

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Instituto de Biologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Entomologia**



Dissertação

**Discriminação de espécies e suas populações do gênero *Tabanus* (Diptera: Tabanidae) através da Morfometria Geométrica, coletados na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil**

**Boaventura Lobo Centeno Filho**

Pelotas, 2017

**Boaventura Lobo Centeno Filho**

**Discriminação de espécies e suas populações do gênero *Tabanus* (Diptera: Tabanidae) através da Morfometria Geométrica, coletados na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Entomologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ferreira Krüger

Co-orientador: Dr. Hugo Amaral

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

C397d Centeno Filho, Boaventura Lobo

Discriminação de espécies e suas populações do gênero *Tabanus* (Diptera: Tabanidae) através da Morfometria Geométrica, coletados na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil / Boaventura Lobo Centeno Filho ; Rodrigo Ferreira Krüger, orientador ; Hugo Amaral, coorientador. — Pelotas, 2017.

88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Cross-veins. 2. Marcos anatômicos. 3. Mutucas. 4. T. occidentalis. 5. Morfometria geométrica. I. Krüger, Rodrigo Ferreira, orient. II. Amaral, Hugo, coorient. III. Título.

CDD : 595.771

Boaventura Lobo Centeno Filho

Discriminação de espécies e suas populações do gênero *Tabanus* (Diptera: Tabanidae) através da Morfometria Geométrica, coletados na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil.

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Entomologia, Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 27 de julho de 2017

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marco Silva Gottschalk

Doutor em Biologia Animal pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rodrigo Fornel

Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. José Eduardo Dornelles

Doutor em Geociências pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **Agradecimentos**

À minha família, por ter me apoiado durante toda a dissertação mesmos nos momentos mais difíceis.

À minha namorada, por sempre estar me incentivando a fazer o melhor e a não desistir dos meus sonhos.

Ao Laboratório de Ecologia de Parasitos e Vetores (LEPAV) pelo apoio e pelas amizades feitas durante o mestrado.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) pela oportunidade de fazer o mestrado na minha cidade e de prover toda a infraestrutura necessária para tal.

À professora Dra. Raquel Lüdtke do Departamento de Botânica, por ter me concedido acesso à estufa do Laboratório de Estereomicroscopia.

À técnica de laboratório Maria Antonieta Machado Pereira da Silva, por ter me auxiliado nos momentos que precisei de materiais para a realização da metodologia.

Ao professor Dr. Marco Silva Gottschalk, do Laboratório de Evolução e Genética de Insetos, por ter me auxiliado durante a análise estatística dos resultados.

Ao professor Dr. Mauricio Moura, do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná

Ao professor Dr. Edson Zefa por ter me auxiliado na obtenção de imagens das asas dos tabanídeos durante a metodologia

Ao professor Dr. Tiago Krolow, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), por ter enviado os tabanídeos indispensáveis para o trabalho.

Ao pesquisador Luis Clóvis Belarmino, da EMBRAPA, por ter me auxiliado durante a dissertação na escrita da mesma.

## Resumo

CENTENO FILHO, Boaventura Lobo. **Discriminação de espécies e suas populações do gênero *Tabanus* (Diptera: Tabanidae) através da Morfometria Geométrica, coletados na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil.** 2017. 88f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Os insetos da família Tabanidae (Diptera), popularmente chamados de mutucas, em geral, são cosmopolitas. As fêmeas se alimentam de sangue e transmitem agentes de interesse zoossanitários como vermes filarioides e patógenos como vírus, protozoários e bactérias para a corrente sanguínea do hospedeiro. Portanto, possuem importância como vetores de doenças como antraz, diversas tripanossomíases, filariose e outras graves incidências parasitárias que atingem animais silvestres, animais domésticos e também ao homem. Entre os tabanídeos, o gênero *Tabanus* possui centenas de espécies, sendo 191 na região Neotropical. Estas espécies geralmente podem ser discriminadas de acordo com chaves taxonômicas morfológicas. No entanto, *Tabanus triangulum* e *Tabanus occidentalis* são consideradas crípticas entre si por este método. Por isso, utiliza-se a morfometria geométrica como uma ferramenta complementar na taxonomia e determinação correta das espécies. Neste estudo se avaliou dois níveis de diferenciações, interespecificamente e intraespecificamente, com os exemplares de *T. triangulum* e *T. occidentalis*, coletados previamente na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, cujas asas foram separadas do tórax e fotografadas em Estereoscópio Óptico (Olympus) para configurar e digitalizar marcos anatômicos (Tipo I) via *cross-veins* das asas. Em seguida, métodos como Análise dos Componentes Principais (PCA), Análise das Variáveis Canônicas (CVA), Análise Discriminante (AD) e Análise da Regressão e Alometria foram utilizados para elucidar se há diferença interespecífica e não há diferença intraespecífica quanto a forma da asa, como esperado. Constatou-se que *T. triangulum* e *T. occidentalis* apresentam forma da asa das asas diferentes entre si. A análise intraespecífica das localidades R1 (Arroio Pelotas, Arroio Corrientes e Arroio Grande) e R5 (Parque Nacional da Lagoa do Peixe) de *T. triangulum* apresentou diferenças significantes entre si, assim como todas as localidades de *T. occidentalis*. A morfometria geométrica é eficiente para discriminar espécies e localidades de Tabanidae, além de ser uma técnica taxonômica rápida, econômica.

**Palavras-Chave:** cross-veins; marcos anatômicos; mutucas; *T. occidentalis*; morfometria geométrica.

## Abstract

CENTENO FILHO, Boaventura Lobo. **Discrimination of species and their populations of the genus *Tabanus* (Diptera: Tabanidae) through Geometric Morphometric, collected in Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brazil.** 2017. 88f. Dissertation (Master Degree em Entomologia) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

The insects of the family Tabanidae (Diptera), commonly called horse flies, in general, are cosmopolitan. The females feed on blood and transmit agents of health interest worm-like filariform larvae and pathogens such as viruses, protozoa and bacteria into the bloodstream of the host. Therefore, have importance as vectors of diseases such as anthrax, several trypanosomiasis, filariasis and other parasitic effects affecting wild animal, domestic animals and humans. Among the tabanids, the genus *Tabanus* has hundreds of species, being 191 in the Neotropics. These species can be broken down according to morphological taxonomic keys. However, *Tabanus triangulum* and *Tabanus occidentalis* are considered cryptic by this method. Therefore, the geometric morphometry can be as a complementary tool in the taxonomy and correct determination. This study evaluated two levels of differentiations, inter and intraspecifically, with specimens of *T. triangulum* and *T. occidentalis*, previously collected in Coastal Plains of Rio Grande do Sul, whose wings were separated from the thorax and photographed in stereo-microscope Olympus to configure and digitize landmarks (Type I) over wing's cross-veins. Next, methods like Principal Components Analysis (PCA), Canonical Variables Analysis (CVA), Discriminant Analysis (DA) and Regression and Allometry Analysis (R&AA) were used to show that there is interspecific difference and there is no intraespecific difference, as expected. On one hand, it was found that *T. triangulum* and *T. occidentalis* showed different wing's shape between them. On the other hand, the intraspecific analysis between *T. triangulum*'s populations, R1 (Arroio Pelotas, Arroio Corrientes and Arroio Grande) and R5 (Parque Nacional da Lagoa do Peixe), presented significant ( $p < 0,001$ ) difference between each other, as well as all populations of *T. occidentalis*. The geometric Morphometry is efficient to discriminate species and populations of these two Tabanu's species, besides being a fast, economical and relatively simple taxonomic technique.

**Keywords:** cross-veins; landmarks; horseflies; *T. occidentalis*; morphometric geometric

## Lista de Figuras

Figura 1	Imagem de satélite com a distribuição geográfica das áreas amostrais, com 4 armadilhas <i>Malaise</i> cada na Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Pontos 1 = Região 1; Pontos 2 = Região 2; Pontos 3 = Região 3; Pontos 4 = Região 4; Pontos 5 = Região 5.....	28
Figura 2	Imagem de satélite do ponto de coleta na Fazenda Encantada. Taquaraçu, Palmas, Tocantins (TO).....	29
Figura 3	Imagem de satélite do ponto de coleta no Porto de Trombetas, Oximiná, Pará (PA).....	30
Figura 4	Asa direita do tabanídeo com os marcos anatômicos digitalizados, em uma ordem de 1 a 15, com o software TPSDig.....	33
Figura 5A	Valores obtidos da Análise dos Componentes Principais (PCA) a partir da Matriz de Peso relacionada a todos os 357 indivíduos do estudo. E eixo X = Componente Principal 1 e; eixo Y = Componente Principal 2. <i>T. triangulum</i> (pontos laranjas = R1, pontos verdes = R2, pontos azul escuro = R3, pontos roxos = R5) e <i>T. occidentalis</i> (pontos vermelhos = PA, pontos rosa = TO, pontos verde claro = R1 <i>occidentalis</i> , pontos azul claro = R2 <i>occidentalis</i> ).....	40
Figura 5B	Valores obtidos da Análise dos Componentes Principais (PCA) a partir da Weight Matrix relacionada a todos os 357 indivíduos do estudo. Eixo X = Componente Principal 1 e; eixo Y = Componente Principal 2. Localidades de <i>T. triangulum</i> (pontos vermelhos = R1, pontos verde claro = R2, pontos azul claro = R3 e pontos azul escuro (R5).....	41
Figura 5C	Valores obtidos da Análise dos Componentes Principais (PCA) a partir da Weight Matrix. Eixo X = Componente Principal 1 e; eixo Y = Componente Principal 2. Localidades de <i>T. occidentalis</i> . Pontos vermelhos = PA, pontos verde claro = R1 <i>occidentalis</i> , pontos azul claro = R2 <i>occidentalis</i> e pontos azul escuro = TO.....	42
Figura 6A	Diagrama de Deformação derivado da PC1 entre <i>T. triangulum</i> e	



	<i>T. occidentalis</i> ; Os vetores azuis representam as deformações da configuração de <i>T. triangulum</i> em relação à configuração de <i>T. occidentalis</i> e a grade clara representa as deformações nas asas de <i>T. triangulum</i> .....	43
Figura 6B	Diagrama de Deformação derivado da PC1 entre as localidades de <i>T. triangulum</i> . Os vetores azuis representam as deformações da configuração das localidades de <i>T. triangulum</i> com a configuração consenso da espécie e a grade clara apresenta a deformação na asa de <i>T. triangulum</i> .....	44
Figura 6C	Diagrama de Deformação derivado da PC1 entre as localidades de <i>T. occidentalis</i> . Os vetores azuis representam as deformações da configuração das localidades de <i>T. occidentalis</i> com a configuração consenso da espécie e a grade clara apresenta a deformação na asa de <i>T. occidentalis</i> .....	44
Figura 7A	Valores da Regressão e Alometria, no qual Log do Tamanho do Centroide e Valores de Regressão 1 são relacionados. Eixo X = Log do Tamanho do Centroide e Eixo Y = Valores da Regressão 1, <i>T. occidentalis</i> PA = Vermelho, <i>T. occidentalis</i> R1 = Verde Musgo, <i>T. occidentalis</i> R2 = Azul Claro, <i>T. Triangulum</i> R2 = Verde Claro, <i>T. triangulum</i> R3 = Azul Escuro, <i>T. triangulum</i> R5 = Roxo, <i>T. occidentalis</i> TO = Rosa. Elipses de Igual Frequência (Probabilidade 0,95).....	46
Figura 7B	Valores da Regressão e Alometria, no qual Log do Tamanho do Centroide e Valores de Regressão 1 são relacionados. Eixo X = Procoord 1. Eixo Y = Log do Tamanho do Centroide, R1 = vermelho, R2 = verde, R3 = azul e R5 = roxo. Elipses de Igual Frequência (Probabilidade 0,95).....	46
Figura 7C	Valores da Regressão e Alometria, no qual Log do Tamanho do Centroide e Valores de Regressão 1 são relacionados. Eixo X = Procoord 1, Eixo Y = Log do Tamanho do Centroide, Tocantins = Roxo, R1 <i>occidentalis</i> = Verde, PA = Vermelho, R2 <i>occidentalis</i> = Azul. Elipses de Igual Frequência (Probabilidade 0,95).....	47
Figura 8	Diagrama de deformação resultante da Análise de Regressão e Alometria entre <i>T. triangulum</i> e <i>T. occidentalis</i> , levando em	

	consideração o log do tamanho do centroide. Os vetores azuis representam as deformações da configuração de <i>T. triangulum</i> em relação à configuração de <i>T. occidentalis</i> , e a grade azul representa as deformações na asa de <i>T. triangulum</i> .....	47
Figura 9A	Valores da Variável Canônica entre <i>T. triangulum</i> e <i>T. occidentalis</i> : eixo X = Variável Canônica 1; eixo Y = Frequência; Barras Vermelhas = <i>T. triangulum</i> ; Barras Azuis = <i>T. occidentalis</i> .....	51
Figura 9B	Valores da Variável Canônica entre localidades de <i>T. triangulum</i> : eixo X = Variável Canônica 1; eixo Y = Variável Canônica 2; Vermelho = R1; Verde = R2; Azul = R3; Roxo = R5.....	52
Figura 9C	Valores da Variável Canônica entre as localidades de <i>T. occidentalis</i> : eixo X = Variável Canônica 1; eixo Y = Variável Canônica 2; Vermelho = PA; Verde = R1occidenalis; Azul = R2 <i>occidentalis</i> ; Roxo = TO (C).....	53
Figura 10A	Diagramas de Deformação derivados da CV1, mudança na forma da asa: entre <i>T. triangulum</i> e <i>T. occidentalis</i> , considerando a posição dos marcos anatômicos, em relação a CV1. Os vetores azuis representam as deformações entre as configurações dos grupos comparados.....	54
Figura 10B	Diagramas de Deformação derivados da CV1, mudança na forma da asa entre as localidades de <i>T. triangulum</i> . Os vetores azuis representam as deformações entre as configurações dos grupos comparados.....	54
Figura 10C	Diagramas de Deformação derivados da CV1, mudança na forma da asa entre as localidades de <i>T. occidentalis</i> . Os vetores azuis representam as deformações entre as configurações dos grupos comparados.....	55
Figura 11	Diagrama de Deformação derivado da Análise Discriminante resultante da comparação entre <i>T. triangulum</i> e <i>T. occidentalis</i> . Os vetores azuis representam as deformações da configuração de <i>T. triangulum</i> em relação à configuração de <i>T. occidentalis</i> e a grade clara representa as deformações nas asas de <i>T.</i>	

	<i>triangulum</i> .....	59
Figura 12A	Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R1 e R2. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R1) em relação à segunda configuração (R2) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R1).....	60
Figura 12B	Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante R1 e R3. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R1) em relação à segunda configuração (R3) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R1).....	60
Figura 12C	Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R1 e R5. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R1) em relação à segunda configuração (R5) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R1).....	61
Figura 12D	Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante R2 e R3. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R2) em relação à segunda configuração (R3) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R2).....	61
Figura 12E	Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R2 e R5. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R2) em relação à segunda configuração (R5) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R2).....	62
Figura 12F	Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R3 e R5. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R3) em relação à segunda configuração (R5) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R3).....	62
Figura 13A	Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre PA e R1 <i>occidentalis</i> . Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (PA) em relação à	

	segunda configuração (R1 <i>occidentalis</i> ) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (PA).....	63
Figura 13B	Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre PA e R2 <i>occidentalis</i> . Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (PA) em relação à segunda configuração (R2 <i>occidentalis</i> ) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (PA).....	63
Figura 13C	Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre PA e TO. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (PA) em relação à segunda configuração (TO) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (PA).....	64
Figura 13D	Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R1 <i>occidentalis</i> e R2 <i>occidentalis</i> . Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R1 <i>occidentalis</i> ) em relação à segunda configuração (R2 <i>occidentalis</i> ) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R1 <i>occidentalis</i> ).....	65
Figura 13E	Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R1 <i>occidentalis</i> e TO. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R1 <i>occidentalis</i> ) em relação à segunda configuração (TO) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R1 <i>occidentalis</i> ).....	65
Figura 13F	Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R2 <i>occidentalis</i> e TO. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R2 <i>occidentalis</i> ) em relação à segunda configuração (TO) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R2 <i>occidentalis</i> ).....	66
Figura 14	Gráfico ilustrando valores da validação cruzada entre <i>T. triangulum</i> e <i>T. occidentalis</i> : eixo X = <i>T. triangulum</i> e <i>T.</i>	

	<i>occidentalis</i> ; eixo Y = Frequência; Barras Vermelhas = <i>T. triangulum</i> ; Barras Azuis = <i>T. occidentalis</i> .....	66
Figura 15A	Valores da Validação Cruzada entre R1 e R2: Barras Vermelhas = R1, Barras Azuis = R2. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.....	67
Figura 15B	Valores da Validação Cruzada entre R1 e R3: Barras Vermelhas = R1, Barras Azuis = R3. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.....	67
Figura 15C	Valores da Validação Cruzada entre R1 e R5: Barras Vermelhas = R1, Barras Azuis = R5. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.....	68
Figura 15D	Valores da Validação Cruzada entre R2 e R3: Barras Vermelhas = R2, