

Felipe Bastos Rocha

**“Plasticidade fenotípica em *Drosophila mediopunctata*:
não-linearidade e correlações com valor médio”**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

FELIPE BASTOS ROCHA

“PLASTICIDADE FENOTÍPICA EM *DROSOPHILA*
***MEDIOPUNCTATA*: NÃO-LINEARIDADE E CORRELAÇÕES COM**
VALOR MÉDIO”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
<i>Felipe Bastos Rocha</i>
aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. LOUIS BERNARD KLACZKO

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

R582p Rocha, Felipe Bastos, 1981-
Plasticidade fenotípica em *Drosophila mediopunctata*: não-linearidade e correlações com valor médio /
Felipe Bastos Rocha. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. Normas de reação. 2. Interação genótipo-ambiente. 3. Pigmentação. 4. Pleiotropia genética. 5. Restrições de desenvolvimento. I. Klaczko, Louis Bernard, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Phenotypic plasticity in *Drosophila mediopunctata*: nonlinearity and correlation with mean value

Palavras-chave em Inglês:

Reaction norms

Genotype-environment interaction

Pigmentation

Genetic pleiotropy

Developmental constraints

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Louis Bernard Klaczko [Orientador]

Gabriel Henrique Marroig Zambonato

Vera Nisaka Solferini

Arício Xavier Linhares

Alexandre Afrânio Peixoto


Data da defesa: 28-01-2013

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

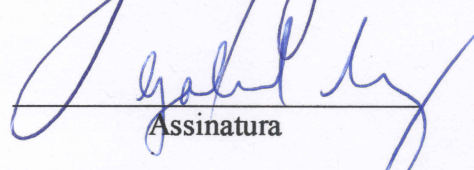
Campinas, 28 de janeiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

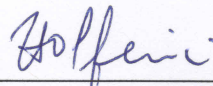
Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko (Orientador)


Assinatura

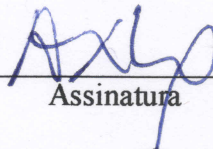
Prof. Dr. Gabriel Henrique Marroig Zambonato


Assinatura


Profª. Dra. Vera Nisaka Solferini


Assinatura

Prof. Dr. Aricio Xavier Linhares


Assinatura

Dr. Alexandre Afranio Peixoto


Assinatura

Prof. Dr. Andre Victor Lucci Freitas

Assinatura

Profª. Dra. Blanche Christine Birtner-Mathé Leal

Assinatura

Prof. Dr. Fabio Papes

Assinatura

Para Maína e Beatriz.

Agradecimentos

Aos meus pais, Helenice e Ewaldo, a confiança e apoio irrestritos que foram e continuam sendo essenciais.

A Mãina, que me trouxe de volta a Campinas, por aceitar me acompanhar nas aventuras que propus e estar ao meu lado sempre. Pela ajuda em coletas e em repiques quase infinitos, pela companhia em experimentos de fim de semana e por ser sempre a primeira a acreditar em mim.

A Eraldo e Vera, por estarem junto e apoiarem sempre que puderam.

Ao Prof. Louis Bernard Klaczko, por me receber de volta em seu laboratório. Por toda a formação que é difícil descrever objetivamente, mas inequivocamente existe. Por Mainz, e pela compreensão e apoio sempre que necessário.

A Hermes Fonsêca de Medeiros, por ajudar no primeiro experimento de normas de reação e por dar assistência, à distância, à construção dos novos aparelhos de gradiente térmico.

A Marcos Batista, parceiro no trabalho de campo e de laboratório, pela companhia animada e por estar sempre disposto a ajudar no que fosse preciso, especialmente o experimento de populações artificiais.

A Diogo Moraes, pela ajuda em coletas e na construção dos novos gradientes; a Camila Purchatti, Gustavo Passos e Camila Parmejani, por ajudarem, em diferentes momentos, com o trabalho de montagem de asas.

A Klélia Carvalho, pela ajuda com as burocracias inevitáveis. A Klélia, Salete e Claudete, por todo o trabalho sem o qual esta tese não existiria, e pela companhia sempre agradável durante os anos de doutorado.

A Iuri, Klélia e Mitsue, pela divertida companhia e conversas sobre tudo. A Horácio Montenegro, pela revisão paciente de um dos trabalhos e conversas encorajadoras.

Aos demais colegas do laboratório, Gália, Ayana e Renato, pela companhia e convívio.

A Andrea Klaczko e Leonardo Ré Jorge, pelas belas fotografias de *Drosophila mediopunctata*.

Ao Dr. Léo Nascimento, Coordenador de Pesquisa do Parque Nacional do Itatiaia (Itatiaia, RJ) pelas autorizações concedidas para a realização do trabalho de campo e a Joel, pela recepção no alojamento do Parque. A Cecilia Faria, Analista Ambiental do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, pelas autorizações para coleta e uso de alojamento do Parque.

Ao Prof. Gert Pflugfelder, por me receber em seu laboratório e propiciar uma introdução ao mundo da biologia molecular de *Drosophila*. Aos colegas do laboratório de Mainz: Theoni, Lisa, Fred, Katrin e Inka, pela disponibilidade e naturalidade com que me receberam e ajudaram durante os meses em que estive no laboratório.

A Anni Schütz, pelos mimos e cuidados com Beatriz e por receber a mim e minha família tão bem em Nieder-Olm.

A Louis e Eliane, pelo apoio e companhia em Mainz e a Mitsue, pelas várias conversas e suporte no trabalho em terra estrangeira.

Aos Professores da pré-banca e banca de minha tese, Gabriel Marroig, Alexandre Peixoto, Vera Solferini, Arício Linhares, André Freitas, Fabio Papes, Blanche Christine Leal e Louis Bernard Klaczko, por se disporem a analisar este trabalho.

Às instituições financiadoras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão (FAEPEX) da Unicamp, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“As coisas estão no mundo só que eu preciso aprender”

(Paulinho da Viola)

“De curvas é feito todo o universo”

(Oscar Niemeyer)

Resumo

Apesar de descrever a dinâmica populacional da variação genética, a teoria da genética de populações não descreve como a interação entre genótipos e os ambientes onde estes se desenvolvem gera distribuições fenotípicas. As normas de reação representam uma possível estratégia para tal descrição; elas representam a resposta fenotípica de cada genótipo para uma variável ambiental e, com isso, expõem a variação causada pela plasticidade fenotípica e capturam o fenômeno da interação genótipo-ambiente. Neste trabalho, *Drosophila mediopunctata* foi utilizada como organismo modelo. Ela é uma espécie do grupo *tripunctata*, do gênero *Drosophila*, polimórfica para inversões do segundo cromossomo e para um padrão de pigmentação conspícuo nos tergitos abdominais, formado por fenótipos que podem apresentar de zero a três pintas escuras. Na primeira parte deste trabalho, é apresentado um teste da independência genética entre a plasticidade fenotípica e o valor médio do polimorfismo de pigmentação. Foram utilizadas oito estirpes homocariótípicas para inversões do cromossomo II com diferentes valores fenotípicos médios para analisar a variação de normas de reação do número de pintas à temperatura. As normas de reação desse caráter foram parábolas cujas curvaturas estão correlacionadas ao valor médio, indicando que a variação dessas duas características pode ser determinada por pleiotropia. O mesmo padrão foi observado em heterozigotos resultantes de cruzamentos entre estirpes com normas de reação de curvaturas diferentes, evidenciando que a variação das normas de reação do número de pintas de *D. mediopunctata* é previsível por uma regra simples de associação entre forma (curvatura) e valor médio. Na segunda parte deste trabalho é apresentada uma análise de 40 normas de reação de cinco caracteres diferentes na qual se buscou estabelecer um padrão geral de forma das normas de reação e verificar as consequências desse padrão para estudos que investigam a variação da plasticidade fenotípica com modelos e métodos baseados na linearidade. Os resultados apresentados mostram que a forma típica das normas de reação é não-linear. Quando analisadas com um desenho experimental apropriado apenas para curvas lineares, i.e. com somente três ambientes, tais curvas apresentam um padrão imprevisível de variação, fundamentando um conceito de interação genótipo-ambiente associado à imprevisibilidade. Além disso, o uso de um modelo linear para descrever a variação da plasticidade fenotípica em normas de reação não-lineares leva à perda de informação e, em alguns casos, a artefatos que embasam conclusões falsas. Considerando os resultados e conclusões obtidos, é proposta uma nova visão sobre normas de reação e plasticidade fenotípica, baseada no uso de um modelo parabólico e em desenhos experimentais mais abrangentes e detalhados, que permitiriam descrever a forma e variação das normas de reação sem perder fenômenos e padrões importantes.

PALAVRAS-CHAVE: normas de reação; interação genótipo-ambiente; pleiotropia.

Abstract

Despite describing the population dynamics of genetic variation, the theory of population genetics lacks a description of how genotype and developmental environment interact to generate a phenotypic distribution. Such a description could be achieved through reaction norms, which give the phenotypic response of individual genotypes to a given environmental variation and describe the variation due to phenotypic plasticity and genotype-environment interaction. Here, we used *Drosophila mediopunctata* as a model organism. This species belongs to the *tripunctata* group of the genus *Drosophila*, and is polymorphic for second chromosome inversions. *D. mediopunctata* specimens display a conspicuous pigmentation polymorphism in the abdomen, with phenotypes ranging from zero to three dark spots in the last three tergites. In the first part of this study, we describe a test of the genetic independency between phenotypic plasticity and mean phenotypic value for the pigmentation polymorphism of *D. mediopunctata*. We analyzed the reaction norms of the number of abdominal spots in response to temperature of eight strains homozygous for second chromosome inversions and with different mean phenotypic values. The reaction norms were parabolic, and their curvature was correlated with the mean phenotypic value, suggesting that the variation of these two traits may be determined by pleiotropy. The same pattern was observed in heterozygous genotypes resulting from crosses between strains with different reaction norm curvatures. These results show that the variation of reaction norms of the number of dark abdominal spots of *D. mediopunctata* is predictable by a simple association rule between shape (curvature) and mean value. In the second part of this study we show the results from the analysis of 40 reaction norms of five different traits, which had two aims: establishing a general pattern of reaction norms shape; and verifying the impact of this pattern for studies that investigate the variation of phenotypic plasticity using models and methods based on a linearity assumption. The results show that the typical reaction norm shape is nonlinear. A pattern of unpredictable variation emerges when these curves are analyzed with only three environments, suggesting that the association of genotype-environment interaction with unpredictability may be due to the use of an experimental design only suitable for linear curves. Furthermore, the use of a linear model to describe the variation of nonlinear reaction norms leads to loss of information and, in some cases, artifacts which support false conclusions. Considering these results, we propose a new vision of reaction norms and phenotypic plasticity which is based on the use of a parabolic model and on more comprehensive and detailed experimental designs which would describe the shape and variation of reaction norms without losing important patterns and phenomena.

KEYWORDS: reaction norms; genotype-environment interaction, pleiotropy.

Sumário

INTRODUÇÃO	1
Genética de populações e determinação da variação fenotípica	1
Leis de transformação e modelos	5
Tipos de variação e hipóteses de herança.....	5
Desenvolvimento, evolução e a teoria de herança de Weismann	6
O gene na teoria da genética de populações	7
Ambiente e desenvolvimento na teoria da genética de populações	8
Retorno do ambiente e do desenvolvimento à teoria evolutiva.....	9
I) Biologia evolutiva do desenvolvimento	9
II) Plasticidade fenotípica	11
i. Plasticidade fenotípica como facilitadora da evolução	12
ii. Plasticidade fenotípica e normas de reação.....	15
Conjecturas e hipóteses sobre a evolução da plasticidade fenotípica	23
<i>Drosophila mediopunctata</i> como organismo modelo	23
OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO DA TESE.....	26
1. BASE GENÉTICA DA PLASTICIDADE FENOTÍPICA.....	27
The Reaction Norm for Abdominal Pigmentation and its Curve in <i>Drosophila mediopunctata</i> Depend on the Mean Phenotypic Value.....	28
Introduction	28
Material and Methods	29
Strains	29
Experimental procedures	30
Statistical analysis.....	30
Results	30
Rationale	30
Karyotype and phenotypic group effects	30
Reaction norm shape.....	31
Discussion.....	31
Temperature effect.....	31
Mean phenotypic value, second chromosome inversion and reaction norm.....	32
Mean value and phenotypic plasticity.....	33
Acknowledgment.....	34
Literature cited.....	34

Apêndice ao Trabalho: Rocha, F., H. F. Medeiros & L. B. Klaczko. 2009. The reaction norm for abdominal pigmentation and its curve in <i>Drosophila mediopunctata</i> depend on the mean phenotypic value. <i>Evolution</i> 63:280-287.....	36
Introdução - questões derivadas da correlação entre curvatura e valor médio	36
Material e métodos	37
Resultados e discussão	37
2. FORMA E VARIAÇÃO DAS NORMAS DE REAÇÃO	42
Connecting the Dots of Nonlinear Reaction Norms Unravels the Threads of Genotype–Environment Interaction in <i>Drosophila</i>	43
Introduction	43
Material and Methods	46
Descriptions of the shape of 40 RNs.....	46
Analysis of three temperature RNs	47
Tests of the effect of nonlinearity of RNs	47
Results	48
Describing the shape of a set of RNs of different traits	48
Describing the variation of three temperature RNs.....	49
Discussion.....	49
Are RNs typically linear or nonlinear curves?.....	49
Nonlinear RNs and the two/three-point-curve experimental design—pessimistic view.....	50
Nonlinear RNs and the two/three-point-curve experimental design—the optimistic view as a first step toward RN description	50
Nonlinear RNs and the two/three-point-curve experimental design—the optimistic view can be misleading ...	51
Delineating a view on RNs, PP, and GxE which takes into account the nonlinearity of RNs	52
Caveats.....	53
Concluding remarks	53
Acknowledgments	53
Literature cited.....	54
Apêndice do Trabalho: Rocha, F.B. & L.B. Klaczko. 2012. Connecting The Dots Of Nonlinear Reaction Norms Unravels The Threads Of Genotype-Environment Interaction In <i>Drosophila</i>. <i>Evolution</i> 66: 3404–3416.	56
Material suplementar	56
Supplementary Figure	56
Supplementary Tables	57
CONCLUSÕES GERAIS.....	60
PERSPECTIVAS.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

INTRODUÇÃO

Em oposição à ideia de que o método científico seria impulsionado pela inferência baseada em muitas observações, ou indução, Popper (1963) propôs que “O método real da ciência é operar com conjecturas: saltar até as conclusões – muitas vezes depois de uma única observação”¹. Nesse cenário, “observações e experimentos repetidos funcionam (...) como tentativas de refutação”² (Popper, 1963). A refutação de uma conjectura, entretanto, requer que não se perca de vista sua natureza infundada, *i.e.*, que conjecturas são proposições que carecem de verificação. Quando tal característica é ignorada, ou esquecida, uma ideia que tenha se originado como uma conjectura pode ser tomada por uma proposição tão evidente que não precisa ser demonstrada, ou um axioma. Nesse caso, evidências que sirvam à refutação da conjectura podem ter seu significado ignorado, uma vez que a validade da proposição em si teria deixado de ser uma questão.

Genética de populações e determinação da variação fenotípica

Segundo Provine (1971), a teoria da genética de populações surgiu a partir da síntese entre Darwinismo, Mendelismo e Biometria. Uma análise formal dessa teoria foi feita por Lewontin (1974a), que buscou destacar suas questões fundamentais e problemas epistemológicos.

Segundo Lewontin (1974a), a teoria da genética de populações pode ser compreendida como a teoria que descreve a origem e dinâmica da variação genética numa população. Para alcançar esse objetivo, tal teoria tem que lidar com um aspecto importante,

¹ Citações ao longo do texto são traduções livres feitas pelo autor.

Texto original: *The actual procedure of science is to operate with conjectures: to jump to conclusions - often after one single observation.*

² Texto original: *Repeated observations and experiments function (...) as attempted refutations.*

porém pouco considerado, da dinâmica populacional da variação genética: o fato de que os processos que afetam a variação genética ocorrem em dois níveis distintos, porém relacionados, o nível do fenótipo e o do genótipo. Enquanto as regras de herança e os efeitos de amostragem afetam diretamente a distribuição genotípica, sem depender da distribuição de fenótipos, a seleção natural, apesar de afetar a distribuição de genótipos, é função direta dos fenótipos, dependendo, portanto, da distribuição fenotípica.

Para dar conta dessa complexidade, Lewontin (1974a) descreve a estrutura teórica da genética de populações envolvendo dois espaços: um espaço fenotípico e um espaço genotípico. Dessa forma, há um espaço onde atuam as leis que descrevem os processos que afetam a variação genética através do fenótipo (espaço fenotípico) e outro espaço para as leis que descrevem os processos que ocorrem diretamente sobre a distribuição de genótipos (espaço genotípico). Essa separação, entretanto, não implica independência entre genótipo e fenótipo: a distribuição de fenótipos que será afetada pelas leis do espaço fenotípico é determinada pela distribuição de genótipos que dá início a uma geração, enquanto a distribuição de genótipos que será afetada pelas leis do espaço genotípico é condicionada pela distribuição de fenótipos que a população alcança através das leis que atuam no espaço fenotípico. Conseqüentemente, uma teoria que pretenda descrever a evolução de uma população deve incluir não só leis que correspondam aos processos que ocorrem dentro de cada espaço, mas também leis que permitam “traduzir” o resultado dos processos que ocorrem em um espaço para o outro. Assim, Lewontin (1974a) descreve as leis que compõem a estrutura teórica da genética de populações em quatro conjuntos:

T_1 – leis que regem as transformações do espaço genotípico para o fenotípico, considerando como genótipo e ambiente interagem na formação do fenótipo;

T_2 – leis que descrevem os processos que ocorrem dentro do espaço fenotípico, dentro de uma mesma geração, incluindo seleção, migração etc.;

T_3 – leis que determinam as transformações do espaço fenotípico de volta para o espaço genotípico, deduzindo que genótipo corresponde a cada fenótipo; e

T_4 – leis que descrevem os processos que ocorrem dentro do espaço genotípico, de uma geração para a seguinte (Lewontin, 1974a).

Assim, T_2 e T_4 correspondem aos processos que alteram as frequências genotípicas dentro do espaço fenotípico e genotípico, respectivamente, enquanto T_1 e T_3 permitem traduzir a distribuição produzida num espaço em uma distribuição descrita nos termos do outro espaço.

Lewontin (1974a) argumenta, porém, que a teoria da genética de populações, na realidade, foi construída como dois sistemas teóricos paralelos que não consideram a transição entre os espaços genotípico e fenotípico: um sistema Mendeliano e um sistema Biométrico. Enquanto o primeiro descreve as mudanças que ocorrem ao longo do tempo numa população utilizando apenas o espaço genotípico, o segundo descreve esse processo usando apenas o espaço fenotípico. Para possibilitar o funcionamento de uma teoria com essa configuração, cada sistema teórico criou pseudo-parâmetros que permitem descrever as mudanças na variação genética em um espaço ao longo do tempo sem fazer referência a qualquer parâmetro do outro espaço. Assim, a equação $\Delta p = \frac{spq^2}{1-sq^2}$ prevê como a frequência de um alelo varia em uma geração considerando apenas as frequências gênicas e um coeficiente de seleção que é função do genótipo, não do fenótipo. Um equivalente no sistema Biométrico, a equação de predição $R = h^2S$ descreve a variação no valor médio de

um caráter como função apenas de termos fenotípicos, o diferencial de seleção e a herdabilidade.

Assim, como evidencia a análise de Lewontin (1974a), a teoria da genética de populações foi construída sem contemplar as leis de transformação que ligam os espaços genotípico e fenotípico (T_1 e T_3), deixando de oferecer uma descrição dos processos de formação da variação fenotípica. Apesar disso, prevê-se, dentro do sistema Biométrico, que a variação fenotípica é causada e, portanto, pode ser atribuída a duas fontes de variação: genótipo e ambiente. Portanto, apesar de as fontes de variação serem conhecidas e da possibilidade de se atribuir a essas fontes uma parte da variação, não se conhecem as leis que determinam os efeitos que cada fonte tem sobre a variação fenotípica.

Em *A Origem das Espécies*, Darwin (1872) afirma que a variação observada nos organismos, que é essencial para sua teoria, pode ter diferentes causas: a natureza do organismo, a natureza das condições em que o organismo vive e o uso e desuso. Apesar disso, Darwin declara que “Nossa ignorância sobre as leis da variação é profunda”³, pois “Nem em um caso dentre uma centena podemos nos arriscar a indicar qualquer razão por que essa ou aquela parte variou”⁴ (Darwin, 1872). Portanto, apesar de haver uma percepção de que diferentes causas estão envolvidas na geração da variação observada, não se sabia como e o quanto esses fatores contribuíam para essa variação. Dessa forma, a teoria da genética de populações descrita por Lewontin (1974a) reflete o que pode ser pensado como parte de uma lacuna que já estava presente na teoria da evolução proposta por Darwin (1872) em *A Origem das Espécies*.

³ Texto original: *Our ignorance of the laws of variation is profound.*

⁴ Texto original: *Not in one case out of a hundred can we pretend to assign any reason why this or that part has varied.*

Leis de transformação e modelos

Compreender que estratégia seria necessária para preencher essa lacuna, conectando os espaços genotípico e fenotípico, requer a análise das leis que foram evitadas na construção da teoria da genética de populações. O primeiro grupo de leis (T_1) é composto por “leis que dão a distribuição de fenótipos que resultam do desenvolvimento de vários genótipos em vários ambientes”⁵, enquanto o segundo (T_2) representa as leis que “permitem inferências sobre a distribuição de genótipos que corresponde à distribuição de fenótipos”⁶ resultante das leis T_2 (Lewontin, 1974a).

Portanto, para preencher a lacuna entre os corpos Mendeliano e Biométrico é necessário descrever as regras que determinam os fenótipos produzidos por diferentes genótipos quando submetidos a vários ambientes. Da mesma forma, precisa-se descrever a distribuição de um conjunto de genótipos em diferentes ambientes. A inferência no sentido contrário, (T_3), é mais complexa e requereria que se conhecesse, no mínimo, a distribuição fenotípica resultante dos processos que acontecem no espaço fenotípico e a distribuição de ambientes onde ocorreu o desenvolvimento dos diferentes fenótipos.

Tipos de variação e hipóteses de herança

Para que a seleção natural ocorra, tão fundamental quanto a existência de variação é que esta seja herdável. Como consequência, “Qualquer variação que não seja herdada não tem importância para nós”⁷ (Darwin, 1872). Darwin dividia a variação em duas categorias: a das variações singulares, na qual estavam as diferenças incomuns e descontínuas, também

⁵ Texto original: *laws that give the distribution of phenotypes that result from the development of various genotypes in various environments*

⁶ Texto original: *allow inferences about the distribution of genotypes corresponding to the distribution of phenotypes*

⁷ Texto original: *Any variation which is not inherited is unimportant for us*

chamadas de *sports* ou *saltations*; e a das diferenças individuais, constituída pelas pequenas variações de características normais, apresentadas pela prole de um casal.

Cada tipo de variação teria efeitos diferentes numa população. As variações singulares, por serem alterações surgidas apenas em um indivíduo, seriam rapidamente perdidas por cruzamentos sucessivos com indivíduos normais. Já as diferenças individuais, por serem pequenas variações presentes em vários indivíduos da população, não teriam seu efeito diluído (Darwin, 1872; Provine, 1971) e por isso poderiam ser afetadas pela seleção natural. Tais resultados eram previstos pela teoria da Pangênese de Darwin, que descrevia como herança por mistura (o mecanismo de herança mais aceito à época da publicação de *A Origem das Espécies* - Morris, 1994) e herança de caracteres adquiridos teriam papéis importantes na determinação da variação herdável (Olby, 1963; Provine, 1971). Como consequência de tais previsões, diferenças individuais e variações singulares tinham relevâncias diferentes para a teoria de evolução de Darwin: a evolução se daria pela ação da seleção natural sobre as pequenas variações (diferenças individuais), enquanto as variações singulares teriam pouca importância evolutiva (Darwin, 1872).

Desenvolvimento, evolução e a teoria de herança de Weismann

A primeira teoria de herança completa a propor uma alternativa à teoria da Pangênese de Darwin foi elaborada por August Weismann (1892; traduzido para o inglês em 1893)⁸. Como alternativa à Pangênese, Weismann criou o conceito da continuidade do Germoplasma, no qual propôs que haveria duas linhagens de células distintas em cada organismo, uma contendo o material responsável pela herança, o germoplasma, e o soma.

⁸ Neste trabalho será citada a versão inglesa de 1893, no entanto, a primeira edição é em alemão: Weismann, A. 1892. *Das Keimplasma: eine Theorie der Vererbung*. Fischer, Jena. Disponível em: <http://www.deutschestextarchiv.de/weismann/keimplasma/1892/viewer/image/7/> Consultado em 28/12/2012.

