, Largura da Asa; TL, Comprimento do Tórax; TW, Largura do tórax. Δz , Vetor de resposta à seleção; β , gradiente de seleção; Ac, *A. carambola*; Ep, *E. pyryformis* (uvaia); Sd, *S. dulcis* (Cajamanga); Eb, *E. brasiliensis* (Grumichama); Pg, *P. guajava* (Goiaba).

Table S7. Regressão linear para os três hospedeiros de cada espécie. Ao = *Anastrepha obliqua*. Af = *Anastrepha fraterculus* sp2.D.L. = Dis Linear, H= Hospedeiro, y=intercept, E = Estimate, P= P-value.

	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,292}	R2	P	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,86}	R2
AA	Ao_Ac	0.22	0.0006	361.62	2.00E-16	299	0.67	2.00E-16	Af_Eb	0.25	0.00579	43.236	2.00E-16	3.692	0.05
	Ao_Ep	-0.02	0.0018	-12.32	1.00E+00				Af_Eu	0.004	0.00645	0.678	0.4998		
	Ao_Sd	-0.05	0.0022	-22.22	2.00E+00				Af_Pg	0.014	0.0065	2.127	0.0362		*
	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,292}	R2	P	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,86}	R2
AWS	Ao_Ac	0.09	0.0004	248.277	2.00E-16	1.319	0.02	0.2691	Af_Eb	0.084	0.00207	40.592	2.00E-16	2.01	0.02
	Ao_Ep	-0.002	0.0011	-1.595	0.112				Af_Eu	0	0.00231	-1.827	0.0712		.
	Ao_Sd	0.00	0.0013	0.152	0.879				Af_Pg	0	0.00233	-1.957	0.0536		.
	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,292}	R2	P	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,86}	R2
AWS	Ao_Ac	0.10	0.0004	271.678	2.00E-16	8.917	0.05	0.00017	Af_Eb	0.122	0.00227	53.718	2.00E-16	3.22	0.04
	Ao_Ep	0.00	0.0011	2.379	0.01801				Af_Eu	0	0.00253	-1.867	0.0653		.
	Ao_Sd	-0.005	0.0014	-3.25	0.00129				Af_Pg	0	0.00255	-0.453	0.6516		.
	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,292}	R2	P	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,86}	R2
HEL	Ao_Ac	1.61	0.0065	247.95	2.00E-16	2348	0.94	2.00E-16	Af_Eb	2.441	0.0588	41.507	2.00E-16	1.087	0.001
	Ao_Ep	1.09	0.0190	57.08	2.00E-16				Af_Eu	-0.077	0.06558	-1.181	0.241		
	Ao_Sd	1.02	0.0235	43.12	2.00E-16				Af_Pg	-0.097	0.06608	-1.474	0.144		
	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,292}	R2	P	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,86}	R2
HW	Ao_Ac	2.18	0.0048	458.396	2.00E-16	9.02	0.05	0.0001567	Af_Eb	2.085	0.02519	82.754	2.00E-16	6.38	0.11
	Ao_Ep	-0.04	0.0140	-2.557	0.011073	*			Af_Eu	-0.092	0.02809	-3.267	0.00156		
	Ao_Sd	-0.06	0.0173	-3.62	0.000347	***			Af_Pg	-0.049	0.02831	-1.733	0.08663		.
	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,292}	R2	P	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,86}	R2
WL	Ao_Ac	5.45	0.0153	357.267	2.00E-16	11.77	0.07	1.22E-05	Af_Eb	5.554	0.08104	68.537	2.00E-16	8.13	0.14
	Ao_Ep	-0.20	0.0447	-4.408	1.47E-05				Af_Eu	-0.309	0.09038	-3.416	0.000972		
	Ao_Sd	-0.13	0.0553	-2.431	0.0157				Af_Pg	-0.126	0.09108	-1.383	0.170183		
	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,292}	R2	P	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,86}	R2
WW	Ao_Ac	2.76	0.0081	339.409	2.00E-16	10.82	0.06	2.94E-05	Af_Eb	2.722	0.04153	65.553	2.00E-16	2.488	0.03
	Ao_Ep	-0.11	0.0238	-4.617	5.83E-06				Af_Eu	-0.091	0.04632	-1.966	0.0525		
	Ao_Sd	-0.03	0.0295	-0.995	0.321				Af_Pg	-0.044	0.04668	-0.937	0.3514		
	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,292}	R2	P	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,86}	R2
TL	Ao_Ac	3.10	0.0074	419.24	2.00E-16	11.4	0.06	1.70E-05	Af_Eb	2.939	0.04769	61.633	2.00E-16	0.77	0.005
	Ao_Ep	-0.08	0.0217	-3.632	0.000332				Af_Eu	-0.066	0.05319	-1.234	0.221		
	Ao_Sd	-0.09	0.0268	-3.429	0.000694				Af_Pg	-0.059	0.0536	-1.102	0.274		
	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,292}	R2	P	H	E	Std.	T-value	P	F _{2,86}	R2
TW	Ao_Ac	2.06	0.0040	464.424	2.00E-16	54.15	0.26	2.00E-16	Af_Eb	1.895	0.03211	58.998	2.00E-16	6.638	0.11
	Ao_Ep	-0.13	0.0130	-9.642	2.00E-16				Af_Eu	0.045	0.03581	1.246	0.216		
	Ao_Sd	-0.08	0.0161	-4.806	2.46E-06				Af_Pg	-0.039	0.03609	-1.07	0.288		

AA, Apice do Acúleo; AWS, Largura da seção serrada do Acúleo ; AWN, Largura da seção não-serrada do Acúleo ; HEL, Tamanho do Olho
 Largura da cabeça; WL, Comprimento da Asa; WW, Largura da Asa; TL, Comprimento do Tórax; TW, Largura do tórax. Δz, Vetor de resp
 seleção; β, gradiente de seleção; Ac, A. carambola; Ep, E. pyryformis (uvaia); Sd, S. dulcis (Cajamanga); Eb, E. brasiliensis (Grumichama);
 guajava (Goiaba).

3.5.REFERÊNCIAS

- Ackermann, R.R. and Cheverud, J.M.2000. Phenotypic covariance structure in tamarins (genus *Saguinus*): A comparison of variation patterns using matrix correlation and common principal component analysis. *Am. J. Phys. Anthropol.* 111, 489–50118
- Abouheif, E. 1999. A method for testing the assumption of phylogenetic independence in comparative data. *Evol. Ecol. Res.* 1: 895–909.
- Adams, D.C. 2014. A generalized K statistic for estimating phylogenetic signal from shape and other high-dimensional multivariate data. *Syst. Biol.* 63: 685–697.
- Adams, D.C., Collyer, M., Sherratt, E. 2016. geomorph 3.0.3: Software for geometric morphometric analyses. R package version 3.0.3. <http://CRAN.R-project.org/package=geomorph>.
- Adams, D. C., & Collyer, M. L. 2018. Multivariate Phylogenetic Comparative Methods: Evaluations, Comparisons, and Recommendations. *Systematic Biology*, 67(1), 14–31. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syx055>
- Aguirre, J. D., E. Hine, K. McGuigan, and M.W. Blows. 2014. Comparing G:multivariate analysis of genetic variation in multiple populations. *Heredity* 112:21–29.
- Aguirre-Ramirez, E.J., Velasco-Cuervo, S.M., Gallo-Franco JJ, Gonzales R, Carrejo NJ & Toro-Perea N (2017) Genetic diversity and population structure of *Anastrepha obliqua* in southwestern Colombia. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 164. <https://doi.org/10.1111/eea.12613>.
- Araújo, E.L., Nascimento, F.M., Zucchi, R.A. 1998. Utilização de análise discriminante em estudos taxonômicos de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera, Tephritidae). *Sci Agric* 55: 105–110
- Araújo, E. L., and R. A. Zucchi. 2006. Medidas do acúleo na caracterização de cinco espécies de *Anastrepha* do grupo *fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Neotrop. Entomol.* 35: 329–337.
- Assis, A. P., Rossoni, D. M., Patton, J. L. and Marroig, G. 2017. Evolutionary processes and its environmental correlates in the cranial morphology of western chipmunks (*Tamias*). *Evolution*, 71: 595-609. doi:10.1111/evo.13137.
- Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Neotrop. Entomol.* 39: 155–178.
- Bachmann, G. E., Segura, D. F., Devescovi, F., & Juárez, M. L. 2015. Male Sexual Behavior and Pheromone Emission Is Enhanced by Exposure to Guava Fruit Volatiles in *Anastrepha fraterculus*, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124250>.
- Berlacher SH. 2000. Radiation and divergence in the *Rhagoletis pomonella* species group: inferences from allozymes. *Evolution* 54: 543–557.
- Blomberg, S. I. P. B., & Arland, T. H. G. 2003. TESTING FOR PHYLOGENETIC SIGNAL IN COMPARATIVE DATA : BEHAVIORAL TRAITS ARE MORE LABILE, 57(4), 717–745.
- Bomfim, Z. V, Lima, K. M., Silva, J. G., Costa, M. a, & Zucchi, R. A. (2011). A morphometric and molecular study of *Anastrepha pickeli* Lima (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology*, 40(5), 587–594.
- Burns, J.; Strauss, S. 2012. Effects of competition on phylogenetic signal and phenotypic plasticity in plant functional traits, 93(8), 126–137.
- Calsbeek, R., Gosden, T.P., Kuchta, S.R. and E.I. Svensson. 2012. Fluctuating selection and dynamic adaptive landscapes. Pages 89–109 in Svensson, E. and R. Calsbeek, editors. *The Adaptive Landscape in Evolutionary Biology*, Oxford University Press, UK.

- Chevin, L. M. and R. Lande 2010. When do adaptive plasticity and genetic evolution prevent extinction of a density-regulated population? *Evolution* 64:1143–1150.
- Chevin, L., & Lande, R. 2015. Evolution of environmental cues for phenotypic plasticity, 2767–2775. <https://doi.org/10.1111/evo.12755>.
- Chevin, L. M., Visser, M. E., & Tufto, J. 2015. Estimating the variation, autocorrelation, and environmental sensitivity of phenotypic selection. *Evolution*, 69(9), 2319–2332. <https://doi.org/10.1111/evo.12741>
- Cheverud, J. M. 1988. A comparison of genetic and phenotypic correlations. *Evolution*, 42, 958–968.
- Cheverud, J.M. 1996. Quantitative genetic analysis of cranial morphology in the cotton-top (*Saguinus oedipus*) and saddle-back (*S. fuscicollis*) tamarins. *J. Evol. Biol.* 9: 5–42.
- Clarke AR, Vera MT, Hendrichs J (Eds) Resolution of Cryptic Species Complexes of Tephritid Pests to Enhance SIT Application and Facilitate International Trade. *ZooKeys* 540: 95-124. <https://doi.org/10.3897/zookeys.540.6027>
- Collyer, M. L., Sekora, D. J., & Adams, D. C. 2015. A method for analysis of phenotypic change for phenotypes described by high-dimensional data, 115(4), 357–365. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.75>
- Congrains-Castilho, C. 2017. Padrões evolutivos inferidos por transcriptomas de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). Tese. (Doutorado em Genética e Evolução) - UFSCar.
- Cruz-López, L., E. A. Malo, J. Toledo, A. Virgen, A. Del Mazo, and J. C. Rojas. 2006. A new potential attractant for *Anastrepha obliqua* from *Spondias mombin* fruits. *J. Chem. Ecol.* 32: 351–365.
- Dias, V. S., Silva, J. G., Lima, K. M., Petitinga, C. S. C. D., Hernández-Ortiz, V., Laumann, R. A., ... Joachim-Bravo, I. S. 2016. An integrative multidisciplinary approach to understanding cryptic divergence in Brazilian species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 117(4), 725–746. <https://doi.org/10.1111/bij.12712>.
- Díaz, F.; Lima, A. L.; Nakamura, A.; Fernandes, F.; Sobrinho, I.; De Brito, Reinaldo, A. et al. Evidence for introgression among three species of the *Anastrepha fraterculus* group, a radiating species complex of fruit flies. *Frontiers in Genetics*, 2018, in press.
- Draghi, J. A., & Whitlock, M. C. 2012. Phenotypic plasticity facilitates mutational variance, genetic variance, and evolvability along the major axis of environmental variation, 2891–2902. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01649.x>
- Engen, S., Saether, B.E., Kvalnes, T. & Jensen, H. (2012) Estimating fluctuating selection in age-structured populations. *Journal of Evolutionary Biology*, 25, 1487–1499.
- Frías, LD. 2014. Modes of sympatric speciation in phytophagous insects of diptera Tephritidae and the importance of epigenetics and behavior imprinting in host fidelity. *J Insect Sci Photon* 115:179–194
- Gittleman, J. L., and M. Kot. 1990. Adaptation: statistics and a null model for estimating phylogenetic effects. *Syst. Zool.* 39: 227–241.
- Gómez-Cendra, P. V., Paulin, L. E., Oronõ, L., Ovruski, S. M., & Vilardi, J. C. 2016. Morphometric differentiation among *anastrepha fraterculus* (diptera: Tephritidae) exploiting sympatric alternate hosts. *Environmental Entomology*, 45(2), 508–517. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv224>.

- Gomez-Mestre, I., Touchon, J. C., Caccoccio, V. L., & Warkentin, K. M. (2008). Genetic variation in pathogen-induced early hatching of toad embryos. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 791–800.
- Hadfield, J. 2010. MCMC methods for multi-response generalized linear mixed models: The MCMCglmm R package, (Brown), 1–23.
- Harmon, L.K., and R.E. Glor. 2010. Poor statistical performance of the Mantel test in comparative phylogenetic analyses. *Evolution* 64(7): 2173-2178.
- Harmon LJ, Glor RE. 2010. Poor statistical performance of the Mantel test in phylogenetic comparative analyses. *Evolution* 64:2173–2178
- Hernández-Ortiz V, Gómez-Anaya JA, Sánchez A, McPheron BA, Aluja M. 2004. Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae), and recognition of a distinct Mexican morphotype. *Bulletin of Entomological Research* 94: 487–499. doi: 10.1079/BER2004325
- Hernández-Ortiz, V., Bartolucci, A. F., Morales-Valles, P., Frías, D., & Selivon, D. 2012. Cryptic Species of the *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera: Tephritidae): A Multivariate Approach for the Recognition of South American Morphotypes. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(2), 305–318. <https://doi.org/10.1603/AN11123>
- Hernández-Ortiz, V., Canal, N. A., Tigrero Salas, J. O., Ruíz-Hurtado, F. M., & Dzul-Cauich, J. F. 2015. Taxonomy and phenotypic relationships of the *anastrepha fraterculus* complex in the mesoamerican and pacific neotropical dominions (Diptera, tephritidae). *ZooKeys*, 2015(540), 95–124. <https://doi.org/10.3897/zookeys.540.6027>.
- Katoh, Rozewicki, Yamada 2017 (*Briefings in Bioinformatics, in press*)
MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization.
- Katsoyannos, B. I., N. A. Kouloussis, and N. T. Papadopoulos. 1997. Response of *Ceratitidis capitata* to citrus chemicals under semi-natural conditions. *Entomol. Exp. Appl.* 82: 181–188.
- Keck, F., Rimet, F., Bouchez, A., & Franc, A. (2016). Phylosignal: An R package to measure, test, and explore the phylogenetic signal. *Ecology and Evolution*, 6(9), 2774–2780. <https://doi.org/10.1002/ece3.2051>.
- King, E. G., Roff, D. A., & Fairbairn, D. J. 2011. Trade-off acquisition and allocation in *Gryllus firmus*: A test of the Y model. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(2), 256–264. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02160.x>
- Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 353–357. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>
- Lande, R. 1979. Quantitative genetic analysis of multivariate evolution applied to brain:body size allometry. *Evolution* 33: 402–416.
- Lande, R. 1982. A quantitative genetic theory of life history evolution. *Ecology* 63:607–615.
- Lande, R.; Arnold, S. 1983. The measurement of selection on correlated characters, 37(6), 1210–1226.
- Lessels CM, Boag PT. Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk*. 1987; 104:116–121.
- Lind, M. I., Yarlett, K., Reger, J., Carter, M. J., & Beckerman, A. P. 2015. The alignment between phenotypic plasticity, the major axis of genetic variation and the response to

- selection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1816), 20151651. <http://doi.org/10.1098/rspb.2015.1651>
- Lofsvold, D. 1988. Quantitative genetics of morphological differentiation in *Peromyscus*. II. Analysis of selection and drift. *Evolution* 42: 54–67.
- Lynch, M., and Walsh, B. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Malavasi, A., and J. S. Morgante. 1983. Population-Genetics of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) in Different Hosts - Genetic Differentiation and Heterozygosity. *Genetica* 60: 207–211. Malavasi,
- Malo, E. A., L. Cruz-López, J. Toledo, A. Del Mazo, V. Armando, and J. C. Rojas. 2005. Behavioral and electrophysiological responses of the Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) to guava volatiles. *Fla. Entomol.* 88: 364–371.
- Malo, E. A., I. Gallegos-Torres, J. Toledo, J. Valle-Mora, and J. C. Rojas. 2012. Attraction of the West Indian fruit fly to mango fruit volatiles. *Entomol. Exp. Appl.* 142: 45–52.
- Márquez, E. J., Cabeen, R., Woods, R. P., & Houle, D. 2012. The Measurement of Local Variation in Shape. *Evolutionary Biology*, 39(3), 419–439. <https://doi.org/10.1007/s11692-012-9159-6>
- Marroig, G., & Cheverud, J. M. 2005. Size As a Line of Least Evolutionary Resistance: Diet and Adaptive Morphological Radiation in New World Monkeys. *Evolution*, 59(5), 1128. <https://doi.org/10.1554/04-333>.
- McGuigan, K., & Blows, M. W. 2007. The phenotypic and genetic covariance structure of drosophilid wings. *Evolution*, 61(4), 902–911. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00078.x>.
- McGuigan, K. & Sgró, C. M. 2009 Evolutionary consequences of cryptic genetic variation. *Trends Ecol. Evol.* 24, 305–311. (doi:10.1016/j.tree.2009.02.001)
- Melo, D., G. Garcia, A. Hubbe, A. P. Assis, and G. Marroig, 2015. Evolqg - an R package for evolutionary quantitative genetics [version 3; referees: 2 approved, 1 approved with reservations]. *F1000Res.* 4:925.
- Mengual, X., Kerr, P., Norrbom, A. L., Barr, N. B., Lewis, M. L., Stapelfeldt, A. M., ... Gaimari, S. (2017). Phylogenetic relationships of the tribe Toxotrypanini (Diptera: Tephritidae) based on molecular characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 113, 84–112. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.05.011>.
- Messier, J., B. J. McGill, and M. J. Lechowicz. 2010. How do traits vary across ecological scales? A case for trait-based ecology. *Ecology Letters* 13:838–848.
- Morrissey, M. B. 2016. Meta-analysis of magnitudes, differences and variation in evolutionary parameters. *Journal of Evolutionary Biology*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jeb.12950>
- Nel, P., Bertrand, S., & Nel, A. 2018. Diversification of insects since the Devonian: A new approach based on morphological disparity of mouthparts. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21938-1>
- Munkemuller T, Lavergne S, Bzeznik B, Dray S, Jombart T, Schiffers K, Thuiller W. 2012. How to measure and test phylogenetic signal. *Methods Ecol. Evol.*, 3:743-756.
- Nigg, H. N., L. L. Mallory, S. E. Simpson, S. B. Callahan, J. P. Toth, S. Fraser, M. Klim, S. Nagy, J. L. Nation, and J. A. Attaway. 1994. Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Loew), attraction to host fruit and host kairomones. *J. Chem. Ecol.* 20: 727–743.
- Norrbom, A.L., Carroll, L.E., Thompson, F.C., White, I.M., Freidberg, A., 1999a. Systematic database of names. In: Thompson, F.C. (Ed.), *Fruit Fly Expert Identification System and*

- Systematic Information Database. *Myia* (1998) 9, pp. 65–251, + Diptera Data Dissemination Disk (CD-ROM) (1998).
- Norrbom, A.L., 2004a. Updates to Biosystematic Database of World Diptera for Tephritidae through 1999. Diptera Data Dissemination Disk (CD-ROM) 2.
- Norrbom, A.L., Korytkowski, C.A., 2009. A revision of the *Anastrepha robusta* species group (Diptera: Tephritidae). *Zootaxa* 2182, 1–91.
- Norrbom, A.L., Korytkowski, C.A., Zucchi, R.A., Uramoto, K., Venable, G.L., McCormick, J., Dallwitz, M.J., 2012 (onwards). *Anastrepha* and *Toxotrypana*: descriptions, illustrations, and interactive keys. Version: 29 May 2012. <<http://delta-intkey.com/anatox/intro.htm>> (accessed 12.08.16).
- Norrbom, A.L., Rodriguez, E.J., Steck, G.J., Sutton, B.A., Nolasco, N., 2015. New species and host plants of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) primarily from Peru and Bolivia. *Zootaxa* 4041, 1–94. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4041.1.1>.
- Norrbom, A.L., Barr, N. B., Kerr, P., Mengual, X., Nolasco, N., Rodriguez, E., Steck, G.J., Sutton, B. D., Uramoto, K., Zucchi, R. 2018. Synonymy of *Toxotrypana* Gerstaecker with *Anastrepha* Schiner (Diptera: Tephritidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 120:834:841.
- Oroño, L. E., Paulin, L. E., Alberti, A. C., Hilal, M., Ovruski, S. M., Vilardi, J. C., ... Aluja, M. 2013. Effect of host plant chemistry on genetic differentiation and reduction of gene flow among *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) populations exploiting sympatric, synchronic hosts. *Environmental Entomology*, 42, 790–798. <https://doi.org/10.1603/EN13020>.
- Otte, T., Hilker, M. & Geiselhardt, S. J. 2018. Phenotypic Plasticity of Cuticular Hydrocarbon Profiles in Insects. *Chem Ecol* (2018) 44: 235. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0934-4>.
- Pagel, M. 1999. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* 401:877–884.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K. 2004. Ape: analyses of Phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*. 2004;20(2):289–90.
- Paradis, E. 2017. *Analysis of Phylogenetics and Evolution with R (Second Edition)*. New York: Springer.
- Papadopoulos, N. T., T. E. Shelly, N. Niyazi, and E. Jang. 2006. Olfactory and behavioral mechanisms underlying enhanced mating competitiveness following exposure to ginger root oil and orange oil in males of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Insect Behav.* 19: 403–418.
- Papadopoulos, N. T., N. A. Kouloussis, and B. I. Katsoyannos. 2008. Effect of plant chemicals on the behavior of the Mediterranean fruit fly, pp. 97–106. In R.L.
- Pemberton, J.M. 2010. Evolution of quantitative traits in the wild: mind the ecology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 365, 2431–2438.
- Perre, P., Jorge, L.R., Lewinsohn, T.M., Zucchi, R.A. 2014 Morphometric differentiation of fruit fly pest species of the *Anastrepha fraterculus* group (Diptera: Tephritidae). *Ann Entomol Soc Am* 107:490–495.
- Pigliucci, M. 2001 *Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture*. Baltimore, MD: The John Hopkins University Press
- Relyea, R. A., Stephens, P. R., Barrow, L. N., Blaustein, A. R., Bradley, P. W., Buck, J. C.; Hammond, J. I. 2018. Phylogenetic patterns of trait and trait plasticity evolution: Insights from amphibian embryos. *Evolution*, 72(3), 663–678. <https://doi.org/10.1111/evo.13428>

- Revell, L. J., L. J. Harmon, and D. C. Collar. 2008. Phylogenetic signal, evolutionary process, and rate. *Syst. Biol.* 57:591–601.
- Robacker, D. C., and I. Fraser. 2002a. Do Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae) prefer grapefruit to yellow chapote, a native host? *Fla. Entomol.* 85: 481–487.
- Robacker, D. C., and I. Fraser. 2002b. Attraction of Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae) to grapefruit: enhancement by mechanical wounding of and experience with grapefruit. *J. Insect Behav.* 15: 399–413.
- Robacker, D. C., and I. Fraser. 2003. Relative attractiveness of oranges and grapefruits to Mexican fruit flies (Diptera : Tephritidae) in a wind tunnel. *J. Entomol. Sci.* 38: 566–575.
- Robacker, D. C., W. C. Warfield, and R. A. Flath. 1992. A four-component attractant for the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), from host fruit. *J. Chem. Ecol.* 18: 1239–1254.
- Robinson, M. R., & Beckerman, A. P. (2013). Quantifying multivariate plasticity: Genetic variation in resource acquisition drives plasticity in resource allocation to components of life history. *Ecology Letters*, 16(3), 281–290. <https://doi.org/10.1111/ele.12047>
- Rodriguero, M. S., Vilardi, J. C., Vera, M. T., Cayol, J. P., & Rial, E. 2002. Rodriguero, M. S., Vera, M. T., E. RIAL, Cayol, J. P. and Vilardi, J. C. 2002a. Sexual selection on multivariate phenotype in wild and mass-reared *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Heredity* 89: 480-487.
- Rodriguero, M. S., Vilardi, J. C., Vera, M. T., Cayol, J. P., and Rial, E. 2002b. Morphometric traits and sexual selection in medfly (Diptera: Tephritidae) under field cage conditions. *Florida Entomol.* 85: 143-149.
- Roff, D. 2000. Short Review The evolution of the G matrix : selection or drift ?, 84(October 1999).
- Rohlf FJ. 2014. tpsDIG2, version 2.17.
- Rohlf, F.J. & Slice, D.E. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst. Zool.* 39: 40–59.
- Savell, K. R. R., Auerbach, B. M., & Roseman, C. C. 2016. Constraint, natural selection, and the evolution of human body form. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(34), 9492–9497. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603632113>
- Scally, M., Into, F., Thomas, D.B., Ruiz-Arce, R., Barr, N.B., Schuenzel, E.L., 2016. Resolution of inter and intra-species relationships of the West Indian fruit fly *Anastrepha obliqua*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 101, 286–293.
- Scheiner, S.M. 2002. Selection experiments and the study of phenotypic plasticity. *J. Evol. Biol.* 15: 889–898.
- Schoonhoven, L. M., J.J.A. Loon, and M. Dicke. 2005. *Insect-plant biology*. Oxford University Press, Oxford, London, United Kingdom. p. 421.
- Schutze, M. K., bBourtzis, K., Cameron, S. L., Clarke, A. R., de Meyer, m. , Hee, A. K., Hendrichs, J., Krosch, M. N. and Mwatawala, M. 2017. Integrative taxonomy versus taxonomic authority without peer review: the case of the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Tephritidae). *Syst Entomol*, 42: 609-620. doi:10.1111/syen.12250.
- Sciurano RB, Segura DF, Rodriguero M, Gómez Cendra P, Allinghi A, Cladera JL, et al. 2007. Sexual selection on multivariate phenotype in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from Argentina. *Fla Entomol.*, 90: 163–170.
- Segura DF, Petit-Marty N, Sciurano RB, Vera MT, Calcagno G, Allinghi A, et al. 2007. Lekking behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Fla Entomol* 90: 154–162.29.

- Segura, D. F., Belliard, S. A., Vera, M. T., Bachmann, G. E., Ruiz, M. J., Jofre-barud, F., ... Shelly, T. E. 2018. Plant Chemicals and the Sexual Behavior of Male Tephritid Fruit Flies, (July), 1–26. <https://doi.org/10.1093/aesa/say024>.
- Serb JM, Sherratt E, Alejandrino A, Adams DC. 2017. Phylogenetic convergence and multiple shell shape optima for gliding scallops (Bivalvia: Pectinidae). *J Evol Biol.* 2017;30(9):1736–47.44.
- Schluter, D. 1996. Adaptive radiation along genetic lines of least resistance. *Evolution* 50:1766–1774.
- Sidlauskas B. 2008. Continuous and arrested morphological diversification in sister clades of characiform fishes: a phylomorphospace approach. *Evolution* 62:3135–3156.
- Sobrinho, I. S ; de Brito, R. A. 2010. Evidence for positive selection in the gene fruitless in *Anastrepha* fruit flies.. *BMC Evolutionary Biology (Online)*, v. 10, p. 293.
- Sobrinho, I. S ; de Brito, R. A. 2012. Positive and Purifying Selection Influence the Evolution of Doublesex in the *Anastrepha fraterculus* Species Group. *Plos One*, v. 7, p. e33446.
- Solís-Lemus, C., Knowles, L. L., & Ané, C. 2015. Bayesian species delimitation combining multiple genes and traits in a unified framework. *Evolution*, 69(2), 492–507. doi:10.1111/evo.12582
- Stamatakis, A.; RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies, *Bioinformatics*, Volume 30, Issue 9, 1 May 2014, Pages 1312–1313, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
- Stone, A. 1942. The fruit flies of the genus *Anastrepha*. United States Department of Agriculture Miscellaneous Publications 439: 1–112. doi: 10.1007/978-1-4757-2278-9_2 Sundberg
- Tan, K. H., N. Ritsuo, E. B. Jang, and T. E. Shelly. 2014. Pheromones, male lures and trapping of tephritid fruit flies, pp. 15–74. In T. Shelly, N. Epsky, E. B. Jang, J. Reyes-Flores, R. Vargas, (eds.), *Trapping and the detection, control, and regulation of tephritid fruit flies: lures, area-wide programs, trade implications*. Springer International Publishing, Dordrecht, the Netherlands. Teal.
- Vera, M. T., Ruiz, M. J., Oviedo, A., Abraham, S., Mendoza, M., Segura, D. F., ... Willink, E. 2013. Fruit compounds affect male sexual success in the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*, 137(SUPPL.1), 2–10. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01516.x>
- Virgilio, M., T. Backeljau, N. Barr, and M. DeMeyer. 2008. Molecular evaluation of nominal species in the *Ceratitis fasciventris*, *C. anonae*, *C. rosa* complex (Diptera: Tephritidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 48: 270–280.
- Wood, C. W., & Brodie, E. D. 2016. Evolutionary response when selection and genetic variation covary across environments. *Ecology Letters*, 19(10), 1189–1200. <https://doi.org/10.1111/ele.12662>.
- van der Linde, K. & Houle, D. 2009. Inferring the Nature of Allometry from Geometric Data. *Evolutionary Biology*, 36, 311–322.
- Wang, Y., Ma, Y., Zhou, D. S., Gao, S. X., Zhao, X. C., Tang, Q. B., ... Van Loon, J. J. A. (2017). Higher plasticity in feeding preference of a generalist than a specialist: Experiments with two closely related *Helicoverpa* species. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18244-7>
- Zhang C, Sayyari E, Mirarab S. 2017. ASTRAL-III: Increased Scalability and Impacts of Contracting Low Support Branches In: Meidanis J, Nakhleh L, editors. *Lecture Notes in Computer Science*. vol. 10562 LNBI. Cham: Springer,. p. 53–75.

Zucchi, R. A. Espécies de *Anastrepha*, sinónimas, plantas hospedeiras e parasitóides. In: MALAVASI, A. e ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: Conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto, Brazil: Holos, 2000a. p.41-48.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos estudos evolutivos têm focado no aspecto univariado, desconsiderando que caracteres complexos raramente evoluem independente de outros e que diante de pressões seletivas, podem compelir a uma resposta fenotípica evolutiva na direção da seleção, por estarem sob o regime de padrões de correlação criados por pleiotropia ou desequilíbrio de ligação. As análises multivariadas desenvolvidas nos presentes estudos permitiram uma melhor compreensão de padrões evolutivos em caracteres morfológicos, decompondo a resposta à seleção e os gradientes de seleção.

A partir desta abordagem, no inseto modelo moscas de olhos pedunculados (Stalk-eyed fly), encontramos que a seleção artificial ocasionou mudanças no fenótipo alvo, comprimento do pedúnculo do olho e em outros caracteres não-alvo em ambas as linhagens selecionadas. Desta forma, investigamos o relacionamento dos caracteres com a matriz G, bem como a resposta à seleção, que revelaram correlação positiva entre estes caracteres e uma resposta correlacionada à seleção, sugerindo a ação não-intencional da seleção em caracteres não-alvos. Avaliamos também que a resposta à seleção dos caracteres alvo e não-alvo muda frente a disponibilidade de recursos, sugerindo uma plausível compensação energética com uma persistente ação da seleção não-intencional. Assim, nossos resultados sugerem que a seleção operou diretamente no pedúnculo dos olhos, mas indiretamente em parâmetros da asa (particularmente a largura), possivelmente para evitar perdas de performance pelo efeito do tamanho exagerado dos olhos no vôo de machos.

Em espécies de *Anastrepha*, a estratégia multivariada combinando métodos filogenéticos comparativos por Morfometria geométrica/distâncias lineares com genética quantitativa evolutiva, permitiu explorar dentre os caracteres analisados, que alguns apresentam sinal filogenético que diferenciaria espécies de grupos diferentes. No entanto,

dentro do grupo *fraterculus* as diferenças são menores, apenas com sinal filogenético no Ápice do Acúleo e forma da asa, baixa distinção também encontradas nas análises exploratórias que caracterizando disparidades pequenas, provavelmente pela alta variação intraespecífica. Por outro lado, a maioria dos caracteres analisados não apresentou sinal filogenético, evidenciando que a evolução morfológica não seguiu o modelo estocástico (Movimento Browniano), corroborado pela correlação dos componentes principais matriz da ancestral, a qual sugere um força direcionando/impulsionando as mudanças. Diante destas constatações e da ampla exploração de hospedeiros por algumas espécies, nós investigamos o papel da seleção e da plasticidade em espécies polípagas explorando múltiplos hospedeiros. Este estudo envolveu a comparação de *A. sp2 aff. fraterculus* e *A. obliqua* que emergiram de três hospedeiros diferentes, permitindo a avaliação do nível de plasticidade fenotípica associado a emergência de diferentes frutos. Desta forma, encontramos influência da plasticidade fenotípica correlacionada com a resposta à seleção, sugerindo alta associação das espécies com seus respectivos hospedeiros, reforçando o papel da seleção e da plasticidade no processo de adaptação, além d seu impacto no sinal filogenético. A combinação destas estratégias comparativas filogenéticas sugere que há de fato sinal filogenético remanescente em alguns caracteres para alguns contrastes, embora a plasticidade fenotípica encontrada possa ser o suficiente para dificultar um diagnóstico robusto das espécies do grupo *fraterculus* sem a aplicação de uma abordagem quantitativa e sem considerar o hospedeiro de onde eclodiram.

Assim, nossos estudos corroboram trabalhos teóricos e empíricos que evidenciam que a resposta à seleção pode revelar potenciais padrões evolutivos em insetos influenciados por pressões diretas ou indiretas do ambiente, ainda este trabalho reforça a necessidade de

considerar o aspecto multivariado dado que fenótipos complexos podem ser moldados por relações criadas por pleiotropia e desequilíbrio de ligação.