Enquanto o germoplasma formaria um elo contínuo entre gerações, o soma seria o recipiente temporário que sofreria os efeitos da seleção natural (Weismann, 1893; Buss, 1987). As modificações que ocorressem ao longo da ontogenia de um indivíduo afetariam apenas o soma, deixando o material responsável pela herança protegido de alterações causadas pelo ambiente ou por uso e desuso. Consequentemente, considerando que o objeto central da teoria de evolução por seleção natural seria a variação herdável, o maior desafio para o avanço dessa teoria seria o esclarecimento da natureza do germoplasma e dos mecanismos e leis da herança.

O gene na teoria da genética de populações

Com a redescoberta das leis de herança de Mendel, porém, o primeiro movimento que surgiu não foi no sentido de completar a teoria darwiniana com um mecanismo que preservasse a variação (Provine, 1971). Ao contrário, com a Teoria da Mutação, Hugo de Vries defendeu que o surgimento de novas espécies não acontecia gradualmente por evolução darwiniana, mas por saltos causados por mutações, que levariam ao surgimento imediato de uma diferença (Allen, 1969). Assim, as leis de herança de Mendel serviram, num primeiro momento, a uma defesa do papel das variações singulares, em oposição às diferenças individuais, como o tipo de variação fundamental para a evolução. Tal argumento foi superado quando R.A. Fisher (1918) demonstrou que as diferenças individuais também podiam ser determinadas por genes que seguiam as mesmas regras de herança das mutações de determinação mendeliana, bastando que tivessem uma base genética multifatorial (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998).

Com essa demonstração, abriu-se caminho para a Síntese Moderna, através da qual a teoria evolutiva encontrou nas leis de herança de Mendel e, posteriormente, nas

descobertas impulsionadas pelas técnicas da biologia molecular, o conceito e a molécula responsáveis pela variação herdável: o gene e o DNA. Tais descobertas moldaram o núcleo da teoria da genética de populações, na qual evolução passou a ser definida como “uma mudança nas frequências gênicas nas populações” (e.g. Dobzhansky, 1951) e consolidaram a noção de que a informação contida nos genes funcionaria como um “programa genético” contendo todas as instruções para a fabricação de um organismo (Nijhout, 1990; Blumberg *et al.*, 2010).

Ambiente e desenvolvimento na teoria da genética de populações

Enquanto o gene recebeu prioridade na construção da teoria de genética de populações, os processos de desenvolvimento e as influências do ambiente sobre o fenótipo foram, sempre que possível, ignorados (Buss, 1987; Gilbert & Epel, 2009). As questões sobre desenvolvimento ficaram, até a metade do século XX, confinadas ao trabalho dos embriologistas, que tiveram pequena – ou nenhuma – participação na formulação da Síntese Moderna (Buss, 1987). O papel do ambiente, por sua vez, foi entendido de duas formas diferentes. No modelo de seleção natural que resultou da síntese entre Mendelismo e Darwinismo, o ambiente pode estar relacionado às diferenças de valores adaptativos entre genótipos, mas não é considerado um parâmetro (Hartl & Clark, 2006). Nas análises da genética quantitativa que, por definição, lidam com a variação fenotípica, o ambiente inevitavelmente está presente por ser uma das fontes de variação (Falconer & Mackay, 1996). Nesse contexto, o componente ambiental da variação é entendido (e nomeado) como um desvio em relação ao valor originalmente determinado pelo genótipo que, quando não pode ser negado (Tabery, 2008), é considerado um ruído ou fonte de erro (Lande, 1987; Falconer & Mackay, 1996).

Assim, é possível perceber na Síntese Moderna e, mais especificamente, na teoria da Genética de Populações, evidências de uma visão iniciada pela teoria do Germoplasma de Weismann (1893): “após a publicação de *A Origem das Espécies* de Darwin, mas antes da aceitação geral das ideias de Weismann, questões de evolução e de desenvolvimento estavam inextricavelmente ligadas. Uma consequência do conceito de Weismann da separação entre linhagem germinal e soma foi tornar possível compreender genética, e, conseqüentemente, evolução, sem compreender o desenvolvimento”⁹ (Maynard Smith, 1982).

Ao tornar o desenvolvimento e, com ele, a influência do ambiente sobre o fenótipo, irrelevantes para a compreensão da evolução, a teoria de herança de Weismann tornava desnecessário descrever os processos e regras que estabelecem as relações entre distribuições de genótipos e de fenótipos. Portanto, a construção da teoria da genética de populações como dois sistemas teóricos que evitaram descrever as relações entre distribuições de genótipos e de fenótipos (leis T_1 e T_3 de Lewontin 1974a) pode estar relacionada ao sucesso da hipótese do Germoplasma de Weismann e à influência que teve sobre o modo de pensar a teoria evolutiva.

Retorno do ambiente e do desenvolvimento à teoria evolutiva

I) Biologia evolutiva do desenvolvimento

Recentemente, porém, tornou-se comum a defesa do desenvolvimento como parte importante da teoria evolutiva (Gilbert, 2010). Com o avanço das técnicas moleculares que, a princípio, tiveram o papel de reforçar a primazia do gene na teoria evolutiva (Gilbert &

⁹ Texto original: *after the publication of Darwin's Origin of species, but before the general acceptance of Weismann's views, problems of evolution and development were inextricably bound up with one another. One consequence of Weismann's concept of the separation of the germ line and soma was to make it possible to understand genetics, and hence evolution, without understanding development.*

Epel, 2009), ficou claro que havia fenômenos e padrões relacionados ao desenvolvimento que não foram contemplados pela Síntese Moderna, mas tinham importantes implicações para a compreensão da evolução (Carroll, 2005; Gilbert & Epel, 2009; Arthur, 2011). Os autores que defendem tal posição fazem uma defesa consistente da necessidade de uma nova síntese na teoria evolutiva, promovendo uma visão da evolução que ficou conhecida como biologia evolutiva do desenvolvimento, ou *evo-devo* (do termo em inglês *evolutionary developmental biology*) (Carroll, 2005; Gilbert & Epel, 2009; Arthur, 2011).

Um dos primeiros resultados que impulsionaram essa área foi demonstrado por King & Wilson (1975), que contrastaram as diferenças morfológicas entre humanos e chimpanzés com as diferenças entre proteínas e sequências de genes dessas espécies, revelando que as macromoléculas das duas espécies eram tão semelhantes quanto aquelas de espécies crípticas de *Drosophila*. Como consequência, as múltiplas e evidentes diferenças morfológicas, anatômicas e comportamentais entre as duas espécies não deveriam estar relacionadas tanto às diferenças nas sequências de suas proteínas, mas à regulação dos genes que as codificam (King & Wilson, 1975). Desde então, diversos estudos têm demonstrado que a regulação da expressão de genes, principalmente via elementos de regulação em *cis*, parece ter um papel tão ou mais importante para a variação morfológica que as sequências de proteínas (Gompel *et al.*, 2005; Prud'homme *et al.*, 2007; Wray, 2007; Rebeiz *et al.*, 2009; Werner *et al.*, 2010; Takahashi & Takano-Shimizu, 2011; Gordon & Ruvinsky, 2012; Harrison *et al.*, 2012). Outro padrão consistente revelado por pesquisas nessa área é conhecido como homologia profunda ou parcimônia molecular, que se refere ao fato de que um conjunto restrito de genes homólogos é utilizado em processos de desenvolvimento semelhantes em linhagens separadas há muito tempo (Gilbert & Epel,

2009). Um exemplo ilustrativo desse padrão é o complexo de genes HOX, cuja expressão está relacionada à especificação do eixo anteroposterior em todo o reino animal (Carroll, 2005; Carroll, 2008; Gilbert & Epel, 2009).

Os trabalhos dessa área têm se caracterizado por um viés empírico, concentrado em questões específicas da genética do desenvolvimento, acumulando resultados que, gradativamente, começam a permitir que alguns padrões gerais sejam delineados (Carroll, 2008). Porém, apesar de a biologia evolutiva do desenvolvimento se concentrar no processo que determina como o fenótipo pode ser formado a partir do genótipo e reclamar por uma nova síntese na teoria evolutiva, seus resultados não foram ainda utilizados para descrever a geração de distribuições fenotípicas e, geralmente, não contemplam os efeitos da variação ambiental. A dificuldade de relacionar tais resultados com distribuições em populações decorre, provavelmente, do fato de que os processos descritos dentro dessa área ocorrem no nível do indivíduo, não no nível populacional, como fica evidente na crítica de autores da área da genética do desenvolvimento, segundo a qual a Síntese Moderna explica como ocorre a sobrevivência do mais apto, mas não o surgimento do mais apto¹⁰ (Gilbert & Epel, 2009). Nesse sentido, a principal contribuição da biologia evolutiva do desenvolvimento seria a investigação dos mecanismos de surgimento de novidades evolutivas, mas não a descrição de regras gerais de relação entre distribuições genotípicas e fenotípicas.

II) Plasticidade fenotípica

A influência do ambiente sobre a formação do fenótipo é simbolizada no conceito de plasticidade fenotípica e, gradualmente, através dele tem tido sua importância reconhecida para a teoria evolutiva. Plasticidade fenotípica é a capacidade de um genótipo

¹⁰ *survival of the fittest x arrival of the fittest*

produzir diferentes fenótipos como resposta à variação ambiental (Pigliucci, 2001). O significado dessa definição, porém, é variável: para alguns autores, plasticidade fenotípica refere-se somente às modificações permanentes causadas durante o desenvolvimento; para outros, seu significado pode ser amplo a ponto de incluir mudanças transitórias como alterações fisiológicas ou de comportamento (DeWitt & Scheiner, 2004).

Duas concepções sobre plasticidade fenotípica, relativamente independentes da amplitude do conceito, estão presentes na literatura (de Jong, 2005): segundo uma concepção, a plasticidade fenotípica é um processo de desenvolvimento que promove a evolução adaptativa; em outra, a plasticidade é um caráter quantitativo como qualquer outro e pode ser estudado através de normas de reação.

i. Plasticidade fenotípica como facilitadora da evolução

Girinos de *Rana sylvatica*, quando criados em tanques contendo larvas de libélulas do gênero *Anax* presas, atingem tamanho menor que girinos criados sem a presença desse predador. Além disso, as nadadeiras de sua cauda se aprofundam, conferindo uma maior velocidade ao nadar e virar, sendo que essa resposta é tão mais intensa quanto mais larvas de *Anax* estiverem no tanque. Quando soltas, larvas de *Anax* predam em maior frequência girinos maiores e com nadadeiras mais rasas (Van Buskirk & Relyea, 1998). Casos como esse, em que a função adaptativa da plasticidade fenotípica é tão evidente, parecem ser a motivação que leva diversos autores a elaborarem hipóteses em que esse mecanismo teria papel fundamental na evolução, atuando como um facilitador do processo adaptativo.

No começo do século XX, J.M. Baldwin propôs que características inicialmente adquiridas por plasticidade por alguns indivíduos poderiam se tornar fixas na população

como resultado da ação de seleção natural, que as substituiria por caracteres com base genética (Baldwin, 1896; Simpson, 1953; Crispo, 2007). Hipóteses semelhantes ao efeito Baldwin foram desenvolvidas posteriormente por C.H. Waddington (1942; 1953) e I.I. Schmalhausen (1949). Em comum com o fenômeno proposto por Baldwin, as hipóteses de ambos consideravam que o ambiente poderia gerar novos fenótipos e que a seleção natural poderia atuar de forma a substituir o fenótipo condicionado pelo ambiente por um fenótipo condicionado pelo genótipo (Crispo, 2007). As teorias dos dois autores consideravam que a seleção natural realizaria essa substituição através de alterações nos processos envolvidos no desenvolvimento. Waddington chamou esse processo de assimilação genética, enquanto Schmalhausen denominou autonomização. Além disso, ambos previram que a seleção atuaria sobre o desenvolvimento de forma a torná-lo menos susceptível aos efeitos ambientais, o que foi denominado por Waddington canalização, e por Schmalhausen seleção estabilizadora. (Schlichting & Pigliucci, 1998; Levit *et al.*, 2006). Waddington, porém, se destacou por defender uma posição favorável a uma reformulação da Síntese Moderna que considerasse os processos de desenvolvimento uma parte central do processo evolutivo (Crispo, 2007), afirmando que “uma teoria de evolução requer, como alguma parte dela, uma teoria de desenvolvimento”¹¹ (Waddington, 1975). Apesar de esse argumento ter sido acompanhado por resultados experimentais ilustrativos, as proposições de Waddington não produziram consequências profundas na teoria evolutiva, tendo sido relegadas ao lugar de fenômenos raros e pouco naturais (Schlichting & Pigliucci, 1998).

Hipóteses semelhantes voltaram a ser elaboradas recentemente, nas quais a plasticidade fenotípica atua como um mecanismo para o surgimento de novidades

¹¹ Texto original: *a theory of evolution requires, as some part of it, a theory of development*

evolutivas direcionadas pelo ambiente (Pigliucci & Murren, 2003; Pigliucci *et al.*, 2006; Lande 2009; Gilbert & Epel, 2009). Nesse sentido, West-Eberhard (2003) propôs uma síntese entre evolução e desenvolvimento na qual a plasticidade teria papel central, atuando como um mecanismo evolutivo tão essencial para a adaptação quanto a seleção natural (de Jong, 2005). Retomando alguns mecanismos já considerados por Baldwin, Waddington e Schmalhausen, West-Eberhard (2003) propõe que o ambiente teria um papel inicial tão importante como o de uma nova mutação para o surgimento de uma novidade evolutiva, seguido de um processo de acomodação genética – semelhante à assimilação genética de Waddington e à autonomização de Schmalhausen (West-Eberhard, 2003; Pigliucci *et al.*, 2006).

Entretanto, as hipóteses propostas nesse sentido e, especialmente, a de West-Eberhard (2003), partem do pressuposto de que a plasticidade fenotípica teria um papel predominantemente adaptativo (West-Eberhard, 2003; Gilbert & Epel, 2009), ainda que tal padrão não tenha sido demonstrado (DeWitt & Scheiner, 2004). Além disso, poucas demonstrações empíricas reforçam os mecanismos de acomodação/assimilação genética ou fenotípica, o que é evidenciado pelo fato de que um conjunto restrito de exemplos “anedóticos” como os experimentos de Waddington é repetidamente citado para reforçá-los (de Jong & Crozier, 2003; Gilbert & Epel, 2009; Gilbert, 2010). Assim, tais teorias podem ser resultado de uma concepção enviesada de plasticidade fenotípica baseada em casos em que a função adaptativa desta é, não só evidente, mas admirável a tal ponto que se acredita que esse é o padrão geral.

Por concentrarem seus esforços na explicação do surgimento de novidades evolutivas e não oferecerem uma descrição, em nível populacional, da relação entre

genótipo, ambiente e fenótipo, os trabalhos desenvolvidos seguindo a concepção de plasticidade fenotípica como um mecanismo evolutivo se assemelham à abordagem da biologia evolutiva do desenvolvimento. Nesse sentido, Gilbert & Epel (2009) buscaram fazer uma integração entre essa concepção e a perspectiva da biologia evolutiva do desenvolvimento, formando a área da ecologia evolutiva do desenvolvimento, ou *eco-devo* (de *ecological developmental biology*). As contribuições da *evo-devo* e da *eco-devo*, portanto, podem representar um caminho para a compreensão dos mecanismos que levam ao surgimento de novidades evolutivas, mas não apresentam ainda uma forma de integrar seus conhecimentos na estrutura da genética de populações, ficando restritos ao nível do indivíduo.

ii. Plasticidade fenotípica e normas de reação

Woltereck (1909) descreveu como diferentes estirpes puras de *Daphnia* desenvolviam diferentes valores de comprimento da cabeça em diferentes níveis de nutrientes. Para descrever tais mudanças, Woltereck representou a resposta de cada estirpe como uma curva contínua, que chamou de curva fenotípica. A totalidade das respostas de uma característica de uma estirpe a todas as variáveis ambientais possíveis, ou o modo como essa estirpe responde ao ambiente como um todo, foi chamado de norma de reação (Falk, 1999; Sarkar, 1999). Woltereck definiu genótipo e norma de reação como sinônimos, uma equivalência que foi parcialmente reconhecida por Johanssen (1911; ver Sarkar, 1999). Atualmente, porém, norma de reação é definida como a função que descreve a curva de resposta fenotípica de um genótipo a uma variável ambiental, em geral contínua (Pigliucci, 2005; Chevin *et al.*, 2010), sendo portanto equivalente à curva fenotípica definida por Woltereck (Fig. 1A).

Diversos trabalhos adotam, mais ou menos explicitamente, a concepção de plasticidade fenotípica como uma característica quantitativa comum, o que permite que se estude a plasticidade tanto por uma abordagem experimental (Dobzhansky and Spassky, 1944; Gupta and Lewontin, 1982; Coyne and Beecham, 1987; Thomas and Barker, 1993; Bitner-Mathé *et al.*, 1995; Noach *et al.*, 1997; Bitner-Mathé & Klaczko, 1999; Stinchcombe *et al.*, 2004; Stillwell and Fox, 2005; Davis *et al.*, 2005; Gutteling *et al.*, 2007; Ragland and Kingsolver, 2007; Diamond and Kingsolver, 2010), quanto pelo uso de modelos elaborados segundo esse conceito (de Jong, 1990; Gravilets and Scheiner 1993; Scheiner, 1993; Kingsolver *et al.*, 2001; Kingsolver *et al.*, 2004; Izem and Kingsolver, 2005; de Jong, 2005; Chevin and Lande, 2009; Lande, 2009; Chevin *et al.*, 2010; King & Roff 2010).

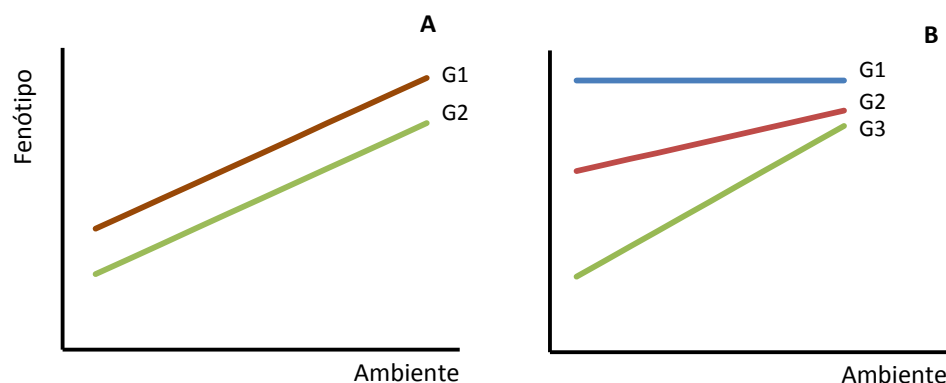


Figura 1. **A:** Normas de reação de dois genótipos, G1 e G2, com diferentes elevações e mesmo grau de plasticidade (inclinação). **B:** Normas de reação de três genótipos com diferentes graus de plasticidade fenotípica à mesma variação ambiental.

Plasticidade fenotípica pode ser entendida, segundo essa concepção, como uma propriedade das normas de reação (Pérez and Garcia, 2002; Elberse *et al.*, 2004; Hassall *et al.*, 2005; Liefting & Ellers, 2008; Liefting *et al.*, 2009). Para tornar essa interpretação possível, em geral o conceito de plasticidade fenotípica é limitado às alterações permanentes causadas pelo ambiente durante o desenvolvimento (e.g. tempo de desenvolvimento, tamanho etc.). Dessa forma, cada genótipo pode ter sua plasticidade

fenotípica avaliada através de sua norma de reação: se um genótipo não apresenta plasticidade fenotípica em resposta a uma determinada variável ambiental, sua norma de reação será paralela ao eixo de variação ambiental, representando um fenótipo fixo independente do ambiente; caso contrário, *i.e.*, havendo qualquer curvatura ou inclinação da norma de reação, o genótipo apresenta alguma plasticidade fenotípica em resposta à variação ambiental (Fig. 1B).

Normas de reação e análise de variância

Uma das primeiras representações gráficas de normas de reação foi apresentada por Krafka (1920), que observou o número de facetas nos olhos de indivíduos de três estirpes de *Drosophila melanogaster* (*bar*, *low-bar* e *ultra-bar*) criados em sete temperaturas diferentes. Na mesma época, Fisher & Mackenzie (1923) analisaram a produção de diferentes variedades de batata cultivadas com diferentes adubos, utilizando a análise de variância desenvolvida por Fisher para determinar que proporção da variação fenotípica era causada por cada variável. L. Hogben, um pesquisador que se formou dentro da tradição da biologia do desenvolvimento (Tabery, 2008) percebeu que o trabalho de Krafka (1920) e a análise de variância adotada por Fisher tratavam do mesmo problema: a variação da resposta fenotípica de diferentes genótipos a diferentes ambientes. Hogben utilizou as normas de reação de Krafka (1920) como um exemplo para argumentar que a complexidade das normas de reação tornava a interpretação dos resultados da análise de variância muito mais complexa do que o somatório de proporções da variância sugerido por Fisher (Tabery, 2008). Em resposta, Fisher argumentou que seu método fora criado para lidar com interações lineares entre ambiente e herança e, por isso, não capturava a complexidade da variação observada por Hogben.

Após essa controvérsia (ver Tabery, 2008), entretanto, resultados de normas de reação e de análises de variância só voltaram a ser contrastados com tanta clareza no trabalho de Gupta e Lewontin (1982). Com esse trabalho, Gupta & Lewontin (1982) tentaram demonstrar, a partir de resultados experimentais, o argumento defendido por Lewontin (1974b). Tal argumento, remontando àquele utilizado por Hogben, apontava que a análise de variância seria um método insuficiente para descrever a complexidade da interação entre genótipo e ambiente na formação da variação fenotípica que, por sua vez, seria mais bem descrita pelas normas de reação (Lewontin, 1974b; Gupta & Lewontin, 1982). Para ser possível prever o resultado da atuação da seleção natural sobre uma população, seria necessário conhecer “as normas de reação, a distribuição atual de ambientes, a distribuição atual de genótipos” e “que ambientes e que genótipos devem ser fixados ou eliminados”¹² (Gupta & Lewontin, 1982).

As normas de reação descrevem, portanto, uma parte importante das regras de transformação que se encontram na lacuna entre espaço genotípico e fenotípico descrita em Lewontin (1974a). Idealmente, as normas de reação poderiam ser utilizadas para inferir a distribuição fenotípica esperada a partir de um conjunto de genótipos desenvolvendo-se em diferentes ambientes (leis de transformação T_1). No sentido contrário, uma vez que se conheçam as distribuições de fenótipos e de ambientes nos quais estes se desenvolveram, seria possível inferir a distribuição genotípica subjacente (leis de transformação T_3), dado que as regras de variação das normas de reação sejam conhecidas. Consequentemente, duas

¹² Texto original: *Evidence is also presented that without knowing the norms of reaction, the present distribution of environments, the present distribution of genotypes, and without then specifying which environments and which genotypes are to be fixed or eliminated, it is impossible to predict (...) what the outcome of natural selection would be.*”

questões importantes para a compreensão dessas leis de transformação são: como são as normas de reação e como elas variam?

Após o trabalho de Krafka (1920), a plasticidade fenotípica, entendida como variável quantitativa, ainda que fosse eventualmente citada por autores da Síntese Moderna como Mayr (1963) e Dobzhansky (1951) como um fator importante para a evolução, ficou relativamente esquecida até as últimas décadas do século XX (Stearns, 1989; Pigliucci, 2001). A partir da década de 80, entretanto, um número crescente de trabalhos experimentais, revisões e modelos sobre plasticidade fenotípica e normas de reação foram produzidos (ver Pigliucci, 2001). Em grande medida, as principais questões dessa área foram colocadas por esse conjunto de trabalhos.

Base genética da plasticidade fenotípica e seleção natural

Bradshaw (1965) realizou uma ampla revisão do estado do conhecimento sobre a evolução da plasticidade fenotípica em plantas. Para analisar a questão da base genética da plasticidade, o autor partiu do pressuposto de que a plasticidade seria determinada pelo caminho básico de desenvolvimento do caráter que a apresenta. Admitindo que tal pressuposto fosse real, Bradshaw (1965) concluiu que a plasticidade não poderia evoluir rapidamente e que os mesmos órgãos deveriam mostrar o mesmo grau de plasticidade em diferentes espécies. Por considerar exemplos que indicavam a falsidade dessas duas conclusões, Bradshaw (1965) concluiu que “a plasticidade de um caráter é uma propriedade independente desse caráter e está sob seu próprio controle genético específico”¹³. Os exemplos utilizados para sustentar sua conclusão, entretanto, se referiam a um conceito amplo de plasticidade fenotípica em plantas, incluindo até a diferenciação de folhas em

¹³ Texto original: *the plasticity of a character is an independent property of that character and is under its own specific genetic control.*

plantas aquáticas, em que os diferentes fenótipos são apresentados dentro de um mesmo indivíduo. Ainda assim, a afirmação de Bradshaw (1965) foi generalizada a tal ponto que estabeleceu, para boa parte dos trabalhos produzidos posteriormente à sua revisão, uma proposição que foi tomada como verdadeira ou como uma das questões fundamentais sobre a evolução da plasticidade fenotípica (Via & Lande, 1985; Gomulkiewicz & Kirkpatrick, 1992; Via *et al.*, 1995; Noach *et al.*, 1997; Van Tienderen, 1997; Pigliucci, 2005; Ghalambor *et al.*, 2007).

Otimização

No estudo de normas de reação e de plasticidade fenotípica, a plasticidade é frequentemente compreendida como uma estratégia adaptativa que possibilita superar a variação ambiental. Nesse contexto, um parâmetro essencial para a evolução das normas de reação é a norma de reação perfeita ou ideal, que se refere a um genótipo hipotético capaz de produzir o fenótipo ótimo em todos os ambientes (e.g. Khan & Bradshaw, 1976; DeWitt & Scheiner, 2004; de Jong, 2005). Tal conceito está relacionado, mais ou menos explicitamente, aos mesmos pressupostos que deram origem a modelos que seguem a teoria da otimização (Maynard Smith, 1978; Parker & Maynard Smith, 1990), que prevêem que a seleção natural tenderá a maximizar o valor adaptativo para cada caráter de uma população até que esta atinja o equilíbrio (Lande, 1982).

Poucos trabalhos, porém, fazem menção direta à teoria da otimização (Gomulkiewicz & Kirkpatrick, 1992; Delpuech *et al.*, 1995), que fornece os princípios e métodos da elaboração de modelos de otimização em evolução (Maynard Smith, 1978; Parker & Maynard Smith, 1990), evidenciando a prevalência de uma suposição difusa de uma tendência à otimização, mais do que a aceitação formal e explícita de um pressuposto

nesse sentido. A maioria desses trabalhos pondera que pode haver limites que impeçam a população de alcançar a norma de reação ótima (Kawecki & Stearns, 1993; Coquillard *et al.*, 2012), mas ignora um dos passos essenciais da elaboração de um modelo de otimização, que é o estabelecimento de um conjunto definido de fenótipos passíveis de serem atingidos (Maynard Smith, 1982). Como consequência, se estabeleceu no estudo das normas de reação a expectativa segundo a qual elas devem sempre atingir um ótimo e, caso não o façam, tal fato deve-se a alguma situação incomum (Gomulkiewicz & Kirkpatrick, 1992; Delpuech *et al.*, 1995).

Uma questão importante a considerar, nesse ponto, é a limitação da variação das normas de reação. Ao tratar da crítica ao programa adaptacionista feita por Gould & Lewontin (1979), Maynard Smith (1982) reconhece que as restrições de desenvolvimento podem ter papel mais importante que a otimização do fenótipo, mas condiciona tal papel ao conjunto de fenótipos possíveis de serem atingidos. Para ilustrar esse argumento, o autor contrasta dois cenários a partir dos quais a evolução da forma da asa de pássaros poderia ocorrer: num, somente duas formas de asas seriam possíveis (retangular ou triangular) e no outro, qualquer forma poderia ser desenvolvida. Maynard Smith (1982) argumenta que, no primeiro caso, as restrições impostas pelo desenvolvimento teriam papel mais relevante, enquanto no segundo a explicação se daria em termos de seleção natural, *i.e.*, de otimização do fenótipo (Maynard Smith, 1982). Assim, saber qual é o conjunto de formas que as normas de reação podem alcançar é fundamental para compreender se sua evolução é determinada pela otimização por seleção natural ou por restrições herdadas filogeneticamente impostas pelo desenvolvimento.

Linearidade e imprevisibilidade

Grande parte dos modelos de norma de reação, além de apresentarem uma expectativa de otimização, fazem uso de um pressuposto simplificador, admitindo que as normas de reação podem ser descritas por funções lineares. Ainda que, em alguns casos, essa simplificação não signifique descartar formas mais complexas de resposta, o resultado prático desse pressuposto foi estabelecer, no campo do estudo da plasticidade e das normas de reação, um modelo linear de norma de reação que é geralmente bem aceito como uma descrição da realidade. Tal modelo, além de sua simplicidade, permite a interpretação direta de seus parâmetros, atribuindo ao coeficiente angular da norma de reação uma medida direta da plasticidade fenotípica (de Jong 1990; Scheiner, 1993; Pigliucci and Murren, 2003; de Jong, 2005; Pigliucci 2005; Pigliucci *et al.*, 2006; Zhang, 2006; Ghalambor *et al.*, 2007; Nussey *et al.* 2007; Aubin-Horth and Penn, 2009; Chevin and Lande, 2009; Lande 2009; King and Roff 2010; Chevin *et al.*, 2010).

Curiosamente, os resultados de Gupta & Lewontin (1982), além de evidenciarem a necessidade de se compreender a variação das normas de reação, deixaram poucas esperanças de que tal tarefa fosse possível. A razão desse impacto se encontra no fato de que as normas de reação que os autores descreveram apresentavam tantos cruzamentos entre si que aparentemente nenhum modelo poderia ser ajustado a cada curva, em oposição ao pressuposto da linearidade. A conjectura que resultou da interpretação desses dados, segundo a qual seria impossível descrever as normas de reação e sua variação, seria futuramente utilizada pelos adeptos de uma visão da plasticidade fenotípica como mecanismo evolutivo, no sentido de argumentar que é impossível prever a variação fenotípica em um ambiente a partir dos resultados de outro (Gottlieb, 2003; 2007).

Conjecturas e hipóteses sobre a evolução da plasticidade fenotípica

Os trabalhos que foram produzidos na segunda metade do século XX sobre normas de reação, plasticidade fenotípica e interação genótipo-ambiente foram fundamentados e deram origem a um conjunto de conjecturas sobre a base genética, evolução, forma e variação das normas de reação, algumas das quais contraditórias entre si. Essas conjecturas, entretanto, deram origem a diversos trabalhos que não colocaram em questão suas proposições, aceitando-as como verdades razoavelmente bem estabelecidas. Resumidamente, tais conjecturas podem ser caracterizadas na forma das seguintes afirmações:

- 1- A plasticidade fenotípica tem determinação genética própria e independente do caráter em si e, portanto, pode evoluir por seleção natural;
- 2- A seleção natural tende a fazer com que a norma de reação atinja um ótimo, produzindo em cada ambiente o fenótipo de maior valor adaptativo;
- 3- Normas de reação são linhas retas, cujo coeficiente angular mede o grau de plasticidade fenotípica de cada genótipo;
- 4- Normas de reação variam de forma quase aleatória, de tal forma que é impossível prever a posição relativa de diferentes genótipos quando o ambiente muda.

***Drosophila mediopunctata* como organismo modelo**

O grupo *tripunctata* é o maior grupo do gênero *Drosophila* que habita florestas Neotropicais (Klaczko, 2006). Dentre as espécies desse grupo, *Drosophila mediopunctata* tem sido, há mais de 20 anos, objeto de um esforço consistente de investigação buscando

transformar essa espécie num organismo modelo para estudos de genética evolutiva (ver Klaczko, 2006).

Várias espécies do grupo *tripunctata* apresentam um padrão conspícuo de pigmentação, formado por três pintas escuras na região mediana dos três últimos tergitos do abdômen (Frota-Pessoa, 1954). Em *D. mediopunctata* esse padrão é polimórfico, com variação fenotípica que inclui indivíduos sem pintas até indivíduos com três pintas (Fig. 2). O tamanho, a intensidade de pigmentação e a forma das pintas também variam, mas a variação em número (de 0 a 3) é facilmente distinguível, com uma correlação entre contagens de observadores diferentes de 98% ($r = 0,98$; $p < 0,001$).

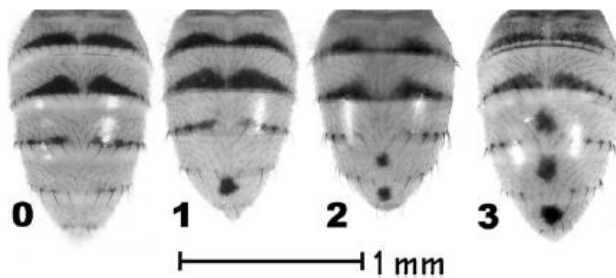


Figura 2. Polimorfismo de pigmentação abdominal em *Drosophila mediopunctata* (Hatadani, 2002).

D. mediopunctata tem cinco pares de cromossomos acrocêntricos e um par de cromossomos pontuais, sendo que o cromossomo II é o que apresenta maior polimorfismo de inversões (Ananina, 2002). Há um alto desequilíbrio de ligação entre inversões distais e proximais desse cromossomo (Peixoto & Klaczko, 1991); já se observou que os haplótipos DA-PA0 e DS-PC0/DP-PC0 apresentam padrões de variação sazonal e microgeográfico que sugerem que o haplótipo DA-PA0 está mais adaptado a temperaturas mais baixas e DS-PC0/DP-PC0 a temperaturas mais altas (Ananina *et al.*, 2004; Klaczko, 2006). Hatadani *et al.* (2004) verificaram que as inversões PA0 e PC0 afetam significativamente a variação do

número de pintas nos tergitos abdominais de *D. mediopunctata*, com interação significativa com a temperatura. Os autores demonstraram, além disso, que o efeito das inversões se deu através de uma associação não aleatória entre inversão e fenótipo, em que PA0 está associada a um menor número de pintas e PC0 a um maior número de pintas (Hatadani *et al.*, 2004).

OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO DA TESE

O objetivo desse trabalho foi testar um conjunto de conjecturas amplamente aceitas em estudos sobre a plasticidade fenotípica e normas de reação, tendo *Drosophila mediopunctata* como organismo modelo e utilizando um desenho experimental que possibilitou a descrição detalhada e análise compreensiva de um conjunto de normas de reação de diferentes caracteres à temperatura. Mais especificamente, buscou-se:

1. Testar a independência entre a base genética da plasticidade fenotípica e o valor médio de um caráter, utilizando as normas de reação à temperatura do número de pintas nos tergitos abdominais de *Drosophila mediopunctata*.
2. Através da análise de 40 normas de reação à temperatura de cinco caracteres de *D. mediopunctata* e da análise de outros trabalhos disponíveis na bibliografia, analisar:
 - a. Se as normas de reação são tipicamente lineares ou não lineares;
 - b. Se a simplificação linear pode levar à visão segundo a qual é impossível compreender as normas de reação;
 - c. O que pode ser perdido pelo uso de um modelo linear de normas de reação que um modelo não linear pode revelar.

Esta tese está organizada em duas partes, sendo cada uma composta por um artigo com resultados obtidos durante o trabalho aqui descrito e um apêndice. A primeira parte contém um artigo publicado em 2009 no periódico *Evolution* e um apêndice onde são apresentados os resultados de um experimento no qual se buscou testar o padrão descrito neste artigo. A segunda parte contém um artigo publicado em 2012 no mesmo periódico e o material suplementar que está disponível *online* no *site* da revista. Ao final da tese, são apresentadas as conclusões gerais do trabalho e perspectivas para futuras investigações.

1. BASE GENÉTICA DA PLASTICIDADE FENOTÍPICA

THE REACTION NORM FOR ABDOMINAL PIGMENTATION AND ITS CURVE IN *DROSOPHILA MEDIOPUNCTATA* DEPEND ON THE MEAN PHENOTYPIC VALUE

Felipe Rocha,¹ Hermes F. Medeiros,¹ and Louis Bernard Klaczko^{1,2}

¹*Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Cx. Postal 6109, Campinas, 13083-970 SP, Brasil*

²*E-mail: lbk@unicamp.br*

Received May 26, 2008

Accepted July 31, 2008

The idea of a general independence between the phenotypic plasticity and the mean value of a trait is, presently, a consensus. Here, we use the reaction norm of abdominal pigmentation (number of dark spots) of *Drosophila mediopunctata* in response to temperature, to test this idea. We raised eight strains, bearing two different chromosomal inversions and with varying mean phenotypic values, under 11 temperatures in a thermal gradient to test for predictions concerning mean phenotypic values, chromosomal inversions, and reaction norms. Our results revealed a strong effect of different phenotypic groups and no effect of different karyotypes on reaction norms. Moreover, we found a significant negative correlation between mean phenotypic value and the curvature of the reaction norms, revealing a high dependency of the reaction norm shape on mean phenotypic value. These results clearly reject the idea of genetic independence between mean value and phenotypic plasticity, and may indicate a pattern of correlation, which may include results from other traits and species, with an importance that has not been fully appreciated.

KEY WORDS: Genetic biodiversity, phenotypic plasticity, polychromatism, pleiotropy, thermal adaptation.

After a decade of debate surrounding the genetic basis of phenotypic plasticity and its (in) dependency on trait mean value (for a review see: Via et al. 1995), controversy gave place to a pervasive consensus on the independence of a trait's plasticity and its mean value, in spite of a few exceptions based on plant species (Kliebenstein et al. 2002; Elberse et al. 2004; Stinchcombe et al. 2004). "A fairly general conclusion is that, for a given trait, mean value and plasticity are genetically independent" (David et al. 2005); or, if they are not independent, at least "it is most convenient to think of the mean trait value and its reaction norm as separate traits" (Ghalambor et al. 2007; but see Pigliucci 2005).

Drosophila mediopunctata belongs to the *tripunctata* group, the second largest Neotropical group of *Drosophila*, and bears the

characteristic pigmentation pattern of the group: overall yellowish pigmentation and a distinct pigmentation on the abdomen, with three dark spots on the last tergites. Whereas in some species of the group this pattern is fixed, specimens of *D. mediopunctata* show high phenotypic variation, from individuals without spots to individuals with one, two, or three spots, on the sixth, fifth, and fourth abdominal tergites. Furthermore, these spots also vary in size and shape; and males tend to have more spots than females (Frota-Pessoa 1954). This character shows high phenotypic plasticity, with individuals developing a higher number of spots in lower temperatures. Accordingly, higher frequencies of flies with more spots are found among wild flies collected when temperatures are lower. Yet, it seems that the genetic factors determining the variation of this trait show the opposite trend. Animals raised in

the laboratory descending from flies collected in the cold months have a higher number of spots than those descending from animals collected in warmer months (for details see: Hatadani et al. 2004; Klaczko 2006).

Dobzhansky (1970) believed that chromosome inversions could accumulate coadapted gene complexes within them, behaving as supergenes, due to the lack of recombination between genes within different inversions (Kennington et al. 2007). Moreover, several traits have already been reported to be associated with chromosomal inversions in *Drosophila* (Hoffman et al. 2004). In *D. mediopunctata*, two inversions of the second chromosome (*PA0* and *PC0*) show altitudinal clines and seasonal cycles in a natural population. The frequency of *PA0* is negatively correlated with the temperature of the collecting month and positively correlated with the altitude of the collecting point, whereas the opposite is seen for *PC0*—suggesting that they are more adapted to lower and higher temperatures, respectively (Ananina et al. 2004; Klaczko 2006; Hatadani and Klaczko 2008).

Hatadani et al. (2004) showed that an important part of the variation in the number of spots is genetically based, mapping mainly to the second chromosome. They also demonstrated that the second chromosome inversions *PA0* and *PC0* are nonrandomly associated with the mean number of spots. Interestingly, *PA0* is associated with phenotypes with fewer abdominal spots, and *PC0* is associated with phenotypes with more abdominal spots. This pattern of association is consistent with the changes in the genetic component determining the variation on the number spots. The frequency of *PC0* and the genetic determinants for high number of spots increases with high temperatures. Moreover, Hatadani et al. (2004) found a significant interaction between karyotype and temperature on the mean number of spots of *D. mediopunctata*. This led us to suggest that “the gene complexes within each karyotype had different reaction norms related to temperature” as a consequence of coadaptation to temperature variation (Hatadani et al. 2004; Klaczko 2006).

Thus, with regard to the phenotypic plasticity of the number of abdominal spots of *D. mediopunctata*, we may conceive three different scenarios, taking into account the mean phenotypic values, second chromosome inversions, and reaction norms:

- (1) Independence—The reaction norm and the mean value of the character are not related, indicating a different genetic basis for each trait, or total independence between phenotypic plasticity and mean value;
- (2) Inversion coadaptation—A possible correlation may be found between the mean value and the reaction norm as the outcome (or side-effect) of coadaptation; genes controlling the reaction norm are associated with the chromosome inversions, which are, in turn, associated with the character mean value;

- (3) Pleiotropy/linkage—There is an association between mean value and reaction norm, due to the pleiotropic effects of the genes determining the character or to genes very closely linked to them, independently of the chromosome inversion.

Here, we use the reaction norms in response to temperature of the number of abdominal spots of eight strains of *D. mediopunctata* to test these three scenarios: four homozygous for inversion *PA0* and four homozygous for *PC0*; with varying numbers of spots. We assess how reaction norms were influenced by mean phenotypic value and chromosome inversion. Furthermore, we analyze how these two variables can influence the shapes of the reaction norms; and whether there is any correlation between mean value and the critical parameter of the equation defining the reaction norm.

Materials and Methods

STRAINS

To test for the effect of second chromosome inversions and mean phenotypic value on reaction norm shape, we used a sample of the strains of *D. mediopunctata* produced by Hatadani et al. (2004). Using isofemale lines obtained from collections from the field to provide different second chromosomes, these authors produced nine strains homozygous for different *PA0* inversions and nine for different *PC0* inversions, which shared the same genetic background (Hatadani et al. 2004).

Because *PA0* is associated with phenotypes with less spots and *PC0* with phenotypes with more spots, a random sample of strains may reflect this strong association, leading to a statistical confounding between karyotype and mean phenotypic value effects. To reduce this undesired outcome, eight strains were chosen under a stratified sampling design, to minimize the nonrandom association between inversions and number of abdominal spots, satisfying two conditions: four strains homozygous for each karyotype; and four strains with a small number of spots and four with a large number of spots. Within each karyotype group, strains were chosen intending to cover as well as possible the total range of variation in each karyotype group (avoiding the occurrence of only strains with large numbers of spots in *PC0* and only strains with few spots in the *PA0* group), based on the data of Hatadani et al. (2004). The strains resulted in the formation of two phenotypic groups, as follows (same names as shown in Hatadani et al. 2004):

Light group (original mean number of spots: 1.32): **I** (mean: 1.01; karyotype: *PA0*); **D** (1.18; *PA0*); **T** (1.48; *PC0*) and **H** (1.62; *PA0*).

Dark group (original mean number of spots: 2.85): **Z** (mean: 2.70; karyotype: *PC0*); **O** (2.71; *PC0*); **G** (2.98; *PA0*) and **X** (3.00; *PC0*).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

First instar larvae were collected from each strain and groups of 15 larvae were transferred to vials with 5-mL culture medium (16% yeast, 2% sugar and 2.5% agar). Eleven vials from each strain were kept under a thermal gradient (modified from Fogleman 1978) varying between 14°C and 24°C, with 1°C increments. Three replicate experiments were carried out simultaneously (eight strains \times 11 temperatures \times 3 replicates = total of 264 vials). Temperature, as well as larval development, was daily recorded. Imagoes were transferred daily to a new vial after the first emergence of each vial. The number of spots was counted on flies that were at least three-day old, by which time color intensity stabilizes.

STATISTICAL ANALYSIS

The numbers of abdominal spots of 1134 flies (554 males and 580 females) were scored, ranging from zero to three spots, and data were submitted to analysis of covariance (ANCOVA), testing the effects of temperature (covariate) and sex. Because second chromosome karyotype (levels: *PAO* and *PCO*) and phenotypic group (levels: *light* and *dark*) could not be treated as crossed factors, due to insufficient degrees of freedom (caused by the absence of strains with equal mean phenotypes in each karyotype) two ANCOVAs were carried separately. One ANCOVA tested the effect of the second chromosome karyotype and the other the effect of the phenotypic group. In each case, the strain was nested by the grouping factor tested (karyotype or phenotypic class). Both ANCOVAs were carried out using the mean values of each strain in each temperature, instead of the individual values, calculated as the mean number of spots per individual for each sex in each vial (three vials for each strain). This procedure assures that the distribution of means approaches normality as sample size increases, even if original data are not normally distributed (Zar 1999).

To describe the reaction norm of each strain, we chose to use polynomial regression to adjust the best-fit equation to each strain response curve. To decide on the order of the polynomial, we used a "forward selection" procedure recommended by Zar (1999), which consists of proceeding from a small to a large model to describe data variation. This method allows determining the maximum power of the polynomial that has statistical significance. First, a linear model ($NS = a + bT$; where NS is the number of spots and T is the temperature) was fitted to the mean number of spots per individual in each temperature for each strain. Then, a quadratic model ($NS = a + bT + cT^2$) was fitted to the same data. The significance of c values in each quadratic equation was tested by calculating F (with numerator degrees of freedom of 1 and a denominator degrees of freedom equal to the residual degrees of freedom of the higher-degree model), as

$$F = \frac{(\text{regression SS for quadratic model}) - (\text{regression SS for linear model})}{\text{residual MS for quadratic model}}$$

If the c value was significantly different from zero, then we considered the quadratic model the best description of the dependence of the number of spots on temperature. If c was not significantly different from zero, the linear regression model was considered the best descriptor. Given that for all but one strain (which had $R^2 = 0.68$), the R^2 value was higher than 0.9, we did not use a third-order polynomial, to enable the comparison between all reaction norms described.

We also carried out a separate analysis on the effect of karyotype and phenotypic group on reaction norms, using the same forward selection procedure applied to strains for karyotype and phenotypic group, testing simple linear equations first, followed by quadratic regression and testing c values significance.

To test whether the shape of the reaction norm curve was associated with the mean value, we estimated the simple correlation between c and mean phenotypic values over all temperatures for each strain. The nominal c values of the quadratic equation were used even in the two cases in which it was not significantly different from zero (the qualitative results are not affected if we instead use zero).

Results

RATIONALE

Each of the scenarios makes different predictions that can be tested sequentially: (1) *Independence*: (a) No effect is expected in the ANCOVAs for karyotype or phenotypic group, because both are indirectly correlated with the mean value; (b) the reaction norms should be the same irrespective of karyotype or phenotypic group; and (c) no correlation is expected between the mean value and the shape of the reaction norm. (2) *Inversion co-adaptation*: there should be an effect for karyotype or some significant interaction involving karyotype in the ANCOVA; and the reaction norms of the two karyotypes should be different. (3) *Pleiotropy/linkage*: (a) There should be an effect of phenotypic group or some interaction involving phenotypic group in the respective ANCOVA; (b) the reaction norms between the two phenotypic groups should be different; and (c) some correlation between the mean phenotypic value and the c parameter of the reaction norm curve is expected.

KARYOTYPE AND PHENOTYPIC GROUP EFFECTS

The first ANCOVA (Table 1 top) shows the results relative to karyotype. Although there is a highly significant effect of temperature and strain, no significant effect was found for karyotype. Similarly, a graphical analysis of curves grouped by karyotype does

Table 1. Results of the ANCOVA applied to the mean number of spots per fly for each sex in each vial to assess the effects of karyotype (top), phenotypic group (bottom), temperature, sex, strain, (nested by karyotype or phenotypic group) and interactions. Values in bold are significant at the 5% level.

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-ratio	P-value
Temperature (T)	101.556	1	101.556	607.914	<0.001
Sex (S)	0.050	1	0.050	0.297	0.586
Karyotype (K)	0.121	1	0.121	0.725	0.395
Strain (karyotype)	66.893	6	11.149	66.737	<0.001
S × T	0.009	1	0.009	0.052	0.819
K × T	0.093	1	0.093	0.559	0.455
K × S	0.020	1	0.020	0.121	0.728
K × T × S	0.007	1	0.007	0.043	0.836
Error	64.484	386	0.167		
Temperature (T)	102.149	1	102.149	619.647	<0.001
Sex (S)	0.057	1	0.057	0.347	0.556
Phenotypic group (P)	2.811	1	2.811	17.054	<0.001
Strain (phenotypic group)	13.181	6	2.197	13.326	<0.001
S × T	0.007	1	0.007	0.042	0.839
P × T	0.123	1	0.123	0.746	0.388
P × S	0.940	1	0.940	5.703	0.017
P × S × T	0.873	1	0.873	5.293	0.022
Error	63.632	386	0.165		

not reveal any difference between inversions *PA0* and *PC0*, their respective curves overlap (Fig. 1A).

In contrast, when analyzing the phenotypic groups, the set of curves grouped by phenotype (Fig. 1B) clearly shows two distinct groups of curves that show high within-group overlapping, but which do not overlap one with the other. This result is also reflected in the second ANCOVA (Table 1 bottom), which revealed a highly significant effect of phenotypic groups and a significant three-way interaction between phenotypic group, sex, and temperature, besides the effects of temperature and strain.

Hence, all strains exhibited noticeable phenotypic responses to temperature, which were strongly influenced by phenotypic groups, but not by karyotype, revealed by both ANCOVAs and in the graphics. There was reaction norm variation among strains, with a clear division between two groups of response curves, according to mean phenotype, with high overlapping within but not between groups (Fig. 1B). This contrasts with the overlap between karyotype groups (Fig. 1A).

REACTION NORM SHAPE

Through the forward selection procedure used to establish the best polynomial description to reaction norms, we obtained six reaction norms with significant *c* values (strains **D**, **G**, **H**, **I**, **X**, and **Z**) and two reaction norms with nonsignificant *c* values (strains **O** and **T**) (Table 2).

The next step of the reaction norm analysis, which analyzed the effect of karyotype and phenotypic groups following the same

procedure as described for strains, revealed an interesting contrast between these factors on reaction norm shape. Both *PA0* and *PC0* inversions had linear mean reaction norms, and there were no differences between both *b* and *a* parameters of these groups (Table 2 and Fig. 1C). In contrast, *dark* and *light* phenotypic groups had significant quadratic reaction norms. Moreover, *c* parameters estimated for these groups were significantly different and had opposite values: the *light* phenotypic group had a positive *c* value (concave upward), and *dark* phenotypic group had a negative *c* value (concave downward) (Table 2 and Fig. 1D). Thus, although different karyotypes had the same reaction norm shape and parameters, different phenotypic groups had different and contrasting reaction norms, both with a parabola form, but with inverted curvatures. That is, the main difference between the reaction norms of the two phenotypic groups tested was observed on the parabola curvature, determined by parameter *c* of the quadratic equation. Thus, a more detailed picture of this effect was revealed by estimating the simple correlation between *c* values and mean phenotypic value for each strain, which showed a significant negative value ($r = -0.93$; $P < 0.001$) (Fig. 2).

Discussion

TEMPERATURE EFFECT

The effect of temperature was highly significant, with the same overall phenotypic response observed in all strains: higher temperatures produced lighter flies (i.e., smaller number of spots).

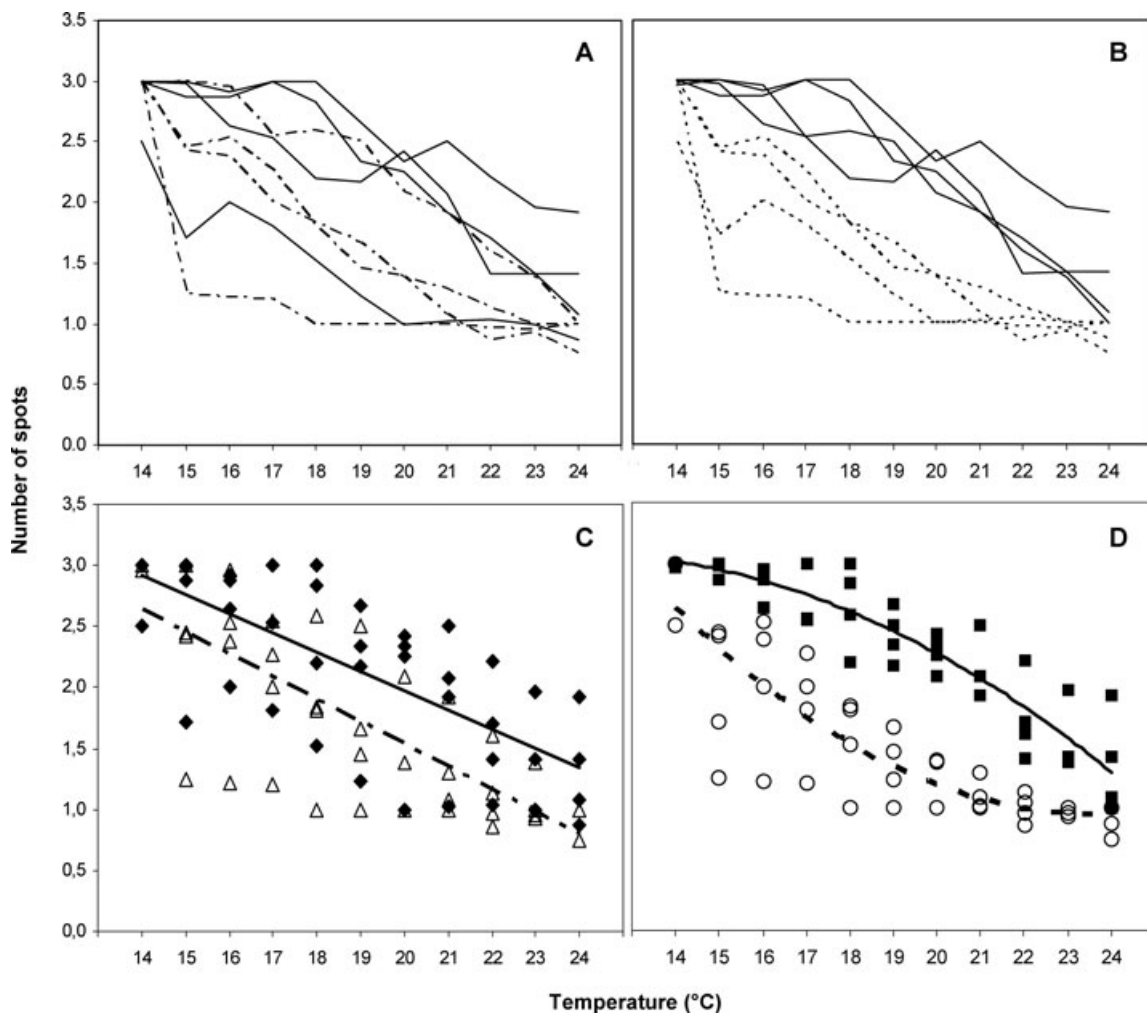


Figure 1. Reaction norms of the mean number of spots in response to temperature in *D. mediopunctata*: (A) grouped by karyotype—solid lines: *PC0*; dashed lines: *PA0*; (B) grouped by phenotypic group—solid lines, *dark phenotype*; dashed lines, *light phenotype*; (C) grouped by karyotype—linear polynomials: filled diamonds and solid line, *PC0*; empty triangles and dashed line, *PA0*; (D) grouped by phenotypic group—quadratic polynomials: filled squares and solid line, *dark phenotype*; empty circles and dashed line, *light phenotype*.

The same pattern was observed for other *Drosophila* species (Das et al. 1994; Gibert et al. 1996, 1999, 2004, 2007; Pétavy et al. 2002), as well as for other insect orders (Davis et al. 2005; Bernardo et al. 2007). The increase in dark pigmentation at lower temperatures is often interpreted as an adaptive response to colder environments (Gibert et al. 1999; Davis et al. 2005).

MEAN PHENOTYPIC VALUE, SECOND CHROMOSOME INVERSION AND REACTION NORM

Our aim with this study was to investigate whether the karyotype or the mean phenotypic value were related to the reaction norm shape, uncoupling their effects, taking into account the nonrandom association between pigmentation and chromosome inversions *PA0* and *PC0* (Hatadani et al. 2004).

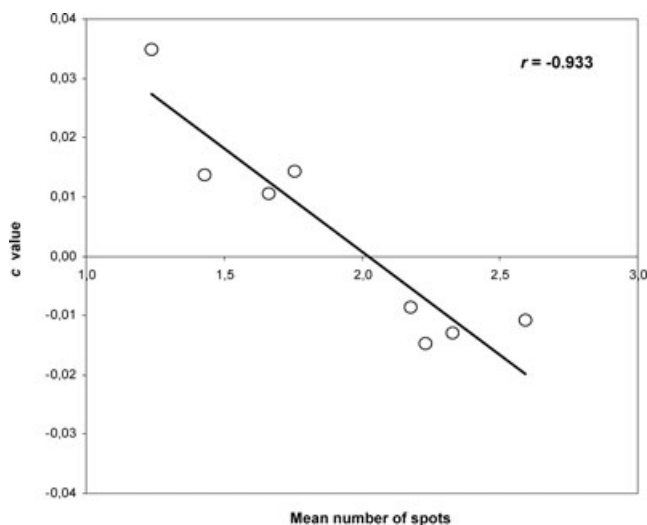
Taking into account the predictions of the three scenarios that we conceived, we can discard scenario (1) the phenotypic group effect and its interaction with temperature and with sex were sta-

tistically significant; and the two phenotypic groups showed opposite reaction norms (one, a concave upward parabola; the other, a concave downward parabola), revealing a clear association between reaction norm and phenotypic group differences. Moreover, there was a significant negative correlation between the mean phenotype and the curvature of the reaction norm. According to our scenario (2), however, a correlation between mean values and reaction norms could be the result of two simultaneous associations: between genes for plasticity and second chromosome inversions, and between second chromosome inversions and genes for the mean phenotypic value, already reported (Hatadani et al. 2004). We can discard this scenario because no effect of the karyotype or any of its interactions were detected, and the two groups of karyotype showed equal reaction norms, in a remarkable contrast with the phenotypic group analysis. Finally, scenario (3) predicts an association between mean value and reaction norms, independently of the chromosome inversion, and cannot be refuted. Furthermore,

Table 2. Mean number of spots and mean reaction norms parameters per strain, karyotype, and phenotypic group, with 95% confidence interval, adjusted R^2 and F value. Values in bold are significant at the 5% level.

		Mean	a	b	c	R^2	F	
Strain	H	1.663	9.491 (6.470–12.513)	−0.617 (−0.941)–(−0.292)	0.010 (0.002–0.019)	0.983	8.051	
	I	1.236	15.582 (5.125–26.039)	−1.435 (−2.557)–(−0.312)	0.035 (0.005–0.064)	0.684	7.429	
	D	1.757	10.618 (6.906–14.328)	−0.745 (−1.143)–(−0.347)	0.014 (0.004–0.025)	0.971	9.915	
	O	2.175	2.664 (−2.907)–(8.236)	0.141 (−0.456)–(0.739)	−0.008 (−0.024)–(0.007)	0.922	1.584	
	T	1.428	9.028 (3.973–14.084)	−0.669 (−1.212)–(−0.127)	0.014 (−0.0004)–(0.028)	0.904	5.003	
	G	2.231	0.923 (−1.741)–(3.587)	0.354 (0.068–0.640)	−0.015 (−0.022)–(−0.007)	0.984	20.143	
	X	2.592	1.110 (−2.432)–(4.653)	0.288 (−0.091)–(0.668)	−0.011 (−0.021)–(0.001)	0.930	6.192	
	Z	2.329	1.218 (−3.158)–(5.595)	0.312 (−0.157)–(0.782)	−0.013 (−0.025)–(−0.001)	0.951	6.192	
	Karyotype	PA0	1.722	5.211 (4.344–6.078)	−0.183 (−0.228)–(−0.138)	–	–	2.028
		PC0	2.131	5.133 (4.233–6.032)	−0.158 (−0.205)–(−0.111)	–	–	0.307
Phenotypic group	light	1.521	11.180 (7.092–15.268)	−0.866 (−1.305)–(−0.428)	0.018 (0.007–0.030)	0.751	10.351	
	dark	2.332	1.479 (−1.398)–(4.356)	0.274 (−0.034)–(0.583)	−0.012 (−0.020)–(−0.003)	0.856	8.572	

the strong negative correlation ($r = -0.93$) between the mean value and the curvature parameter lends further support for this hypothesis, which turns out to be the best interpretation of our data.

**Figure 2.** Negative correlation between c value and the mean number of spots of each strain.

MEAN VALUE AND PHENOTYPIC PLASTICITY

These results deal with an evolutionary problem; does the character mean value for a given trait share the same genetic basis with its phenotypic plasticity (Via and Lande 1985; Scheiner and Lyman 1991; Scheiner 1993; Schlichting and Pigliucci 1993; Via 1993; Via et al. 1995; Dev Karan et al. 1999; Gibert et al. 2004; Pigliucci 2005)? Although at present there seems to be a consensus on the independency between mean value and plasticity; here, we found a strong pattern of association between the mean phenotype of a strain and the shape of its reaction norm.

To our knowledge, this is the first time a correlation of this magnitude has been found in reaction norms shape, due to variations in mean value, that is, an increase in mean value explains 87% ($R^2 = (0.933)^2$) of the change in the curvature of the reaction norm. However, there are two reported cases that have also detected similar results, but their importance was not adequately appreciated. Gibert et al. (1998) proposed the use of two characteristic values to describe quadratic reaction norms with regard to plasticity: TMV (temperature of maximum/minimum value) and g_2 (curvature), which is the same as the c parameter estimated here. A third value, MV (maximum/minimum value) is interpreted by those authors to represent the trait itself (Gibert et al. 1998; David et al. 2005), and should bear some relation

with mean value. Using these variables, Gibert et al. (2000) did find a somehow low, but significant (-0.375 , $P < 0.01$), negative correlation, between MV and g_2 in reaction norms of thorax and abdominal pigmentation in *D. melanogaster*. A significant negative correlation between the same characteristic values (-0.49 , $P = 0.012$) was also found for sternopleural bristle number in *D. melanogaster* by Moreteau et al. (2003). Both studies, however, did not interpret this result as evidence of a common genetic basis between MV and g_2 .

It is noteworthy that the three studies (including the present one) examined two different traits (pigmentation and sternopleural bristles) in two different species. This may suggest that the relationship between mean phenotypic value and reaction norm is not an all-or-none matter but a question of degree. It is reasonable to think of plasticity and the mean value of quantitative traits as bearing some degree of dependency on each other, because there are often many candidate genes for determining both mean value and phenotypic response. If this dependency is thought of as a correlation between mean value and parameters of the reaction norm, one should find from -1 to $+1$ correlation coefficients for different taxa and traits. Our results show a clear association between the mean phenotypic value of a trait and its reaction norm. Moreover, the correlation revealed here strongly suggests that if natural selection favors either a specific mean phenotype or a difference between phenotypes in two or more environments (selection on phenotypic plasticity), the same genes will be favored. Yet, it remains to be demonstrated that these results apply to other traits and other species, when watched closely for correlations in a series of varying temperatures. Naturally, this is an open question, which deserves future studies.

ACKNOWLEDGMENT

It is a pleasure to thank W. Nascimento de Souza for technical help. This work was supported by Grants from: Conselho Nacional de Desenvolvimento Técnico e Científico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP); and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

LITERATURE CITED

- Ananina, G., A. A. Peixoto, B. C. Bitner-Mathé, W. N. Souza, L. B. da Silva, V. L. S. Valente, and L. B. Klaczko. 2004. Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: seasonal, altitudinal, and latitudinal variation. *Gen. Mol. Biol.* 27:61–69.
- Bernardo, U., P. A. Pedata, and G. Viggiani. 2007. Phenotypic plasticity of pigmentation and morphometric traits in *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). *Bull. Entomol. Res.* 97:101–109.
- Das, A., S. Mohanty, and B. B. Parida. 1994. Abdominal pigmentation and growth temperature in Indian *Drosophila melanogaster*: evidence for genotype-environment interaction. *J. Biosci.* 19:267–275.
- David, J. R., P. Gibert, H. Legout, G. Pétavy, P. Capy, and B. Moreteau. 2005. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative traits analysis in natural populations. *Heredity* 94:3–12.
- Davis, A. K., B. D. Farrey, and S. Altizer. 2005. Variation in thermally induced melanism in monarch butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) from three North American populations. *J. Therm. Biol.* 30:410–421.
- Dev Karan, D., B. Moreteau, and J. R. David. 1999. Growth temperature and reaction norms of morphometrical traits in a tropical drosophilid: *Zaprionus indianus*. *Heredity* 83:398–407.
- Dobzhansky, T. 1970. *Genetics of the evolutionary process*. Columbia Univ. Press, New York.
- Elberse, I. A. M., T. K. Vanhala, J. H. B. Turin, J. M. M. Van Damme, and P. H. Van Tienderen. 2004. Quantitative trait loci affecting growth-related traits in wild barley (*Hordeum spontaneum*) grown under different levels of nutrient supply. *Heredity* 93:22–33.
- Fogleman, J. 1978. A thermal gradient bar for the study of *Drosophila*. *Dros. Inf. Serv.* 53:212.
- Fruta-Pessoa, O. 1954. Revision of the tripunctata group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). *Arq. Mus. Para.* 10:253–304.
- Ghalambor C. K., J. K. McKay, S. P. Carroll, and D. N. Reznick. 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct. Ecol.* 21:394–407.
- Gibert, P., B. Moreteau, J. C. Moreteau, and J. R. David. 1996. Growth temperature and adult pigmentation in two *Drosophila* sibling species: an adaptive convergence of reaction norms in sympatric populations? *Evolution* 50:2346–2353.
- Gibert, P., B. Moreteau, J. R. David, and S. M. Scheiner. 1998. Describing the evolution of reaction norm shape: body pigmentation in *Drosophila*. *Evolution* 52:1501–1506.
- Gibert, P., B. Moreteau, A. Munjal, and J. R. David. 1999. Phenotypic plasticity of abdominal pigmentation in *Drosophila kikkawai*: multiple interactions between a major gene, sex, abdomen segment and growth temperature. *Genetica* 105:165–176.
- Gibert P., B. Moreteau, and J. R. David. 2000. Developmental constraints on an adaptive plasticity: reaction norms of pigmentation in adult segments of *Drosophila melanogaster*. *Evol. Dev.* 2:249–260.
- . 2004. Phenotypic plasticity of body pigmentation in *Drosophila melanogaster*: genetic repeatability of quantitative parameters in two successive generations. *Heredity* 92:499–507.
- Gibert, J. M., F. Peronnet, and C. Schlotterer. 2007. Phenotypic plasticity in *Drosophila* pigmentation caused by temperature sensitivity of a chromatin regulator network. *Plos Genet.* 3:266–280.
- Hatadani, L. M., and L. B. Klaczko. 2008. Shape and size variation on the wing of *Drosophila mediopunctata*: influence of chromosome inversions and genotype-environment interaction. *Genetica* 133:335–342.
- Hatadani, L. M., J. C. R. Baptista, W. N. Souza, and L. B. Klaczko. 2004. Colour polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: genetic (chromosomal) analysis and nonrandom association with chromosome inversions. *Heredity* 93:525–534.
- Hoffmann A. A., C. M. Sgrò, and A. R. Weeks. 2004. Chromosomal inversion polymorphisms and adaptation. *Trends Ecol. Evol.* 19:482–488.
- Kennington, W. J., A. A. Hoffmann, and L. Partridge. 2007. Mapping regions within cosmopolitan inversion In(3R)Payne associated with natural variation in body size in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 177:549–556.
- Klaczko, L. B. 2006. Evolutionary genetics of *Drosophila mediopunctata*. *Genetica* 126:43–55.
- Kliebenstein, D. J., A. Figuth, and T. Mitchell-Olds. 2002. Genetic architecture of plastic methyl jasmonate responses in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 161:1685–1696.
- Moreteau, B., P. Gibert, J. M. Delpuech, G. Pétavy, and J. R. David. 2003. Phenotypic plasticity of sternopleural bristle number in temperate and tropical populations of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res. Camb.* 81:25–32.

- Pétavy, G., B. Moreteau, P. Gibert, and J. R. David. 2002. Phenotypic plasticity of body pigmentation in *Drosophila*: influence of a developmental thermoperiodic regime in two sibling species. *Physiol. Entomol.* 27:124–135.
- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends Ecol. Evol.* 20:481–486.
- Scheiner, S. M. 1993. Plasticity as a selectable trait: reply to Via. *Am. Nat.* 142:371–373.
- Scheiner, S. M., and R. F. Lyman. 1991. The genetics of phenotypic plasticity. II. Response to selection. *J. Evol. Biol.* 4:23–50.
- Schlichting, C. D., and M. Pigliucci. 1993. Control of phenotypic plasticity via regulatory genes. *Am. Nat.* 142:366–370.
- Stinchcombe J. R., L. A. Dorn, and J. Schmitt. 2004. Flowering time plasticity in *Arabidopsis thaliana*: a reanalysis of Westerman and Lawrence (1970). *J. Evol. Biol.* 17:197–207.
- Via, S. 1993. Adaptive phenotypic plasticity: target or by-product of selection in a variable environment? *Am. Nat.* 142:352–365.
- Via, S., and R. Lande. 1985. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39:505–522.
- Via, S., R. Gomulkiewicz, G. De Jong, S. M. Scheiner, C. D. Schlichting, and P. H. Van Tienderen. 1995. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends Ecol. Evol.* 10:212–317.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, NJ.

Associate Editor: C. Goodnight

Apêndice ao Trabalho: Rocha, F., H. F. Medeiros & L. B. Klaczko. 2009. The reaction norm for abdominal pigmentation and its curve in *Drosophila mediopunctata* depend on the mean phenotypic value. *Evolution* 63:280-287.

Introdução - questões derivadas da correlação entre curvatura e valor médio

O padrão de correlação entre a curvatura das normas de reação e o número médio de pintas nos tergitos abdominais de diferentes linhagens de *Drosophila mediopunctata*, verificado em Rocha *et al.* (2009), pode indicar uma regra de variação das normas de reação dessa característica: as normas de reação de genótipos que conferem altos valores fenotípicos médios devem ter valores do parâmetro c positivos (parábolas com concavidade para cima); as normas de reação de genótipos com menores valores médios devem ter valores de c negativos (parábolas com concavidade para baixo) enquanto as normas de reação de genótipos com valores médios intermediários devem apresentar valores de c próximos de zero (uma resposta linear).

Essa interpretação, entretanto, está relacionada à generalidade da correlação encontrada. Os dados obtidos em Rocha *et al.* (2009) não permitiram verificar essa possibilidade, uma vez que os genótipos analisados apresentaram um acentuado agrupamento de seus valores fenotípicos médios: o grupo fenotípico claro apresentou uma média de aproximadamente 1,5 pintas por indivíduo, variando de 1,2 a 1,7; e o grupo fenotípico escuro apresentou média de 2,3 pintas por indivíduo, variando entre 2,2 a 2,6. Assim, a correlação encontrada poderia ser resultado da análise de apenas dois grupos fenotípicos extremos, com pouca variação interna, deixando aberta a possibilidade de que a análise de outros grupos fenotípicos (com média em torno de duas pintas por indivíduo, por exemplo) revelasse resultados não previstos pelo padrão descrito em Rocha *et al.* (2009).

Para testar essa possibilidade, descrevemos as normas de reação de um grupo de

heterozigotos resultantes do cruzamento de estirpes utilizadas em Rocha *et al.* (2009), verificando se seus valores fenotípicos médios e curvaturas obedecem à mesma correlação descrita naquele trabalho.

Material e métodos

Sete diferentes cruzamentos foram realizados, entre e dentro dos grupos fenotípicos descritos por Rocha *et al.* (2009). Três cruzamentos foram realizados entre uma estirpe escura (O) e cada uma de três estirpes claras (X, D, G) e quatro cruzamentos envolveram apenas estirpes claras (G x I x I; H; G x H, X x I). Foi utilizado um procedimento experimental semelhante ao descrito em Rocha *et al.* (2009): larvas de primeiro estágio foram coletadas de cada cruzamento e transferidas em grupos de 20 para tubos com 7 ml de meio de cultura; para cada cruzamento, 11 frascos foram mantidos no gradiente térmico variando entre 14 ° e 24 ° C, com incrementos de 1 ° C, até a emergência das moscas. O número de pintas de cada indivíduo foi contado com no mínimo três dias após a emergência. A análise da forma das normas de reação seguiu o mesmo método, limitada ao polinômio de segundo grau (parábola), para permitir a comparação com os resultados de Rocha *et al.* (2009).

Resultados e discussão

As normas de reação das progênies heterozigotas resultantes de cruzamentos entre linhagens homozigotas mostraram alguma sobreposição entre os dois grupos de cruzamentos feitos: entre estirpes do grupo fenotípico escuro e do grupo claro; e entre estirpes do grupo claro (Fig. 1A). Os três cruzamentos realizados entre grupos fenotípicos apresentaram normas de reação que são bem descritas por equações lineares, e podem ser resumidas pela média entre suas curvas (Fig. 1B). A equação linear ajustada sobre essa

média representa, portanto, a resposta média desse grupo fenotípico intermediário, que é bastante semelhante à curva esperada pela média entre as normas de reação do grupo fenotípico claro e o grupo fenotípico escuro, i.e. a curva esperada para o caso de não haver dominância para a forma da norma de reação.

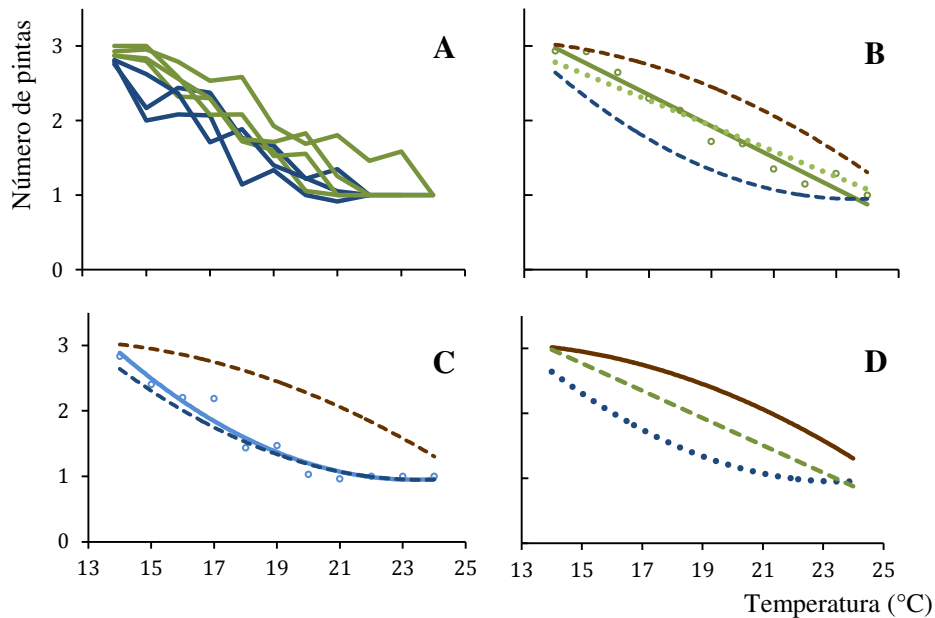


Figura 1. Normas de reação do número de pintas abdominais de *Drosophila mediopunctata* em resposta à temperatura. **A:** norma de reação dos sete cruzamentos entre linhagens homocigotas - linhas azuis: cruzamentos entre linhagens claras; linhas verdes: cruzamentos entre linhagens claras e escuras. **B:** círculos e linha verde sólida: norma de reação média para cruzamentos entre claro x escuro, em comparação com as normas de reação dos grupos fenotípicos escuro e claro (linhas tracejadas marrom e azul); linha tracejada verde: média entre as normas de reação dos grupos fenotípicos claro e escuro. **C:** norma de reação média para cruzamentos claro x claro (círculos e linha azul sólida), em comparação com as normas de reação médias dos grupos fenotípicos escuro e claro (linhas tracejadas). **D:** padrão resumido de variação das normas de reação: linha marrom sólida - grupo fenotípico escuro; linha pontilhada azul - grupo fenotípico claro, linha tracejada verde - grupo fenotípico intermediário (heterocigoto entre grupos claro e escuro).

Os resultados da análise da forma das normas de reação dos cruzamentos realizados são apresentados na Tabela 1: apenas dois cruzamentos, entre estirpes do grupo fenotípico claro (G x I e I x H), tiveram normas de reação com valores significativos e positivos para o parâmetro c , enquanto parábolas não explicaram significativamente melhor as normas de reação do que equações lineares para os outros cinco cruzamentos. Entre essas cinco curvas restantes, duas apresentaram valores do parâmetro c mais próximos de zero, ou seja, suas

normas de reação foram aquelas que mais se aproximaram de uma resposta linear (O x G e O x X). Ambas foram resultado de cruzamentos entre uma estirpe clara e uma escura. As três curvas restantes, incluindo o terceiro cruzamento escuro x claro, tiveram curvaturas de valor intermediário entre esses dois tipos de resultado (parabólico x linear).

Dessa forma, esse conjunto de curvas mostra um padrão contínuo de variação de normas de reação entre dois tipos de curvas, relacionados ao tipo de cruzamento que as geraram: cruzamentos entre linhagens claras produziram parábolas com curvatura significativamente positiva (côncavas); enquanto cruzamentos entre estirpes escuras e claras tiveram normas de reação com valores do parâmetro c próximo a zero, *i.e.*, lineares. Este padrão corrobora e complementa a correlação entre o valor médio e o parâmetro c descrita em Rocha *et al.* (2009): a correlação baseada apenas nos dados dos sete cruzamentos foi significativa ($R = -0,917$, $p < 0,005$) e, incluindo dados de homozigotos e heterozigotos, a correlação tornou-se ainda mais significativa ($R = -0,923$, $p < 0,0001$).

Tabela 1. Parâmetros e intervalos de confiança de 95% estimados para polinômios lineares e quadráticos ajustados às normas de reação de cruzamentos entre linhagens homocigotas de *D. mediopunctata* e médias para cada tipo de cruzamento.

Cruzamento	Parâmetros lineares			Parâmetros quadráticos			F		
	<i>a</i>	<i>b</i>	R ²	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>		R ²	
Claro x Claro	G x I	4,71 (3,38 - 6,03)	-0,170 (-0,238) - (-0,101)	0,77	13,40 (7,25 - 19,55)	-1,111 (-1,770) - (-0,451)	0,025 (0,007 - 0,042)	0,91	10,88
	I x H	5,81 (4,76 - 6,85)	-0,216 (-0,271) - (-0,162)	0,90	12,68 (7,82 - 17,54)	-0,960 (-1,481) - (-0,439)	0,020 (0,006 - 0,033)	0,96	10,89
	G x H	5,25 (4,25 - 6,25)	-0,187 (-0,240) - (-0,134)	0,89	7,70 (1,17 - 14,22)	-0,454 (-1,157 - 0,250)	0,007 (-0,011 - 0,026)	0,90	0,81
	X x I	6,15 (5,22 - 7,08)	-0,243 (-0,294) - (-0,191)	0,95	10,69 (4,03 - 17,34)	-0,757 (-1,507) - (-0,007)	0,014 (-0,007 - 0,035)	0,96	2,82
Claro x Escuro	O x D	6,59 (5,70 - 7,49)	-0,255 (-0,302) - (-0,207)	0,95	10,51 (4,48 - 16,53)	-0,688 (-1,351) - (-0,026)	0,012 (-0,006 - 0,030)	0,96	2,40
	O x G	6,24 (5,17 - 7,30)	-0,235 (-0,293) - (-0,178)	0,94	6,06 (-3,00 - 15,12)	-0,215 (-1,240 - 0,810)	-0,001 (-0,029 - 0,028)	0,94	0,00
	O x X	5,82 (5,07 - 6,58)	-0,195 (-0,234) - (-0,156)	0,93	5,06 (-0,27 - 10,40)	-0,113 (-0,685 - 0,460)	-0,002 (-0,017 - 0,013)	0,94	0,11
Médias	Claro x Claro (G x I e I x H)	5,26 (4,16 - 6,36)	-0,193 (-0,250) - (-0,136)	0,86	13,04 (8,50 - 17,58)	-1,035 (-1,522) - (-0,548)	0,022 (0,009 - 0,035)	0,96	16,01
	Claro x Escuro	5,93 (5,32 - 6,5)	-0,211 (-0,242) - (-0,179)	0,96	8,74 (5,10 - 12,39)	-0,515 (-0,906) - (-0,120)	0,008 (-0,002 - 0,018)	0,97	3,25

Valores de F em **negrito** representam cruzamentos que são significativamente mais bem explicados por regressões quadráticas ($p < 0.05$).

Os resultados obtidos, portanto, afastam a possibilidade de que a correlação encontrada em Rocha *et al.* (2009) seja um artefato da escolha de dois grupos fenotípicos extremos, pois mesmo curvas que apresentaram menor amplitude de variação mantêm significativamente esse padrão. Além disso, esses resultados reforçam a interpretação de que a correlação entre curvatura e valor fenotípico médio pode representar um padrão, ou regra, geral para a variação das normas de reação do número de pintas nos tergitos abdominais de *D. mediopunctata*. Ele pode ser descrito da seguinte forma: genótipos que conferem menos pintas abdominais (grupo fenotípico claro) têm normas de reação com forma de parábolas côncavas; genótipos que conferem mais pintas abdominais (grupo fenotípico escuro) têm parábolas convexas; e genótipos com número intermédio de pintas (grupo fenotípico intermediário) têm normas de reação de forma intermediária, ou lineares (Fig. 1D).

2. FORMA E VARIAÇÃO DAS NORMAS DE REAÇÃO

CONNECTING THE DOTS OF NONLINEAR REACTION NORMS UNRAVELS THE THREADS OF GENOTYPE–ENVIRONMENT INTERACTION IN *DROSOPHILA*

Felipe B. Rocha¹ and Louis B. Klaczko^{1,2}

¹Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Cx. Postal 6109, Campinas, 13083–970 SP, Brasil

²E-mail: lbk@unicamp.br

Received August 1, 2011

Accepted April 15, 2012

Two contrasting views can characterize the attitude of many studies toward reaction norms (RNs). An “optimistic” view attempts to use a linear model to describe RN variation; and a “pessimistic” view emphasizes RNs complexity without using any model to describe them. Here, we have analyzed the shape of 40 RNs of five traits of *Drosophila mediopunctata* in response to 11 temperatures. Our results, along with several other studies, show that RNs are typically curves best explained by nonlinear models. Estimating the set of 40 RNs on the basis of three rather than 11 temperatures produces a scenario, typical of the pessimistic view, where the linear model is either nonsignificant or a poor explanatory model. Moreover, we show that RN nonlinearity can significantly affect the conclusions of studies using the linear model. We propose a middle ground view on RNs which recognizes their general nonlinearity. Such view could, on the one hand, explain part of the important phenomenon of genotype–environment interaction emphasized by the pessimistic view. Moreover, it may explain features and patterns which are being ignored by the optimistic view. We suggest the parabolic model as first step to reveal patterns which were ignored before, or not fully appreciated.

KEY WORDS: Aristal branches, development time, phenotypic plasticity, pigmentation, sternopleural bristles, thorax length.

In evolutionary biology, phenotypic plasticity (PP) and reaction norm (RN) are two central concepts connected to the fact that the phenotype of an organism is affected by the environment where development occurs (Fusco and Minelli 2010). PP may be defined as the ability of a given genotype to respond to environmental variation producing different phenotypes (Pigliucci 2005); and RN is the curve that describes the phenotypic response of a given genotype as a function of the environment, thus referring to a phenotypic trait and an environmental factor which are (or can be represented as) continuous variables (Chevin et al. 2010). Thus, RNs show if and how genotypes respond to a given environmental variation.

From a biometric analysis perspective, the variation in phenotypic responses of different genotypes submitted to diverse environments—the variation in RN response—is statistically represented as a nonadditive effect of genotype and environment in an analysis of variance (ANOVA), that is, a genotype–environment interaction ($G \times E$) (Via and Lande 1985). Hence, we may establish the following relationship among these concepts:

$$G \times E \Leftrightarrow \text{variation in RN response} \Leftrightarrow \text{variation in PP.}$$

Despite this correspondence, the “analysis of phenotypic variance is not a sufficient substitute for knowing the actual

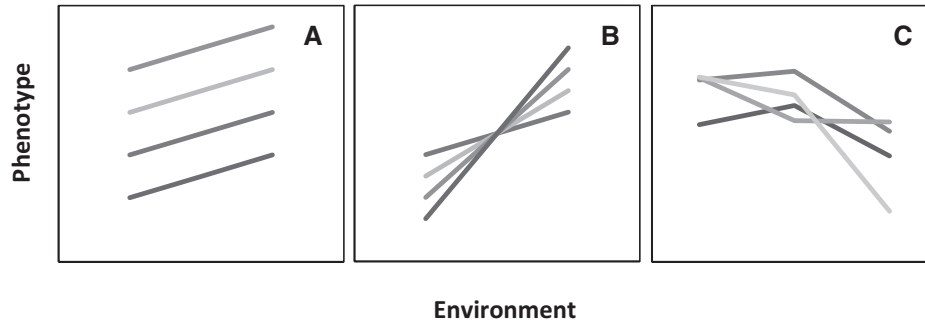


Figure 1. Different types of reaction norm variation: (A) linear RNs with varying elevation values and constant slope; (B) linear RNs with varying slope values and the same elevation; (C) RN variation typically found in studies which use the three-point-curve experimental design.

norms of reaction of genotypes” (Gupta and Lewontin 1982). Therefore, the understanding of $G \times E$ and its many evolutionary implications—from the evolution of adaptive PP to the maintenance of genetic variation for quantitative traits—requires the ability to describe the variation of RNs in a comprehensible manner, that is, describe $G \times E$ not only as a factor in an ANOVA, but in terms of RNs that may cross each other in a predictable manner. Ideally, this description should be made with a model, thus allowing for outcome predictions of natural selection acting on different genotypes occurring in diverse environments.

In this sense, many efforts have been made toward describing actual RNs. Often, such studies have used a simple experimental design: individuals of each genotype are allowed to develop at two, or a maximum of three different environments; and the RNs are described as the lines that are traced connecting the phenotypic values of each genotype (Thomas and Barker 1993; Noach et al. 1997; Bitner-Mathé and Klaczko 1999; Pérez and Garcia 2002; Elberse et al. 2004; Andrade et al. 2005; Gutteling et al. 2007; Ellers and Driessen 2011). This two/three-point-curve experimental design has already been used to produce a variety of empirical data which led to the emergence of different views on $G \times E$, RN, and PP. For clarity, here we will characterize the two ends of a continuum which contains these different views. We named these epistemological views as “optimistic” and “pessimistic,” referring to their attitude toward the possibility of describing and understanding RN variation. The optimistic view seeks the understanding of $G \times E$ through the use of a simple model to describe RN variation. The pessimistic view, however, states that RNs vary in such complex ways that it becomes impossible to model and generalize $G \times E$.

Additionally to the use of a model, the optimistic view is characterized by the belief that the simplest possible RN model—the linear equation—is a legitimate simplification of actual RNs. Thus, RN variation would be summarized by the parameters b_0 (intercept or elevation) and b_1 (slope) in the RN function $P = b_0 + b_1E$, where P is the phenotypic value and E the environ-

ment. Thus, genotypes with different elevations but with the same slope would have RNs that run side to side, keeping the same rank order along the environmental axis (Fig. 1A); whereas genotypes with varying slopes but constant elevation would have different responses to the same environmental variation (different PPs), and their curves would cross each other, leading to predictable changes in rank order as the environment varies (Fig. 1B). Hence, the optimistic view promotes the building of models of RN and PP evolution (de Jong 1990; Gavrillets and Scheiner 1993; Scheiner 1993; de Jong 2005; Zhang 2006; Ghalambor et al. 2007; Nussey et al. 2007; Aubin-Horth and Penn 2009; Lande 2009; King and Roff 2010; Reed et al. 2010) by feeding characteristic RN parameters into models.

On the other hand, the pessimistic view is characterized by the lack of an attempt to adjust any model, due to the perception that RNs show complex variation, crossing each other more frequently than expected by the linear model (Byers 2005) (Fig. 1C). Consequently, under this view it is not possible to build models to predict the evolution of RN shape (PP), and $G \times E$ is a synonym of unpredictable and ubiquitous rank order changes among environments. Thus, it perceives RN complexity as leaving no hope for further understanding, leading to the classical aphorism “it is impossible to say which genotype is better or worse” (Lewontin 1974; Gottlieb 2007; Vale et al. 2008).

Both the optimistic and the pessimistic views find support on empirical data. Part of the two/three-point-curve studies seems to provide empirical support for the optimistic view, showing RNs that seem to be actually linear (e.g., Coyne and Beecham 1987 and Liefing et al. 2009). However, other studies results seem to support the pessimistic view: three-point-curve RNs that vary in a seemingly random manner, with each genotype curve having its maximum and minimum values at any of the three environments, and RNs crossing each other more frequently than expected by the linear model (e.g., Fig. 2 in Lewontin 1974).

Both views are represented and reinforced by studies which have addressed key issues on RN evolutionary genetics, arriving

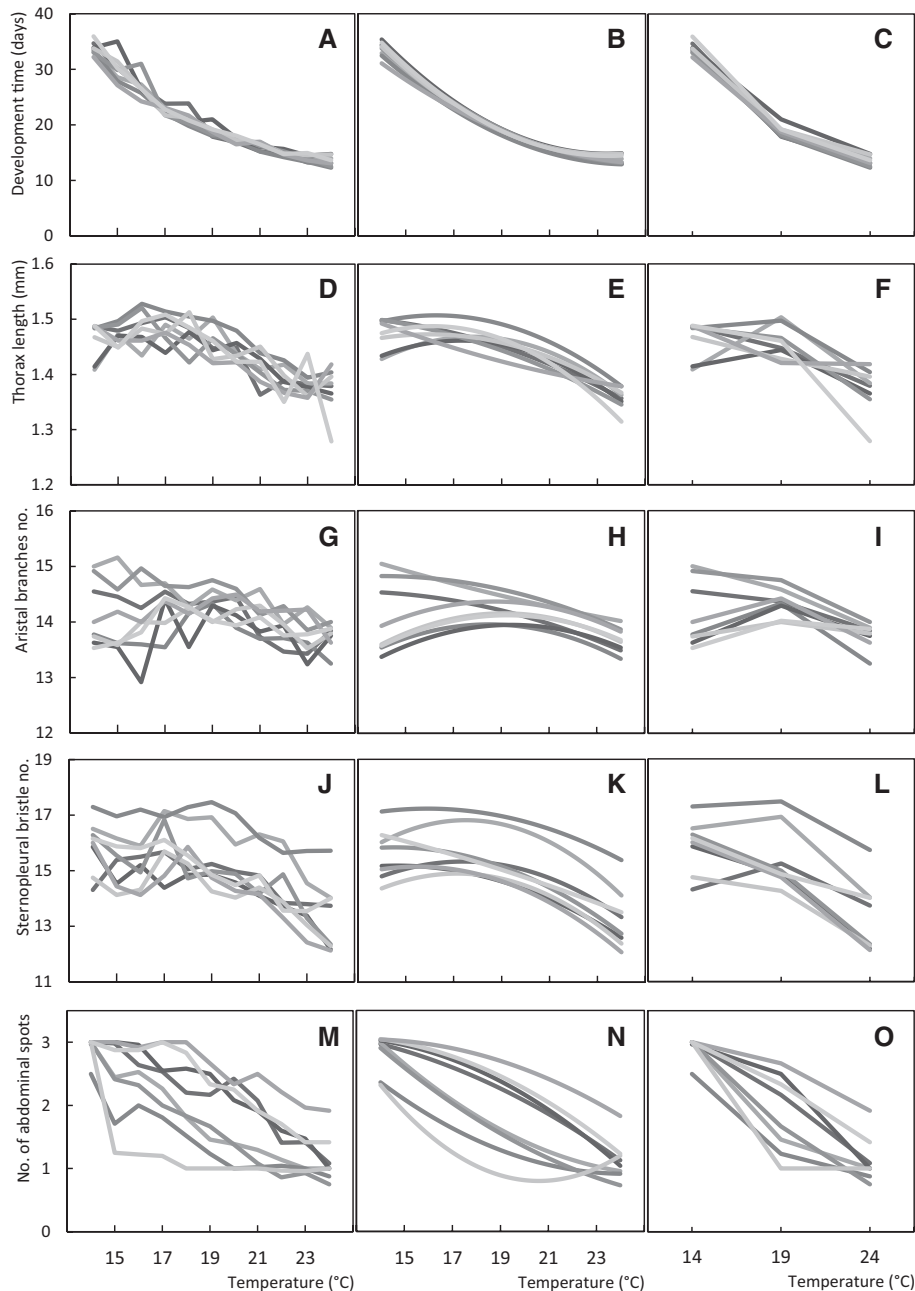


Figure 2. Mean reaction norms of different traits of *Drosophila mediopunctata* in response to temperature (left column) along with the parabolic adjustments to each RN curve (middle column) and the reduced RNs with only three temperatures (right column). A, B, and C: Development time (days); D, E, and F: Thorax length (mm); G, H, and I: Arista branches number; J, K, and L: Sternopleural bristle number; M, N, and O: number of abdominal dark spots (from Rocha et al. 2009).

at important conclusions. Using a measure of plasticity derived from the optimistic view, Scheiner and Lyman (1991) performed a selection experiment to test the genetic independence between the mean value and the plasticity of a trait. They found that the response for selection for the mean thorax length of *Drosophila melanogaster* and for its plasticity were independent, and interpreted these results as supporting the epistasis model, that is, that the plasticity of a trait and the trait mean value are determined by

different loci. On the other hand, the pessimistic view is clearly present in the work of Gupta and Lewontin (1982), which paradoxically made an emphatic defense of the importance of knowing RNs, against the analysis of phenotypic variance. After analyzing the response of three traits of *D. pseudoobscura* to three temperatures, they stressed that “the essential feature of the norms of reaction” is “that they cross each other so that the large main effect of genotype does not allow one to assume that there

are really ‘better’ or ‘worse’ genotypes” (Gupta and Lewontin 1982).

Unmistakably, the results which support the pessimistic view are evidence against the central assumption of the optimistic view: RNs that cross each other more than once are necessarily nonlinear. Indeed, since the pioneer work of Krafka (1920), a number of studies which have described RNs using more than three environments (Thomas 1993; Rocha et al. 2009; and many papers from J. David’s group, see below) often show RNs which are clearly nonlinear, even for RNs that had previously been treated as linear (e.g., Coyne and Beecham 1987). Nonetheless, despite the potential consequences of these findings, the two prevailing views on RNs, PP, and G×E seem to remain unchanged.

In a previous work, using 11 different temperatures to test each strain, we have shown that the RNs of the number of dark spots in the abdomen of *D. mediopunctata* are well described by parabolas (Rocha et al. 2009). Using these curves to test the consensus on the independence between the mean value and the plasticity of a trait, we found a significant correlation between the mean number of spots of each strain and its RN shape (curvature). The RNs change from bowed downward to bowed upward parabolas as the mean number of spots across all temperatures of each strain increases (Rocha et al. 2009). Hence, in contrast with Scheiner and Lyman (1991) who favored the epistasis model, our results supported the pleiotropy model (Via 1993), which states that the same locus determines both the plasticity and the mean value of a trait. By using a nonlinear model for RN description, we could find a pattern of genetic association between the mean value and the plasticity of a trait not assessable to linear models, thus highlighting the methods’ power and providing evidence that its use may lead to a different view on RNs.

Taken together, these findings bring up some questions: (1) Are RNs typically linear or nonlinear curves? (2) Is the pessimistic view a consequence of a linear simplification of nonlinear RNs? and (3) What is being lost with the RN linear model that nonlinear models reveal? To address question (1), we described and analyzed a set of 40 RNs of five traits of *D. mediopunctata* in response to 11 temperatures. We tried to find, for each of the 40 curves, the polynomial with best significant fit, that is, the function which would get closest to the underlying RN shape. The generality of our findings was assessed by comparing our results to published RNs with more than three points. To investigate question (2), we have reduced the 11 temperature RNs to three temperature RNs and compared the results of the analysis of these two sets of curves as to the possibility of describing RN variation. Question (3) was addressed by verifying if the conclusions of two published studies based on the linear model may be affected by the nonlinearity of the RNs. Finally, we tried to delineate a view on RN, PP, and G×E which takes into account the nonlinearity of RNs, pointing out methodological issues

and questions which would result from the adoption of such view.

Material and Methods

DESCRIPTIONS OF THE SHAPE OF 40 RNS

Strains

We used the same flies examined by Rocha et al. (2009) to describe the RNs of the number of abdominal spots of *D. mediopunctata* in response to temperature. They belong to a group of eight strains with different second chromosome inversions (PA0 or PC0) but otherwise the same genetic background, produced by Hatadani et al. (2004). These strains were sampled according to a design intended to include the variation of the whole abdominal pigmentation phenotype spectrum present in each chromosomal inversion, while minimizing the observed association between second chromosome inversions and the number of abdominal spots (Hatadani et al. 2004). They showed a marked division in two groups, one with low mean number of abdominal spots, and the other with high mean number of spots. Since the sole trait considered in this sampling design was the abdominal pigmentation phenotype, these strains should represent a random sample with regard to other genetically uncorrelated traits.

Thermal gradient

First instar larvae were collected from each strain and groups of 15 larvae were transferred to vials with 5 mL of culture medium (Rocha et al. 2009). Eleven vials from each strain were kept in a thermal gradient (modified from Fogleman 1978, see Fig. S1 for a picture of the apparatus), varying between 14 and 24°C, with 1°C increments. Three replicates were carried out simultaneously (8 strains × 11 temperatures × 3 replicates = total of 264 vials), and 1122 flies were analyzed. Imagoes of each vial were transferred daily to a new vial after the first emergence. The number of spots was counted on adult flies that were at least three days old, by which time color intensity stabilizes. After that, each fly was put in 70% ethanol, allowing the analysis of the other morphological traits.

Characters

We have examined five different traits:

- (1) Development time, from the day in which larvae were put into the thermal gradient to the day of emergence.
- (2) Thorax length—from the anterior margin of the thorax to the tip of the scutellum.
- (3) Number of arisal branches, including the major and the small terminal branches on both sides.
- (4) Number of sternopleural bristles, counted on both sides of the fly.
- (5) Number of dark spots on the abdominal tergites (data from Rocha et al. 2009).

Analysis of RN shape

A major problem of RN analysis lies on determining the underlying RN shape which produces the observed phenotypic values. David et al. (1990, 1997) proposed a two-step procedure that tests for an environmental effect on the RN slope along the environmental gradient, however, this analysis depends on a set of RNs which can be treated as repeats. This assumption is not warranted for genotypes with varying shape RNs, as found in our previous analysis (Rocha et al. 2009).

To circumvent this difficulty, we used a “forward selection” procedure of curve fitting to obtain the polynomial with the best significant fit for each individual curve. This method consists of testing, for each RN curve, polynomials of increasing order. For each strain and trait, we began by fitting a linear regression of the mean phenotypic value on the temperature, adjusting the linear model $P = b_0 + b_1T$. Then, we proceeded to the quadratic model, adjusting the function $P = b_0 + b_1T + b_2T^2$. To test whether the addition of the quadratic term (b_2T^2) led to a significant improvement of fit (increment of R^2), we used the corresponding F value, calculated using the results of the respective ANOVA of each regression, as

$$F = \frac{(\text{regression SS for higher degree model}) - (\text{regression SS for lower degree model})}{\text{residual MS for higher degree model}}$$

with numerator degrees of freedom of 1 and a denominator degrees of freedom equal to the residual degrees of freedom of the higher degree model. Thus, even if the linear model had a good fit to an RN curve, we tested if a quadratic model fit significantly better.

The same procedure was used to test the fit of a third degree (cubic) function ($P = b_0 + b_1T + b_2T^2 + b_3T^3$), and so on, for increasingly higher order polynomials. For each RN, this procedure was carried forward until the addition of two more terms were tested as nonsignificant, to ensure that relevant terms were not being inadvertently neglected. Then, the last polynomial with a significant term was assigned as the best fit polynomial for each RN. This is a standard curve fitting procedure, which uses the multiple regression sequential analysis for choosing which predictor variables lead to a significant increase in the coefficient of determination, and is recommended by Sokal and Rohlf (1995) and Zar (1999).

ANALYSIS OF THREE TEMPERATURE RNS

To investigate whether the typical RN results that sustain the pessimistic view may emerge as a result of oversimplifying RN nonlinearity, we investigated whether the number of temperatures could affect the possibility of describing and understanding RN variation. Since it is not possible to “fill in” the blanks of RN curves from studies which support this view, we carried out an

analysis in the opposite direction, reducing our dataset to just three temperatures: 14, 19, and 24°C.

First, a linear regression was performed for the same type of data used in the analysis of the full dataset (mean phenotypic value per strain and temperature), with only the three temperatures. However, this analysis detected significant linear regressions in only two among 40 RNs, hindering the comparison of the results between the two approaches. Thus, to enable the comparison of two sets of mostly significant polynomials, we performed linear regressions for each three-point-curve RN using the individual phenotypes per strain and temperature.

TESTS OF THE EFFECT OF NONLINEARITY OF RNS

Scheiner and Lyman (1991) performed six selection experiments on *D. melanogaster* populations: for increased and decreased thorax length at 19°C, increased and decreased thorax length at 25°C; and for increased and decreased plasticity (difference between 19 and 25°C means), and tested each population for direct and indirect responses.

To carry out an exploratory analysis of the effects of changes in RN parameters for each type of response, we examined how the

variation of the underlying RN would affect the mean values at 19 and 25°C and the difference between them. Karan et al. (2000) have described the RNs of thorax length of *D. melanogaster* as parabolic curves bowed upward, using the characteristic values proposed by David et al. (1997) and Gibert et al. (1998): maximum value (MV), temperature of maximum value (TMV), and curvature (g_2). Using the mean value for each parameter reported by Karan et al. (2000), we drew three sets of five curves, each one showing RNs: the mean (μ) and other four curves which varied solely at one parameter: for MV: $\mu + 0.5$, $\mu - 0.5$, $\mu + 1$, $\mu - 1$; for g_2 : $\mu + 0.005$, $\mu - 0.005$, $\mu + 0.01$, $\mu - 0.01$; and for TMV: $\mu + 0.5$, $\mu - 0.5$, $\mu + 1$, $\mu - 1$. For each set of parabolic curves, we deduced which linear curves would result if only 19 and 25°C were used to describe each RN.

A more recent study of Liefting et al. (2009) has analyzed the RNs of *D. serrata* in response to three temperatures (16, 22, and 28°C). They used population samples from a latitudinal gradient in Australia to study the variation of the RN slope as a function of latitude, and found a contrast between one fitness trait (developmental rate) and two morphological traits (wing size and wing:thorax ratio). For the morphological traits, they observed an increase in RN slope with increasing latitude, whereas for the lower half (16–22°C) of RNs of developmental rate they found the opposite result: a decrease in the slope with increasing latitude. The developmental rate was estimated as (development time)⁻¹,

Table 1. Number of reaction norms with best significant fit for five traits of *Drosophila mediopunctata*, according to the reaction norm shape (polynomial degree).

	No				
	fit	Linear	Quadratic	Cubic	Quartic
Development time	0	0	6	2	0
Thorax length	0	3	2	2	1
Number of arisal branches	1	2	4	0	1
Number of sternopleural bristles	0	2	2	2	2
Number of abdominal spots	0	2	4	1	1
Total (overall=40)	1	9	18	7	5
Total with $R^2 > 0.80$		4	12	7	5

yielding nearly linear RNs which facilitate the use of RN slope as a direct measure of plasticity. To examine whether this transformation could affect the variation of RNs, we used the parabolic function adjusted to the mean developmental time RN from our data. Each parameter was changed separately, producing three sets of development time curves which varied for each RN parameter at a time, which were transformed into developmental rate RNs for comparison.

Results

DESCRIBING THE SHAPE OF A SET OF RNS OF DIFFERENT TRAITS

Response curves

The RNs show large variability of plasticity to temperature (Fig. 2, left column), depending on the trait analyzed. A simple visual inspection indicates that the RNs of developmental time and thorax length show little variation among strains, whereas the number of arisal branches, number of sternopleural bristles, and the number of abdominal spots show striking differences among RNs.

RN shape

We found polynomials with significant adjustment for 39 RNs in a total of 40, that is, 39 curves showed significant response to temperature (Table 1). Among these curves, 18 RNs were significantly best described by second-order polynomials, seven by third-order polynomials, and five by fourth-order polynomials. Summing up, there were 30 significantly nonlinear RNs, and nine curves were described by linear equations with no significant increase of adjustment for higher order polynomials. One curve (number of arisal branches for one strain) did not respond to temperature, and so had no significant polynomial adjustment. Actually, the number of arisal branches was the trait with lower adjustment for all polynomial orders, and was also the sole trait where the direction of response varied, that is, strains could show an increase or decrease of phenotypic value with increasing temperature (Table 2). There were 28 curves for which a very good approximation of the underlying RN shape was obtained, with more than 80% of the phenotypic variation explained as a function of the temperature ($R^2 > 0.8$). Among these, 24 curves were significantly nonlinear, whereas only four were described by linear polynomials and showed no significant improvement of adjustment to higher degree models.

The distribution of RN shapes indicates some degree of trait specificity. Development time was the sole trait where only nonlinear curves were assigned as the final RN shape; it was also the trait which had highest R^2 values for the linear regression when compared to the other traits. The number of sternopleural bristles showed highest variability of RN shapes, with each polynomial order showing best fit for the RNs of two strains.

Table 2 shows the mean R^2 values for each polynomial degree for each trait. It shows an interesting feature which was common across all traits: the largest increase in R^2 values occurred from first to second degree polynomials (from 0.66 to 0.81), whereas third and fourth degrees had similar explanatory power (0.85 and 0.88). Table S1 in the supplementary material shows the R^2 for all polynomials for each strain and character. Table S2 shows the results of the F tests for each curve and each character.

Table 2. Mean R^2 values (\pm SE) of each polynomial degree adjusted to the reaction norms of five traits of *Drosophila mediopunctata*.

Trait	R^2			
	Linear	Quadratic	Cubic	Quartic
Development time	0.91 \pm 0.01	0.98 \pm 0.01	0.98 \pm 0.01	0.98 \pm 0.01
Thorax length	0.62 \pm 0.07	0.78 \pm 0.03	0.84 \pm 0.03	0.86 \pm 0.03
Number of arisal branches	0.28 \pm 0.13	0.57 \pm 0.07	0.63 \pm 0.07	0.72 \pm 0.05
Number of sternopleural bristles	0.62 \pm 0.05	0.79 \pm 0.01	0.84 \pm 0.02	0.88 \pm 0.02
Number of abdominal spots	0.85 \pm 0.07	0.92 \pm 0.03	0.94 \pm 0.02	0.95 \pm 0.01
Overall mean	0.66\pm0.05	0.81\pm0.03	0.85\pm0.03	0.88\pm0.02

Table 3. Summarized results of the regression analysis of 40 reaction norms, using three (14, 19, and 24°C) or 11 (14–24°C) temperatures: number of significant polynomial adjustments, mean R^2 value across all regressions, and number of polynomials according to the R^2 value. Polynomial data: three temperature RNs—only linear regressions; 11 temperature RNs—polynomials with best significant fit for each RN curve.

		Development time	Thorax length	Aristal branches no.	Sternopleural bristle no.	Abdominal spots no.	Total
Eleven temperature RNs	No. significant polynomials	8	8	7	8	8	39
	Mean R^2 value	0.98	0.79	0.57	0.85	0.94	0.83
	Polynomials with $R^2 > 0.8$	8	5	1	6	8	28
	Polynomials with $R^2 < 0.5$	0	0	3	0	0	3
Three temperature RNs	No. significant polynomials	8	3	3	6	8	28
	Mean R^2 value	0.87	0.08	0.08	0.30	0.59	0.38
	Polynomials with $R^2 > 0.8$	8	0	0	0	0	8
	Polynomials with $R^2 < 0.5$	0	8	8	7	1	24

DESCRIBING THE VARIATION OF THREE TEMPERATURE RNS

The right column of Figure 2 shows, for the five characters, the mean RNs using only three temperatures, as is commonly found in the literature (see above). They show a marked contrast with the full curves and suggest that part of the crossings among RNs may be caused by error (due to developmental noise or sampling error) around each mean value, which is compensated when more environments are considered.

The results from the linear regression analysis of the 40 three-point RNs are shown in Table 3, along with the summarized results from the analysis of the shape of the full dataset for comparison. Among the 40 three-point RNs, 28 yielded significant linear regressions of the individual values of each strain on temperature (Table 3). The remaining 12 curves were mostly found among the RNs of the thorax length and of the number of arista branches. The explanatory power of the linear model was very low: regressions with R^2 values higher than 0.8 were obtained only in the eight RNs of development time, whereas the majority (24) of the RNs had R^2 values lower than 0.5 (Table 3).

Discussion

ARE RNS TYPICALLY LINEAR OR NONLINEAR CURVES?

Our results show that, for the traits of *D. mediopunctata* we studied, RNs are generally best described as nonlinear curves. Significantly fit nonlinear curves were remarkably more prevalent than linear curves, either if we consider the whole set of significant polynomials (77% of nonlinear curves against 23% linear) or just the set of curves with a better fit ($R^2 > 0.8$: 86% nonlinear against 14% of linear RNs). Each trait showed a specific pattern of RN shape and variation, which may suggest that the variation of RNs is constrained, possibly depending on how closely related to fitness each trait is: RNs of development time were all bowed down-

ward and showed small variation at each temperature, whereas the number of abdominal dark spots RNs varied from parabolas bowed upward to bowed downward and were more spread with larger variation over the phenotypic range at each temperature.

To evaluate the generality of this pattern, one may examine other studies which allow the distinction between linear and nonlinear curves, that is, which use more than three environments to describe RNs. Noticeably, most of these studies have analyzed the response of different *Drosophila* species to temperature. Among these, most are attributable to the research group headed by Prof. Jean David (Delpuech et al. 1995; Karan et al. 1999, 2000; Gibert and de Jong 2001; Moreteau et al. 2003; Gibert et al. 2004, 2009; David et al. 2005). So far, this group has examined at least six different *Drosophila* species, describing with nonlinear models the RNs of up to nine different traits and noticing that the RNs of morphological traits of ectothermic species are generally nonlinear (David et al. 1997). A nonexhaustive survey reveals that several other studies reinforce this observation: various traits of adult and larvae of Lepidoptera species (Windig 1994; Kingsolver et al. 2001, 2004); 12 morphological traits of an Hymenoptera species (Bernardo et al. 2007); body size of four Ephemeroptera (mayflies) species (Cabanita and Atkinson 2006); and egg development rate in seven species of Collembola (Janion et al. 2010) show the prevalence of nonlinear RNs.

Furthermore, one of the most complete studies on RNs is the work of Khan and Bradshaw (1976), which reports the results on 54 RNs of six varieties of *Linum usitatissimum* to six different densities, and show exactly the same pattern: among nine traits, for two linear curves are prevalent (seed weight and plant height), whereas in the other seven traits almost all curves are nonlinear. It is worth noting that this feature and the complex nature of the RNs were pointed out by Khan and Bradshaw (1976): “There are very clear differences in the response of all the varieties. The most obvious difference is (. . .) a curious break in the response of all the linseed varieties from S2 to S3 not shown by any of the flax

varieties. This is a real effect (. . .).” Similar results are found in the work of Mal and Lovett-Doust (2005), which show the RNs of seven traits to four different water treatments, thus providing more evidence of a possible prevalence of nonlinear RNs in plants.

Hence, empirical data from a number of other studies which analyzed the RNs of different traits, species, and environmental variables, as well as our results, leave no doubt that the best answer to question (1) is that RNs are typically nonlinear curves.

NONLINEAR RNS AND THE TWO/THREE-POINT-CURVE EXPERIMENTAL DESIGN—PESSIMISTIC VIEW

The RNs of abdominal bristle number and viability of Gupta and Lewontin (1982) are the typical data supporting the pessimistic view: they show an almost random variation of RNs, where curves can have either the minimum or the maximum viability value in any of the three temperatures (14, 21, and 26°C). Such a scenario makes no sense if one tries to describe RN variation with linear models. Given the underlying RNs are probably nonlinear curves, part of this scenario nonsense can be attributed to the fact that with only three temperatures it is impossible to infer the general shape of each RN, thus removing evidence that a more complex model is necessary. The 40 three-point-curves derived from the 40 11-point RNs of *D. mediopunctata* provide evidence on this kind of artifact. In all five traits, RNs crossed each other more than once, making the rank order vary at the three temperatures, leading to Lewontin’s (1974) well-known pattern.

The two sets of curves lead to totally different scenarios as to the possibility of describing the shape of the RN curves, which is evident in Table 3. With 11 temperatures, for only one curve no response (PP) was detected, and more than 2/3 (28 in 40) of the polynomials could describe more than 80% of the phenotypic response as a function of the environment. In contrast, with only three temperatures, the description of the RNs was hindered: 12 of 40 RNs showed no PP; and only the RNs of one trait had $R^2 > 0.8$. Moreover, the mean R^2 for the linear regression for the 40 three-point curves was 38%, whereas for the best models adjusted to the full dataset was 83%. Thus, in describing RNs with more environments, we could uncover their nonlinearity, which points to the necessity of more complex models to describe their shape and variation. This led to an increase in the explanatory power of the RN models of 45%, which made the rank order changes (the most important feature of RNs according to the pessimistic view) a phenomenon resulting from the variation of parameters which can be estimated and used to understand and predict the $G \times E$.

NONLINEAR RNS AND THE TWO/THREE-POINT-CURVE EXPERIMENTAL DESIGN—THE OPTIMISTIC VIEW AS A FIRST STEP TOWARD RN DESCRIPTION

Contrary to the pessimistic view, the optimistic view starts from the assumption that RNs can actually be described by a linear

model. Even though this view ignores the nonlinearity of RNs, this approach can sometimes lead to interesting results. Such is the case of the work of Scheiner and Lyman (1991).

The indirect responses of their work revealed an intriguing pattern. Selection for mean thorax length at each temperature invariably produced indirect responses in the same direction (increasing or decreasing) at the other temperature. Yet, populations selected for larger thorax length at 19°C had an increase in plasticity; and the same held true for populations selected at 25°C in the opposite direction, that is, for smaller thorax length. Moreover, selection for higher plasticity led to decreased thorax length at 25°C, whereas for lower plasticity decreased (although non-significantly) thorax length at 19°C.

Given that the variation of mean values at a given temperature is part of the variation of RNs of different genotypes, it is clear that selection for mean value eventually selects also for RN. Thus, the difference between selecting solely the mean value or the plasticity of a trait would be whether the selection affects exclusively the elevation of the RN curve or not.

Figure 3 shows that, for each parameter variation, there would be different responses to the selection regimes of Scheiner and Lyman (1991). If only MV varies, selection for increased or decreased thorax length at either temperature would produce the same response at the other temperature, without changing the plasticity (Fig. 3A and B). If only g_2 varies, selection at 25°C would produce a direct response on mean value and an indirect response on plasticity, with plasticity increasing as the mean value at 25°C decreases; whereas at 19°C, there would be none or little direct and indirect response to selection (Fig. 3C and D). Finally, if only the TMV varies, the RN parabolas maintain the same curve shape, changing only the horizontal position (Fig. 3E and F). Thus, selection for increasing mean value at 19°C would lead to decreased mean value at 25°C, increasing plasticity; and selection for increasing mean value at 25°C would lead to decreased mean values at 19°C, thus decreasing plasticity.

These findings may explain part of the results of Scheiner and Lyman (1991): MV variation could account for the indirect responses between the mean values at each temperature, whereas TMV could be a cause of the indirect responses between plasticity and mean values. Moreover, a possible constraint to the increase of TMV would explain why the authors could not decrease plasticity below zero. Weber and Scheiner (1992) could map part of the different responses to different chromosomes of *D. melanogaster*, suggesting that parameters with independent genetic basis were changed, perhaps MV and TMV. However, without knowing the final RN shape for each population, it is not possible to know which parameters actually caused the responses in mean value and plasticity, because different combinations of parameters could produce similar results.

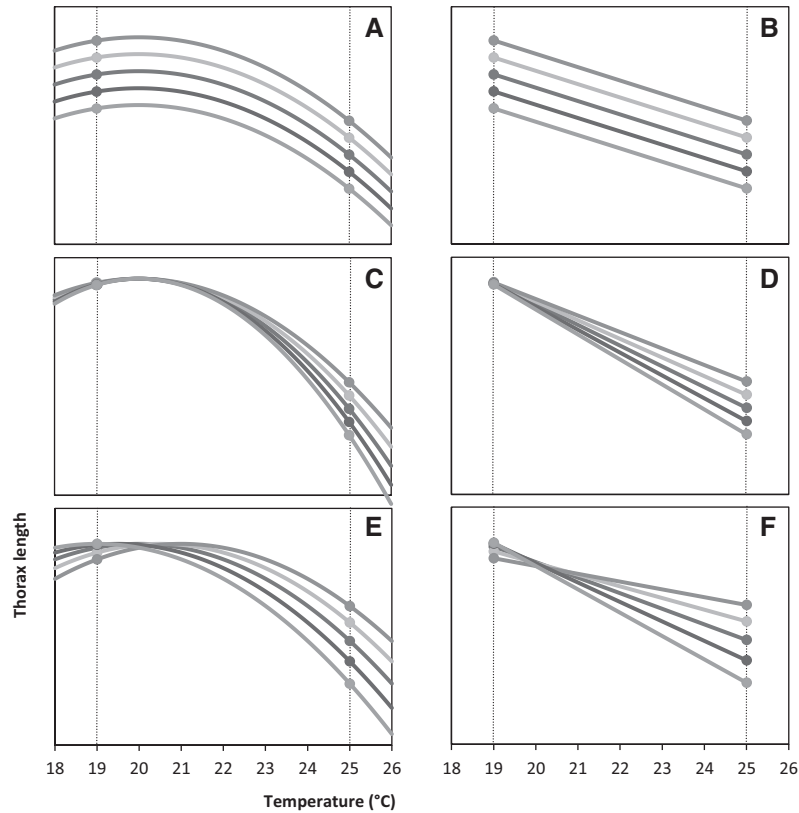


Figure 3. Mean reaction norm of thorax length of *D. melanogaster* females reported by Karan et al. (2000), varying separately for each parameter (left column), along with the deduced variation of the mean values at 19 and 25°C and of the slope between means (right column) for each curve. A and B: reaction norms with varying MV. C and D: reaction norms with varying g_2 . E and F: reaction norms with varying TMV.

NONLINEAR RNS AND THE TWO/THREE-POINT-CURVE EXPERIMENTAL DESIGN—THE OPTIMISTIC VIEW CAN BE MISLEADING

Liefting et al. (2009) have used the variation of RN slope along a latitudinal gradient to test the theoretical prediction that fitness traits would have more canalized RNs in more variable environments. Their test was grounded on the results of developmental rate RNs, which showed a pattern of RN variation that they claimed to be evidence favoring this hypothesis.

Liefting et al. (2009) were aware that the RNs of development time are typically nonlinear curves, making it difficult to use a linear model to measure plasticity. To deal with this issue, they transformed the development time into developmental rate. Nevertheless, this was not sufficient to completely make the RNs linear, as noticed by them: “yet the slopes of the lower part of the reaction norm were clearly steeper than the slopes from the upper part” (Liefting et al. 2009). Arguing that “. . . small deviations from linearity in reaction norms can have profound effects on overall performance,” they decided to split the RNs into two segments of two temperatures (16–22°C and 22–28°C), and analyzed the slope of each segment separately (Liefting et al. 2009).

The comparison of parabolic RNs of development time which varied separately for each parameter with the transformed RNs of developmental rate reveals that, along with the linearization, this procedure introduces an undesirable effect. This effect is most clearly illustrated by the RNs of development time which vary only at the elevation parameter (b_0) (Fig. 4A). Since b_1 and b_2 do not vary, the difference between curves is kept constant along the environmental axis, and there is no variation in plasticity. Figure 4B shows the effect of transforming these curves into developmental rate RNs: as development time increases toward lower temperatures (e.g., 15°C in Fig. 4A), the developmental rates of different RNs converge toward zero (Fig. 4B); conversely, as the development time decreases toward higher temperatures, the developmental rates diverge. Thus, RNs with different slopes were produced by the transformation of curves that were originally identical in their phenotypic responses.

These RNs show a similar variation pattern to that found by Liefting et al. (2009), suggesting that the result which supports their work may actually be an artifact. This is a very recent example of a problem which may result from the misunderstanding of the optimistic view: instead of trying to understand the actual RN shape and investigate how it varies, the authors preferred to

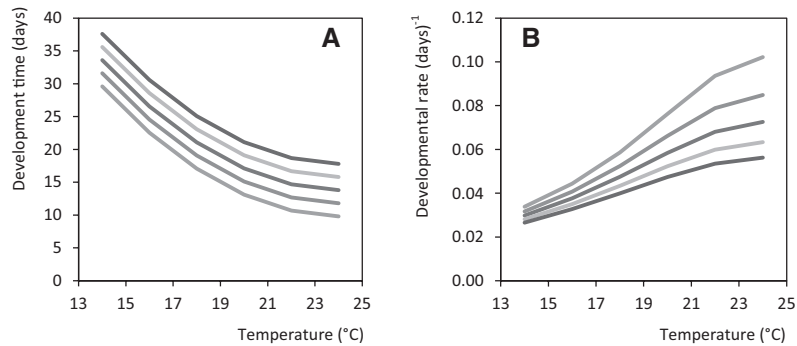


Figure 4. Effect of the transformation of development time into developmental rate on the plasticity of reaction norms: (A) mean reaction norm for the development time of *D. mediopunctata* with varying elevation (b_0) values and constant plasticity (b_1 and b_2); (B) developmental rate reaction norms resulting from the transformation of the curves shown in A, as developmental rate = (development time)⁻¹.

“force” the RN curve to adjust into the linear model, ultimately arriving at an unsupported conclusion.

DELINEATING A VIEW ON RNS, PP, AND GXE WHICH TAKES INTO ACCOUNT THE NONLINEARITY OF RNS

Given these findings, we claim that a third view on RNs, PP, and G×E which takes into account the nonlinearity of RNs should be adopted as a middle ground between the two extreme views. Such view would incorporate part of the complexity emphasized by the pessimistic view, including many aspects of nonlinear curves which have been ignored by the optimistic view, but following the same attitude as the optimistic view in attempting to describe RNs with models whose parameters can be used to describe their variation.

This view would not necessarily entail the use of highly complex models. Our results show that the quadratic function could satisfactorily explain more than half of the significant RNs: there were 24 RNs where the quadratic model had significant adjustments, including those where higher order polynomials were also significant. Moreover, quadratic polynomials accounted for the majority of the explanatory power gains which were conferred by the use of nonlinear models. The increment in R^2 values due to the increase in polynomial order can be partitioned among each polynomial degree. Thus, the improvement of fit due to quadratic polynomials represents 68% of the total increase in mean R^2 (see Table 2):

$$68\% = ([0.81 - 0.66]/[0.88 - 0.66]).$$

The middle column of Figure 2 demonstrates this effect, showing that parabolic functions adjusted to the 40 RNs could capture the general pattern of RN variation for all five traits. Therefore, given its generality and explanatory power, the parabolic curve seems to be a reasonable model for studies of RN variation aiming to account for the nonlinearity of RNs. Additionally, it can be described by the characteristic values proposed by David

et al. (1997), which summarize the parabolic RN properties in two positional parameters (MV and TMV) and one shape parameter (g_2) with straightforward interpretation. An inevitable question which emerges from such model concerns the plasticity measure in a parabolic RN. Although it is clear that MV variation affects only the mean value of the genotype and that g_2 variation directly affects the amount of change along the whole environmental axis, the variation in TMV produces a more complex scenario. RNs with varying TMVs keep the same curve shape but may or may not present the same total variation (difference between maximum and minimum value) depending on the environmental range.

The available data on nonlinear RNs allows a previous assessment of the patterns that may arise from such approach. An interesting pattern which our results and those from Prof. David’s group show is that each trait shows specific shape and variation of RNs, and the RNs of the same trait seem to keep the overall shape in different species (see David et al. 1997). Thus, there seems to be some level of developmental constraint to the variation of RN shape, an aspect mostly ignored by RN models. Nonlinear RNs introduce new features which are completely ignored by the linear model, such as the existence of a peak (or valley) in the RN curve. Moreover, our previous findings (Rocha et al. 2009) are strong evidence that the use of nonlinear curves may uncover new patterns which would be ignored with a linear perspective: if, instead of parabolas, we had adjusted linear curves to each RN, we would have found that the mean value of the trait was correlated with the curve elevation, the opposite conclusion to that work. Finally, while Scheiner and Lyman (1991) could successfully select what may be thought to be different parameters of the thorax RNs, our previous results strongly suggest that, for the number of abdominal dark spots of *D. mediopunctata*, the three parabolic parameters do not vary independently (Rocha et al. 2009). Hence, perhaps with nonlinear RNs, the controversy on the independence of the genetic basis of trait mean and plasticity (Via et al. 1995) may turn out to be of limited significance.

To investigate these questions, different strategies may be adopted both by modeling and experimental approaches. For model building, certainly the use of a parabolic model as a first approximation to nonlinearity would be profitable, allowing to verify whether different scenarios of evolution of RNs and PP come forth.

For experimental studies, the minimum number of points required to a significant polynomial adjustment will depend on the order of the polynomial, on the error of each mean phenotypic value for each environment (a function of sample size), on the underlying shape of the RN. Yet, for a significant parabolic adjustment, at least five different environments should be used, to cover the possible positions of the MV.

CAVEATS

In spite of the general pattern of RN shape we have shown, there are indeed RNs which are nearly linear curves and RNs which may be nonlinear but show linear response within a specific environmental range. In such cases, the linear model and the two/three-point-curve experimental design are undoubtedly appropriate. It could also be argued that nonlinear RNs may be made linear with the appropriate transformation. Yet, this would apply only for monotonically varying RNs which do not change the curvature sign among genotypes. In our case, this was only the case of development time, which, as we have shown, is usually transformed into developmental rate, creating an artifact. The question remains of what scales of environmental and phenotypic variables are relevant to each organism. Whereas we simply cannot answer it at present, we believe this question should not be a motivation for arbitrarily chosen transformations which, with the aim to coerce nature to models, may introduce more complication into the study of phenotypic determination and make the comparison among genotypes, traits, and species much more difficult.

On the other hand, there are, probably, RN curves which no model can describe. Facing these curves, the attitude of the pessimistic view is justifiable. Luckily, such curves seem to be very rare: here, one of 40 RNs could not be described by any polynomial. Furthermore, for both linear and nonlinear models, the description of the RNs of a given trait in response to more than one environmental variable will certainly introduce more complication into the study of $G \times E$.

Finally, we must recognize that the biological relevance of nonlinearity of RNs will depend directly on the distribution of environments that occur in nature, on the distribution of individuals in natural populations and on what is the relevant environmental range for each species: RNs are just part of the equation that determines whether a linear or nonlinear approach should be used. For instance, if only the extremes of RN curves are nonlinear, the biological importance of nonlinearity will depend on whether natural populations face these extreme environments. In the present

work, as in other studies (e.g., Karan et al. 2000), the position of the evidently nonlinear part of RNs depended on the trait: for the number of abdominal dark spots it was on the lower half of the temperature range, for development time it was on the upper half, and for the number of sternopleural bristles it was nearly the middle of the temperature range (Fig. 2, middle column). Moreover, we can confidently assume that *D. mediopunctata* natural populations actually face the temperature range we studied, as temperature measurements taken in different sites where *D. mediopunctata* individuals were collected varied between 8 and 26°C. Thus, the whole temperature range of our RNs is likely to be relevant to understand the determination of phenotypic variation in the field. Yet, this is not necessarily valid for other species, and RN studies should always consider these factors.

CONCLUDING REMARKS

Here, more than answering questions, we aimed to emphasize the urgent necessity of facing RN features and questions which have been ignored up to now, or not appreciated, and suggest that a possible manner of dealing with them is adopting a middle ground view on RN variation, considering slightly more complex models than the straight line.

Models aim at making simplifications of natural phenomena and patterns while capturing their essential features (Levins 1966). This is in conformity with Whitehead's view (1920) that "the aim of science is to seek the simplest explanations of complex facts." Certainly, the linear model was the first step of a research program on the genotype–environment determination of the phenotype. It enabled us to have a first glimpse of the $G \times E$ and to discover genes that act on different parameters of the RN, such as in Weber and Scheiner (1992).

However, as Whitehead (1920) foresaw, with its use "we are apt to fall into the error of thinking that the facts are simple because simplicity is the goal of our quest." In many cases, the linear model may have misled us (e.g., Liefting et al. 2009) to think that RN should be linear (or linearized) because the RN models were built upon this simplifying assumption; or we simply stopped short of exploring the consequences both empirical and theoretical of slightly more complex models. In this article, we urge that a relatively small extra effort should be made to assess this new level of complexity, again repeating Whitehead in his dictum: "seek simplicity and distrust it."

ACKNOWLEDGMENTS

We thank H. F. Medeiros for tips on building and maintaining the thermal gradient, D. H. D. Moraes for technical and collecting help; M. R. D. Batista and I. M. Ventura helped with collecting. L. Nascimento, Coordenador de Pesquisa do Parque Nacional do Itatiaia for collecting authorization and hospitality at the Park and Joel Bernardino for helping with the field work. We appreciate the technical help of M. S. Couto, C.

Couto, and K. A. de Carvalho. We are grateful to F. Boschiero and C. S. V. de Oliveira from Espaço da Escrita, CGU-Unicamp, who were in charge of reviewing the English version of the manuscript. H. Montenegro gave cogent suggestions to improve the manuscript. R. Bonduriansky and two anonymous referees gave us important suggestions on a previous version of the manuscript. We thank the financial support of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa (FAEP), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

LITERATURE CITED

- Andrade, C. A. C., L. M. Hatadani, and L. B. Klaczko. 2005. Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*: effect of the temperature. *J. Therm. Biol.* 30:518–523.
- Aubin-Horth, N., and S. C. P. Renn. 2009. Genomic reaction norms: using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity. *Mol. Ecol.* 18:3763–3780.
- Bernardo, U., P. A. Pedata, and G. Viggiani. 2007. Phenotypic plasticity of pigmentation and morphometric traits in *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). *Bull. Entomol. Res.* 97:101–109.
- Bitner-Mathé, B. C., and L. B. Klaczko. 1999. Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. *Genetica* 105:203–210.
- Byers, D. L. 2005. Evolution in heterogeneous environments and the potential of maintenance of genetic variation in traits of adaptive significance. *Genetica* 123:107–124.
- Cabanita, R., and D. Atkinson. 2006. Seasonal time constraints do not explain exceptions to the temperature size rule in ectotherms. *Oikos* 114:431–440.
- Chevin, L., R. Lande, and G. M. Mace. 2010. Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS Biol.* 8:e1000357.
- Coyne, J., and E. Beecham. 1987. Heritability of two morphological characters within and among natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117: 727–737.
- David, J. R., P. Capy, and J. P. Gauthier. 1990. Abdominal pigmentation and growth temperature in *Drosophila melanogaster*: similarities and differences in the norms of reaction of successive segments. *J. Evol. Biol.* 3:429–445.
- David, J. R., P. Gibert, E. Gravot, G. Pétavy, J. P. Morin, D. Karan, and B. Moreteau. 1997. Phenotypic plasticity and developmental temperature in *Drosophila*: analysis and significance of reaction norms of morphometrical traits. *J. Therm. Biol.* 22:441–451.
- David, J. R., P. Gibert, H. Legout, G. Pétavy, P. Capy, and B. Moreteau. 2005. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative traits analysis in natural populations. *Heredity* 94:3–12.
- de Jong, G. 1990. Quantitative genetics of reaction norms. *J. Evol. Biol.* 3:447–468.
- . 2005. Evolution of phenotypic plasticity: patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. *New Phytol.* 166:101–118.
- Delpuech, J. M., B. Moreteau, J. Chiche, E. Pla, J. Voudibio, and J. R. David. 1995. Phenotypic plasticity and reaction norms in temperate and tropical populations of *Drosophila melanogaster*. Ovarian size and developmental temperatures. *Evolution* 49:670–675.
- Elberse, I. A. M., T. K. Vanhala, J. H. B. Turin, J. M. M. Van Damme, and P. H. Van Tienderen. 2004. Quantitative trait loci affecting growth-related traits in wild barley (*Hordeum spontaneum*) grown under different levels of nutrient supply. *Heredity* 93:22–33.
- Ellers, J., and G. Driessen. 2011. Genetic correlation between temperature-induced plasticity of life-history traits in a soil arthropod. *Evol. Ecol.* 25:473–484.
- Fogleman, J. 1978. A thermal gradient bar for the study of *Drosophila*. *Dros. Inf. Serv.* 53:212–213.
- Fusco, G., and A. Minelli. 2010. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365:547–556.
- Gavrilets, S., and S. M. Scheiner. 1993. The genetics of phenotypic plasticity. V. Evolution of reaction norm shape. *J. Evol. Biol.* 6:31–48.
- Ghalambor, C. K., J. K. McKay, S. P. Carroll, and D. N. Reznick. 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct. Ecol.* 21:394–407.
- Gibert, P., and G. de Jong. 2001. Temperature dependence of development rate and adult size in *Drosophila* species: biophysical parameters. *J. Evol. Biol.* 14:267–276.
- Gibert, P., B. Moreteau, J. R. David, and S. M. Scheiner. 1998. Describing the evolution of reaction norm shape: body pigmentation in *Drosophila*. *Evolution* 52:1501–1506.
- Gibert, P., P. Capy, A. Imasheva, B. Moreteau, J. P. Morin, G. Petavy, and J. R. David. 2004. Comparative analysis of morphological traits among *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: genetic variability, clines and phenotypic plasticity. *Genetica* 120:165–179.
- Gibert, P., B. Moreteau, and J. R. David. 2009. Phenotypic plasticity of abdomen pigmentation in two geographic populations of *Drosophila melanogaster*: male–female comparison and sexual dimorphism. *Genetica* 135:403–413.
- Gottlieb, G. 2007. Probabilistic epigenesis. *Dev. Sci.* 10:1–11.
- Gupta, A. P., and R. C. Lewontin. 1982. A study of reaction norms in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution* 36:934–948.
- Gutteling, E. W., J. A. G. Riksen, J. Bakker, and J. E. Kammenga. 2007. Mapping phenotypic plasticity and genotype–environment interactions affecting life-history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Heredity* 98:28–37.
- Hatadani, L. M., J. C. R. Baptista, W. N. Souza, and L. B. Klaczko. 2004. Colour polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: genetic (chromosomal) analysis and nonrandom association with chromosome inversions. *Heredity* 93:525–534.
- Janion, C., H. P. Leinaas, J. S. Terblanche, and S. L. Chown. 2010. Trait means and reaction norms: the consequences of climate change/invasion interactions at the organism level. *Evol. Ecol.* 24:1365–1380.
- Karan, D., B. Moreteau, and J. R. David. 1999. Growth temperature and reaction norms of morphometrical traits in a tropical drosophilid: *Zaprionus indianus*. *Heredity* 83:398–407.
- Karan, D., J. P. Morin, P. Gibert, B. Moreteau, S. M. Scheiner, and J. R. David. 2000. The genetics of phenotypic plasticity. IX. Genetic architecture, temperature, and sex differences in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 54:1035–1040.
- Khan, M. A., and A. D. Bradshaw. 1976. Adaptation to heterogeneous environments. II Phenotypic plasticity in response to spacing in *Linum*. *Aust. J. Agric. Res.* 27:519–531.
- King, E. G., and D. A. Roff. 2010. Modeling the evolution of phenotypic plasticity in resource allocation in wing-dimorphic insects. *Am. Nat.* 175:702–716.
- Kingsolver, J. G., R. Gomulkiewicz, and P. A. Carter. 2001. Variation, selection and evolution of function-valued traits. *Genetica* 112–113:87–104.
- Kingsolver, J. G., G. J. Ragland, and J. G. Shlichta. 2004. Quantitative genetics of continuous reaction norms: thermal sensitivity of caterpillar growth rates. *Evolution* 58:1521–1529.
- Krafka, J. 1920. The effect of temperature upon facet number in the bar-eyed mutant of *Drosophila*. *J. Gen. Physiol.* 2:409–464.

- Lande, R. 2009. Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. *J. Evol. Biol.* 22: 1435–1144.
- Levins, R. 1966. The strategy of model building in population biology. *Am. Sci.* 54:421–431.
- Lewontin, R. C. 1974. Annotation: the analysis of variance and the analysis of causes. *Am. J. Hum. Genet.* 26:400–411.
- Liefting, M., A. A. Hoffmann, and J. Ellers. 2009. Plasticity versus environmental canalization: population differences in thermal responses along a latitudinal gradient in *Drosophila serrata*. *Evolution* 63:1954–1963.
- Mal, T. K., and J. Lovett-Doust. 2005. Phenotypic plasticity in vegetative and reproductive traits in an invasive weed, *Lythrum salicaria* (Lythraceae), in response to soil moisture. *Am. J. Bot.* 92:819–825.
- Moreteau, B., P. Gibert, J. M. Delpuech, G. Pétavy, and J. R. David. 2003. Phenotypic plasticity of sternopleural bristle number in temperate and tropical populations of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* 81: 25–32.
- Noach, E. J. K., G. de Jong, and W. Scharloo. 1997. Phenotypic plasticity of wings in selection lines of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 79:1–9.
- Nussey, D. H., A. J. Wilson, and J. E. Brommer. 2007. The evolutionary ecology of individual phenotypic plasticity in wild populations. *J. Evol. Biol.* 20:831–844.
- Pérez, A., and C. García. 2002. Evolutionary responses of *Drosophila melanogaster* to selection at different larval densities: changes in genetic variation, specialization and phenotypic plasticity. *J. Evol. Biol.* 15:524–536.
- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends Ecol. Evol.* 20:481–486.
- Reed, T. E., R. S. Waples, D. E. Schindler, J. J. Hard, and M. T. Kinnison. 2010. Phenotypic plasticity and population viability: the importance of environmental predictability. *Proc. R. Soc. B* 277:3391–3400.
- Rocha, F., H. F. Medeiros, and L. B. Klaczko. 2009. The reaction norm for abdominal pigmentation and its curve in *Drosophila mediopunctata* depend on the mean phenotypic value. *Evolution* 63:280–287.
- Scheiner, S. M. 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 24:35–68.
- Scheiner, S. M., and R. F. Lyman. 1991. The genetics of phenotypic plasticity. II. Response to selection. *J. Evol. Biol.* 4:23–50.
- Sokal, R. R., and F. J. Rohlf. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd ed. W. H. FREEMAN AND CO., New York.
- Thomas, R. H. 1993. Ecology of body size in *Drosophila buzzatii*: untangling the effects of temperature and nutrition. *Ecol. Entomol.* 18:84–90.
- Thomas, R. H., and J. S. E. Barker. 1993. Quantitative genetic analysis of the body size and shape of *Drosophila buzzatii*. *Theor. Appl. Genet.* 85:598–608.
- Vale, P. F., M. Stjernman, and T. J. Little. 2008. Temperature-dependent costs of parasitism and maintenance of polymorphism under genotype-by-environment interactions. *J. Evol. Biol.* 21:1418–1427.
- Via, S. 1993. Adaptive phenotypic plasticity: target or by-product of selection in a variable environment? *Am. Nat.* 142:352–365.
- Via, S., and R. Lande. 1985. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39:505–522.
- Via, S., R. Gomulkiewicz, G. De Jong, S. M. Scheiner, C. D. Schlichting, and P. H. Van Tienderen. 1995. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends Ecol. Evol.* 10:212–317.
- Weber, S. L., and S. M. Scheiner. 1992. The genetics of phenotypic plasticity. IV. Chromosomal localization. *J. Evol. Biol.* 5:109–120.
- Whitehead, A. N. 1920. The concept of NATURE. The Tarnier Lectures Delivered in Trinity College, November 1919. (1920) The Concept of Nature. Cambridge Univ. Press, Cambridge. Available at <http://www.gutenberg.org/files/18835/18835-h/18835-h.htm>.
- Windig, J. J. 1994. Genetic correlations and reaction norms in wing pattern of the tropical butterfly *Bicyclus anynana*. *Heredity* 73:459–470.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey.
- Zhang, X. 2006. The phenotypic variance within plastic traits under migration-mutation-selection balance. *Evolution* 60:1125–1136.

Associate Editor: R. Bonduriansky

Supporting Information

The following supporting information is available for this article:

Figure S1. Fogleman's apparatus used to produce the thermal gradient with 11 different temperatures to describe the reaction norms of *Drosophila mediopunctata*.

Table S1. Mean R^2 values of different polynomial degrees adjusted to the reaction norms of five traits of eight strains of *Drosophila mediopunctata*.

Table S2. Results of the analysis of reaction norm shape of the 40 reaction norms with 11 temperatures: polynomial degree with best significant fit, R^2 , and F resulting from the analysis of each reaction norm curve.

Table S3. R^2 values resulting from the linear polynomial adjustment for each of the 40 three temperature reaction norms, per trait and strain.

Supporting Information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Apêndice do Trabalho: Rocha, F.B. & L.B. Klaczko. 2012. Connecting The Dots Of Nonlinear Reaction Norms Unravels The Threads Of Genotype-Environment Interaction In *Drosophila*. *Evolution* 66: 3404–3416.

Material suplementar

As tabelas e a figura apresentadas a seguir estão publicadas *online* no *site* do periódico *Evolution*

(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1558-5646.2012.01702.x/supinfo>). Elas

apresentam informações complementares, descritas a seguir por suas legendas:

Supplementary Figure



Figure S1. Fogleman's apparatus used to produce the thermal gradient with eleven different temperatures to describe the reaction norms of *Drosophila mediopunctata*.

Supplementary Tables

Table S1. Mean R² values of different polynomial degrees adjusted to the reaction norms of five traits of eight strains of *Drosophila mediopunctata*.

Trait	Strain	R ²			
		Linear	Quadratic	Cubic	Quartic
Thorax length	O	0,47	0,82	0,85	0,85
	D	0,71	0,90	0,97	0,98
	T	0,78	0,81	0,90	0,91
	G	0,60	0,74	0,74	0,75
	H	0,74	0,75	0,87	0,96
	I	0,28	0,67	0,75	0,76
	X	0,85	0,87	0,88	0,88
	Z	0,56	0,68	0,73	0,77
	Mean	0,62	0,78	0,84	0,86
Development time	O	0,93	0,98	0,98	0,99
	D	0,93	0,99	0,99	0,99
	T	0,93	0,99	1,00	1,00
	G	0,86	0,95	0,95	0,95
	H	0,90	0,95	0,95	0,96
	I	0,89	0,99	0,99	0,99
	X	0,94	0,98	0,99	0,99
	Z	0,90	0,99	1,00	1,00
	Mean	0,91	0,98	0,98	0,98
number of sternopleural bristles	O	0,75	0,83	0,91	0,93
	D	0,66	0,79	0,80	0,94
	T	0,45	0,80	0,91	0,91
	G	0,86	0,87	0,91	0,92
	H	0,65	0,76	0,80	0,92
	I	0,43	0,81	0,84	0,86
	X	0,67	0,74	0,77	0,77
	Z	0,49	0,77	0,77	0,78
	Mean	0,62	0,79	0,84	0,88
number of arisal branches	O	0,02	0,18	0,20	0,40
	D	0,05	0,46	0,55	0,68
	T	0,65	0,68	0,73	0,91
	G	0,02	0,49	0,67	0,72
	H	0,02	0,60	0,71	0,72
	I	0,76	0,76	0,78	0,79
	X	0,75	0,81	0,81	0,85
	Z	0,00	0,58	0,59	0,69
	Mean	0,28	0,57	0,63	0,72
number of abdominal spots	O	0,91	0,92	0,93	0,93
	D	0,93	0,97	0,97	0,97
	T	0,84	0,90	0,90	0,90
	G	0,94	0,98	0,98	0,98
	H	0,97	0,98	0,98	0,99
	I	0,39	0,68	0,84	0,92
	X	0,88	0,93	0,94	0,94
	Z	0,92	0,95	0,97	0,98
	Mean	0,85	0,92	0,94	0,95
Overall mean		0,66	0,81	0,85	0,88

Table S2. Results of the analysis of reaction norm shape of the 40 reaction norms with eleven temperatures: polynomial degree with best significant fit, R² and F resulting from the analysis of each reaction norm curve.

Strain	Thorax length			Development time			Sternopleural bristle no.			Aristal branches no.			Abdominal spots no.		
	Degree	R ²	F	Degree	R ²	F	Degree	R ²	F	Degree	R ²	F	Degree	R ²	F
O	second	0,82	15,26**	second	0,98	27,68**	third	0,91	7,18*	no-fit	0,02	1,66	linear	0,91	1,63
D	third	0,97	15,92**	second	0,99	92,61**	fourth	0,94	13,54*	second	0,46	6,06*	second	0,97	9,64*
T	third	0,90	6,89*	third	0,99	9,41*	third	0,91	8,265*	fourth	0,91	12,18*	linear	0,84	5,08
G	linear	0,60	4,42	second	0,95	14,27**	linear	0,86	0,18	second	0,49	7,46*	second	0,98	15,57**
H	fourth	0,96	14,57**	second	0,95	7,49*	fourth	0,92	9,15*	second	0,60	11,38**	second	0,98	8,72*
I	second	0,67	9,38*	second	0,99	52,88**	second	0,81	15,77**	linear	0,76	0,22	fourth	0,92	6,82*
X	linear	0,85	1,36	second	0,98	19,26**	linear	0,67	2,03	linear	0,75	2,48	second	0,93	6,05*
Z	linear	0,56	3,10	third	0,99	22,02**	second	0,77	9,84*	second	0,58	10,92*	third	0,97	6,59*

* p < 0,05; ** p < 0,01

Table S3. R² values resulting from the linear polynomial adjustment for each of the 40 three temperature reaction norms, per trait and strain.

Strain	Thorax length	Development time	Sternopleural bristle no.	Aristal branches no.	Abdominal spots no.
T	0,18	0,85	0,02	0,08	0,56
I	0,01	0,82	0,30	0,23	0,67
D	0,06	0,87	0,10	0,07	0,70
O	0,04	0,87	0,53	0,01	0,68
X	0,18	0,92	0,48	0,23	0,41
Z	0,02	0,90	0,39	0,01	0,63
H	0,03	0,82	0,38	0,03	0,53
G	0,13	0,89	0,18	0,02	0,57

Values in **bold** are significant at the 5% level.

CONCLUSÕES GERAIS

Base genética da plasticidade fenotípica

A plasticidade fenotípica (curvatura da norma de reação) e o valor fenotípico médio de diferentes genótipos estão correlacionados, no caso do número de pintas nos tergitos abdominais de *Drosophila mediopunctata*. Esse resultado sugere a existência de uma regra de variação das normas de reação, em que a forma dessas é função do número médio de pintas que a estirpe apresenta: à medida que o número médio de pintas condicionado pelo genótipo aumenta, a norma de reação deixa de ser uma parábola côncava, se aproxima de uma resposta linear, até inverter sua curvatura e apresentar a forma de uma parábola convexa. Tal regra, até onde sabemos, não havia sido descrita anteriormente para qualquer outro conjunto de normas de reação. Esse padrão de variação é forte evidência de que, nesse caso, o modelo pleiotrópico é o mais adequado para explicar a base genética da plasticidade e do valor médio. O consenso que se estabeleceu em torno da independência genética entre plasticidade e valor médio, entretanto, remonta a uma conjectura apresentada por Bradshaw (1965). Tal conjectura foi elevada, em alguns casos, à condição de axioma, de tal forma que resultados muito semelhantes aos resultados descritos nesse trabalho não levaram à contestação do modelo que previa bases genéticas independentes para plasticidade e valor médio, mesmo apresentando evidências claras contra tal modelo.

Interação genótipo-ambiente e descrição das normas de reação

Neste trabalho, verificamos, para um conjunto de 40 normas de reação de *D. mediopunctata* analisadas de forma compreensiva e detalhada, que: *i*) normas de reação lineares são uma exceção; *ii*) o padrão típico dessas normas de reação é não-linear; e *iii*) a

hipótese de que tal padrão seja geral é fortemente sustentada por vários resultados disponíveis na literatura que permitem discernir curvas não lineares. Portanto, os resultados reunidos nesse trabalho evidenciam que, no momento, não há motivos para admitir que o padrão geral de forma das normas de reação seja linear. Ao contrário, um conjunto consistente de evidências aponta para a não-linearidade geral das normas de reação de diferentes táxons, caracteres e em resposta a diferentes ambientes, ainda que apresente vieses em relação a essas variáveis.

As consequências desse resultado se manifestam, de forma mais clara, nas conclusões obtidas através do modelo linear e de um desenho experimental baseado nesse modelo. Estudos que utilizam dois ou três ambientes para descrever normas de reação encontram frequentemente curvas cuja forma e variação são incompreensíveis e que podem ser artefatos produzidos pelo uso de um desenho experimental simplista para analisar curvas complexas. Por outro lado, estudos que usam o modelo linear sem considerar a forma real das normas de reação, no mínimo, podem não ser capazes de diferenciar casos em que o modelo linear é uma aproximação suficiente daqueles em que os fenômenos observados são capturados apenas por parâmetros não-lineares. Em casos mais críticos, tais estudos podem simplesmente chegar a conclusões falsas.

Assim, verificamos que as conjecturas sobre a independência genética entre plasticidade fenotípica e valor médio do caráter, a linearidade das normas de reação e a impossibilidade de sua descrição podem, em maior ou menor grau, ser falsas. Nos três casos, porém, a possibilidade de refutação dessas conjecturas tem sido anulada pelo fato de que elas têm sido frequentemente tomadas por axiomas, deixando sua validade fora de questão.

PERSPECTIVAS

A inadequação do modelo linear aponta para a necessidade de criação de uma nova perspectiva sobre as normas de reação, que não ignore sua complexidade, mas que não desista de descrever tal complexidade com modelos acessíveis. Logo, torna-se necessário o uso de um modelo não linear para descrever a forma das normas de reação. Uma vez que tal estratégia é adotada, como se pode verificar por este trabalho e aqueles do grupo do Prof. J. David (e.g. David *et al.* 2005), os parâmetros obtidos podem ser usados para tentar descrever a variação entre normas de reação de uma forma compreensível.

Nossos resultados sugerem que o incremento em apenas um grau de complexidade no modelo utilizado (de linear para quadrático) pode ser suficiente para capturar grande parte da variação das normas de reação, acrescentando um parâmetro que pode abranger dimensões de variação que não são percebidas pelo modelo linear. Para descrever curvas desse tipo, o desenho amostral deveria incluir o teste de cada genótipo no maior número possível de ambientes, considerando um mínimo de cinco ambientes como um desenho experimental que permita ao menos a percepção visual da não-linearidade.

A obtenção de um padrão de variação claro e compreensível de normas de reação para o número de pintas no abdômen de *D. mediopunctata* aponta para a possibilidade de se obterem padrões semelhantes para diferentes caracteres. Entretanto, é provável que a complexidade da variação das normas de reação de um caráter esteja relacionada à sua base genética. Assim, o fato de se poder resumir a variação das normas de reação do número de pintas através de um parâmetro (curvatura) pode sinalizar para uma base genética mais simples, da mesma forma que o agrupamento das curvas dos genótipos homocigotos em dois tipos (côncava, ou convexa). Esclarecer essa relação requer que se conheça a base

genética do caráter e que uma estratégia experimental semelhante – a descrição da variação de normas de reação de genótipos com valores médios contrastantes – seja utilizada para outros caracteres com base genética provavelmente mais complexa como, por exemplo, tamanho.

Restrições impostas pelo desenvolvimento e otimização fenotípica

Cada um dos cinco caracteres analisados teve formas e padrões de variação das normas de reação específicos, que não mostram sobreposição entre si. Esse padrão poderia ser interpretado como um resultado que reforça a conjectura da otimização das normas de reação, em consequência da atuação seleção natural no sentido de ajustar as normas de reação de cada caráter para produzir fenótipos ótimos em cada temperatura. Porém, outra interpretação possível é entender essa especificidade de forma e variação como sinal de limites impostos pelos processos de desenvolvimento à variação de cada característica.

O trabalho de Delpuech *et al.* (1995), comparando as normas de reação do número de ovariolos de populações de *D. melanogaster* do Congo e da França, pode ser utilizado para tentar distinguir entre essas duas possibilidades. Para eliminar a alta correlação entre parâmetros estimados por regressões polinomiais sobre as normas de reação observadas, Delpuech *et al.* (1995) utilizaram a transformação dos parâmetros polinomiais em três valores característicos de uma parábola: a temperatura onde ocorre o valor máximo (TMV); o valor fenotípico em TMV (MV) e a curvatura (g_2). A expectativa dos autores, diante da diferença de temperaturas médias entre as populações analisadas, era de que a TMV das populações congoleesas seria maior que a TMV da população francesa, deslocando o pico (fenótipo ótimo) da norma de reação em direção à temperatura média mais alta enfrentada por aquelas populações. Entretanto, os dados obtidos por Delpuech *et al.* (1995) não se

comportaram de acordo com essa expectativa: a TMV não variou significativamente entre populações. Em contraste, as populações da África tiveram normas de reação com elevação muito menor que a população francesa, apresentando uma diferença altamente significativa de valores máximos (MV). Esses resultados, contrários à expectativa da otimização, talvez sinalizem um papel relevante das limitações impostas pelo desenvolvimento. Porém, diante desses resultados, os autores buscaram em supostas interações com outros caracteres a explicação para esse resultado (Delpuech *et al.*, 1995), numa atitude coerente com o programa adaptacionista, criticado por Gould & Lewontin (1979) por ignorar os limites de desenvolvimento.

Genética de desenvolvimento da plasticidade fenotípica

A pigmentação em insetos tem uma base molecular relativamente simples, com três pigmentos produzidos por um conjunto delimitado de enzimas, algumas das quais mapeadas para genes conhecidos em *Drosophila* (Wittkopp & Beldade, 2009). Tal conhecimento favoreceu que um dos campos mais frutíferos para a compreensão da genética do desenvolvimento de caracteres morfológicos seja formado por estudos que investigam os padrões de pigmentação em *Drosophila*. Tais estudos já produziram, para mais de um caso, uma caracterização detalhada das alterações que ocorreram nos mecanismos de desenvolvimento da pigmentação para o surgimento de diferenças interespecíficas (Gompel *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2010) e intraespecíficas (Rebeiz *et al.*, 2009; Takahashi & Takano-Shimizu, 2011; Cooley *et al.*, 2012). Dessa forma, as análises e métodos da biologia evolutiva do desenvolvimento podem servir para a compreensão da base genética/molecular das normas de reação e sua relação com padrões de variação como os que foram aqui relatados para a pigmentação de *D. mediopunctata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, G.E. 1969. Hugo De Vries and the Reception of the "Mutation Theory". *Journal of the History of Biology* 2: 55-87.
- Ananina, G., A.A. Peixoto, B.C. Bitner-Mathé, W.N. Souza, L.B. da Silva, V.L.S. Valente and L.B. Klaczko. 2004. Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: seasonal, altitudinal, and latitudinal variation. *Genetics and Molecular Biology* 27: 61-69.
- Ananina, G., A.A. Peixoto, W.N. Souza, & L.B. Klaczko. 2002. Polytene Chromosome Map and Inversion Polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 97(5): 691-694.
- Arthur, W. 2011. *Evolution: a Developmental Approach*. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Aubin-Horth, N. & S.C.P. Renn. 2009. Genomic reaction norms: using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity. *Molecular Ecology* 18: 3763-3780.
- Baldwin, J.M. 1896. A new factor in evolution. *American Naturalist* 30: 441–451, 536–553.
- Bitner-Mathé, B.C. & L.B. Klaczko. 1999. Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. *Genetica* 105: 203-210.
- Bitner-Mathé, B.C., A.A. Peixoto, & L.B. Klaczko. 1995. Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. *Heredity* 75: 54-61.
- Bradshaw, A. D., 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics* 13: 115-155.
- Buss, L.W. 1987. *The Evolution of Individuality*. Princeton: Princeton Univ. Press.
- Carroll, S.B. 2005. *Endless forms most beautiful : the new science of evo devo and the making of the animal kingdom*. New York, NY: W. W. Norton & Company.
- Carroll, S.B. 2008. Evo-Devo and an Expanding Evolutionary Synthesis: A Genetic Theory of Morphological Evolution. *Cell* 134: 25-36.
- Chevin, L. & R. Lande. 2009. When do adaptive plasticity and genetic evolution prevent extinction of a density-regulated population? *Evolution* 64: 1143–1150.
- Chevin, L., R. Lande & G.M. Mace. 2010. Adaptation, Plasticity, and Extinction in a Changing Environment: Towards a Predictive Theory. *PLoS Biol* 8(4): e1000357.
- Cooley, A.M., L. Shefner, W.N. McLaughlin, E.E. Stewart & P.J. Wittkopp. 2012. The ontogeny of color: developmental origins of divergent pigmentation in *Drosophila americana* and *D. novamexicana*. *Evolution and Development* 14: 317-325.

- Coquillard, P., A. Muzy & F. Diener. 2012. Optimal phenotypic plasticity in a stochastic environment minimises the cost/benefit ratio. *Ecological Modelling* 242: 28–36.
- Coyne, J & E. Beecham. 1987. Heritability of two morphological characters within and among natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117: 727-737.
- Crispo, E. 2007. The Baldwin effect and genetic assimilation: revisiting two mechanisms of evolutionary change mediated by phenotypic plasticity. *Evolution* 61: 2469–2479.
- Darwin, C. 1872. *The origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. London: John Murray. 6th ed.
- David, J. R., P. Gibert, E. Gravot, G. Pétavy, J. P. Morin, D. Karan & B. Moreteau. 1997. Phenotypic plasticity and developmental temperature in *Drosophila*: analysis and significance of reaction norms of morphometrical traits. *Journal of Thermal Biology* 22:441-451.
- Davis, A.K., B.D. Farrey & S. Altizer. 2005. Variation in thermally induced melanism in monarch butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) from three North American populations. *Journal of Thermal Biology* 30:410–421.
- de Jong, G. 1990. Quantitative genetics of reaction norms. *Journal of Evolutionary Biology* 3: 447-468.
- de Jong, G. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. *New Phytologist* 166:101-118.
- de Jong, J. & R.H. Crozier. 2003. A flexible theory of evolution. *Nature* 424: 16-17.
- Delpuech J. M., B. Moreteau, J. Chiche, E. Pla, J. Voudibio & J. R. David. 1995. Phenotypic plasticity and reaction norms in temperate and tropical populations of *Drosophila melanogaster*. Ovarian size and developmental temperatures. *Evolution* 49:670-675.
- DeWitt, T.J. & S.M. Scheiner. 2004. *Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches*. New York: Oxford University Press.
- Diamond, S.E. & J.G. Kingsolver. 2010. Environmental Dependence of Thermal Reaction Norms: Host Plant Quality Can Reverse the Temperature-Size Rule. *American Naturalist* 175: 1–10.
- Dobzhansky, T. & B. Spassky. 1944. Genetics of natural populations. Xi. Manifestation of genetic variants in *Drosophila pseudoobscura* in different environments. *Genetics* 29: 270-290.
- Dobzhansky, T. 1951. *Genetics and the Origin of Species*. New York: Columbia University Press.
- Elberse, I.A.M., T.K. Vanhala, J.H.B. Turin, J.M.M. Van Damme & P.H. Van Tienderen. 2004. Quantitative trait loci affecting growth-related traits in wild barley (*Hordeum spontaneum*) grown under different levels of nutrient supply. *Heredity* 93:22–33.
- Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. Fourth Edition. Longman Group Ltd. Edinburgh Gate, Harlow.

- Falk, R. 1999. Can the Norm of Reaction Save the Gene Concept?, in R. Singh, C. Krimbas, D. B. Paul and J. Beatty (eds.), *Thinking About Evolution: Historical, Philosophical and Political Perspectives*, Cambridge University Press, New York.
- Fisher, R.A. 1918. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 52:399–433.
- Fisher, R.A. & W.A. Mackenzie. 1923. Studies in Crop Variation. II. The manurial response of different varieties of Potato. *Journal Agricultural Science* 13: 311–320.
- Frota-Pessoa, O. 1954. Revision of the tripunctata group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). *Arquivos do Museu Paranaense* 10: 253-304.
- Ghalambor C. K., J. K. McKay, S. P. Carroll & D. N. Reznick. 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology* 21: 394–407.
- Gibert, P., B. Moreteau, J. R. David & S. M. Scheiner. 1998. Describing the evolution of reaction norm shape: body pigmentation in *Drosophila*. *Evolution*. 52: 1501-1506.
- Gilbert, S.F. 2010. *Developmental Biology*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Gilbert, S.F. & D. Epel. 2009. *Ecological Developmental Biology and Epigenesis: an Integrated Approach to Embryology, Evolution, and Medicine*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Gompel, N., B. Prud'homme, P. J. Wittkopp, V. A. Kassner & S.B. Carroll. 2005. Chance caught on the wing: cis-regulatory evolution and the origin of pigment patterns in *Drosophila*. *Nature* 433: 481–487.
- Gomulkiewicz R and M. Kirkpatrick. 1992. Quantitative genetics and the evolution of reaction norms. *Evolution* 46: 390-411.
- Gordon, K.L. & I. Ruvinsky. 2012. Tempo and Mode in Evolution of Transcriptional Regulation. *PLoS Genetics* 8(1): e1002432. doi:10.1371/journal.pgen.1002432.
- Gottlieb, G. 2003. On Making Behavioral Genetics Truly Developmental. *Human Development* 46: 337-355.
- Gottlieb, G. 2007. Probabilistic epigenesis. *Developmental Science* 10:1–11.
- Gould, S.J. & Lewontin, R.C. 1979. The spandrels of San Marco and the panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proceedings of the Royal Society London B* 205: 581–598.
- Gravilets, S. & S.M. Scheiner. 1993. The genetics of phenotypic plasticity. V. Evolution of reaction norm shape. *Journal of Evolutionary Biology* 6: 31-48.
- Gupta, A. P. & Lewontin. R. C. 1982. A study of reaction norms in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution* 36: 934–948.

- Gutteling, E. W., J. A. G. Riksen, J. Bakker, & J. E. Kammenga. 2007. Mapping phenotypic plasticity and genotype-environment interactions affecting life-history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Heredity* 98: 28–37.
- Harrison, P.W., A.E. Wright & J.E. Mank. 2012. The evolution of gene expression and the transcriptome-phenotype relationship. *Seminars In Cell & Developmental Biology* 23: 222-229.
- Hartl, D.L. & A.G. Clark. 2006. *Principles of Population Genetics*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Hassall, M., A. Helden, A. Goldson, & A. Grant. 2005. Ecotypic differentiation and phenotypic plasticity in reproductive traits of *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidea). *Oecologia* 143: 51–60.
- Hatadani, L.M., J.C.R. Baptista, W.N. Souza, & L.B. Klaczko. 2004. Colour polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: genetic (chromosomal) analysis and nonrandom association with chromosome inversions. *Heredity* 93: 525-534.
- Izem R. and Kingsolver, J.G. 2005. Variation in Continuous Reaction Norms: Quantifying Directions of Biological Interest. *American Naturalist* 166: 277–289.
- J. Van Buskirk & R.A. Relyea. 1998. Selection for phenotypic plasticity in *Rana sylvatica* tadpoles. *Biological Journal of the Linnean Society* 65: 301–328.
- Kawecki T., & S.C. Stearns. 1993. The evolution of life histories in spatially heterogeneous environments: optimal reaction norms revisited. *Evolutionary Ecology* 7: 155–174.
- Khan, M.A. & A.D. Bradshaw. 1976. Adaptation to Heterogeneous Environments. II Phenotypic Plasticity in Response to Spacing in *Linum*. *Australian Journal of Agricultural Research* 27: 519-31
- King, E.G. & D.A. Roff. 2010. Modeling the Evolution of Phenotypic Plasticity in Resource Allocation in Wing-Dimorphic Insects. *American Naturalist* 175: 702–716.
- Kingsolver, J.G., G.J. Ragland & J.G. Shlichta. 2004. Quantitative genetics of continuous reaction norms: thermal sensitivity of caterpillar growth rates. *Evolution*. 58: 1521–1529.
- Kingsolver, J.G., R. Gomulkiewicz & P.A. Carter. 2001. Variation, selection and evolution of function-valued traits. *Genetica* 112–113: 87–104.
- Klaczko, L.B. 2006. Evolutionary Genetics of *Drosophila mediopunctata*. *Genetica* 126: 43–55.
- Krafka, J. 1920. The effect of temperature upon facet number in the Bar-eyed mutant of *Drosophila*. *Journal of General Physiology* 2: 409–464.
- Lande, R. 1982. A quantitative genetic theory of life-history evolution. *Ecology* 63: 607-615.

- Lande, R. 1987. Appendix of: Coyne, J & Beecham, E. 1987. Heritability of two morphological characters within and among natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117: 727-737.
- Lande, R. 2009. Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 1435–144.
- Levit G.S., U. Hossfeld & L. Olsson. 2006. From the “Modern Synthesis” to Cybernetics: Ivan Ivanovich Schmalhausen (1884–1963) and his research program for a synthesis of evolutionary and developmental biology. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)* 306B: 89–106
- Lewontin, R.C. 1974a. *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. New York: Columbia University Press.
- Lewontin, R. C. 1974b. Annotation: The Analysis of Variance and the Analysis of Causes. *American Journal of Human Genetics* 26: 400-411.
- Liefting, M., & J. Ellers. 2008. Habitat-specific differences in thermal plasticity in natural populations of a soil arthropod. *Biological Journal of the Linnean Society* 94: 265–271.
- Liefting, M., Hoffmann, A. A. & Ellers, J. 2009. Plasticity versus environmental canalization: population differences in thermal responses along a latitudinal gradient in *Drosophila serrata*. *Evolution* 63: 1954-1963.
- Lynch, M & B. Walsh. 1998. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sunderland, Mass.: Sinauer.
- M.C. King & A.C. Wilson. 1975. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* 188: 107–116.
- Blumberg, M.S., J.H. Freeman & S.R. Robinson. 2010. *Handbook of Behavioral and Comparative Neuroscience: Epigenetics, Evolution, and Behavior*. New York: Oxford University Press.
- Maynard Smith, J. 1978. Optimization Theory in Evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* 9: 31-56.
- Maynard Smith, J. 1982. *Evolution and the Theory Of Games*. New York: Cambridge University Press.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Morris, S.W. 1994. Fleeming Jenkin and "The Origin of Species": A Reassessment. *The British Journal for the History of Science* 27: 313-343.
- Nijhout, H.F. 1990. Metaphors and the role of genes in development. *Bioessays* 12: 441-46.
- Noach, E.J.K., G. de Jong, & W. Scharloo. 1997. Phenotypic plasticity of wings in selection lines of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 79: 1-9.

- Nussey, D. H., A.J.Wilson & J.E.Brommer. 2007. The evolutionary ecology of individual phenotypic plasticity in wild populations. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 831–844.
- Olby, R.C. & C. Darwin. 1963. Charles Darwin's Manuscript of Pangenesis. *The British Journal for the History of Science* 1: 251-263.
- Parker, G.A. & J. Maynard Smith. 1990. Optimality theory in evolutionary biology. *Nature* 348: 27–33.
- Peixoto, A.A. & L.B. Klaczko. 1991. Linkage disequilibrium of chromosomal inversion polymorphisms of *Drosophila*. *Genetics* 129: 773-777.
- Pérez, A. & C. García. 2002. Evolutionary responses of *Drosophila melanogaster* to selection at different larval densities: changes in genetic variation, specialization and phenotypic plasticity. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 524–536.
- Pigliucci, M. 2001. Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution* 20: 481–486.
- Pigliucci, M. & C.J. Murren. 2003. Genetic assimilation and a possible evolutionary paradox: can macroevolution sometimes be so fast as to pass us by? *Evolution* 57: 1455-1464.
- Pigliucci, M., C.J. Murren & C.D. Schlichting. 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *The Journal of Experimental Biology* 209: 2362-2367.
- Popper, K. 1963. *Conjectures and Refutations: The Growth of Scientific Knowledge*. New York: Harper Torchbooks.
- Provine W.B. 1971. *The Origins of Theoretical Population Genetics*. Chicago: University of Chicago Press.
- Prud'homme, B., N. Gompel & S.B. Carroll. 2007. Emerging principles of regulatory evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 8605–8612.
- Ragland, G. J., E.J. G. Kingsolver. 2007. Influence of seasonal timing on thermal ecology and thermal reaction norm evolution in *Wyeomyia smithi*. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 2144-2153.
- Rebeiz, M., J.E. Pool, V.A. Kassner, C.F. Aquadro & S.B. Carroll. 2009. Stepwise modification of a modular enhancer underlies adaptation in a *Drosophila* population. *Science* 326: 1663–1667.
- Sarkar, S. 1999. From the Reaktionsnorm to the Adaptive Norm: The Norm of Reaction, 1909–1960. *Biology and Philosophy* 14: 235–252.
- Scheiner, S. M. 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 35–68.

- Schlichting C. & M. Pigliucci. 1998. Phenotypic evolution: a reaction norm perspective. Sunderland, MA: Sinauer.
- Schmalhausen, I. I. 1949. Factors of evolution. Blakiston. Philadelphia, PA.
- Simpson, G. G. 1953. The Baldwin effect. *Evolution* 7:110–117.
- Stillwell, R.C. & C.W. Fox. 2005. Complex patterns of phenotypic plasticity: interactive effects of temperature during rearing and oviposition. *Ecology* 86: 924–934.
- Stinchcombe J.R., L.A. Dorn & J. Schmitt. 2004. Flowering time plasticity in *Arabidopsis thaliana*: a reanalysis of Westerman and Lawrence (1970). *Journal of Evolutionary Biology* 17: 197–207.
- Tabery, J. 2008. R. A. Fisher, Lancelot Hogben, and the Origin(s) of Genotype-Environment Interaction. *Journal of the History of Biology* 41: 717-761.
- Takahashi, A, & T. Takano-Shimizu. 2011. Divergent enhancer haplotype of ebony on inversion In(3R)Payne associated with pigmentation variation in a tropical population of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology* 20: 4277–4287.
- Thomas, R.H. & J.S.E. Barker. 1993. Quantitative genetic analysis of the body size and shape of *Drosophila buzzatii*. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 598-608.
- van Tienderen, P.H. 1997. Generalists, specialists, and the evolution of phenotypic plasticity in sympatric populations of distinct species. *Evolution* 51: 1372–1380.
- Via, S. & R. Lande. 1985. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39: 505–522.
- Via, S., R. Gomulkiewicz, G. De Jong, S.M. Scheiner, C.D. Schlichting & P.H. Van Tienderen. 1995. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends in Ecology and Evolution* 10:212-317.
- Waddington, C.H. 1942. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 150: 563-565.
- Waddington, C.H. 1953. Genetic Assimilation of an Acquired Character. *Evolution* 7: 118-126.
- Waddington. C.H. 1975. *The Evolution of an Evolutionist*. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York.
- Weismann, A. 1893. *The Germ-Plasm: A Theory of Heredity*. Translated by W. Newton Parker & H. Rönfeldt. London and New York: Walter Scott and Scribner's. (citado por Buss, 1987).
- Werner T., S. Koshikawa, T.M. Williams & S.B. Carroll. 2010. Generation of a novel wing colour pattern by the Wingless morphogen. *Nature* 464: 1143-1148.
- West-Eberhard MJ. 2003. *Developmental plasticity and evolution*. Oxford: Oxford University Press.

Wittkopp, P.J. & P. Beldade. 2009. Development and evolution of insect pigmentation: Genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20: 65–71.

Woltereck, R. 1909. Weitere experimentelle Untersuchungen über Artveränderung, speziell über das Wesen quantitativer Artunterschiede bei Daphnien. *Verhandlungen der deutschen zoologischen Gesellschaft* 19: 110–173. (Citado por Sarkar, 1999)

Wray, G.A. 2007. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nature Reviews Genetics* 8: 206–216.

Zhang, X. 2006. The phenotypic variance within plastic traits under migration-mutation-selection balance. *Evolution*. 60: 1125-1136.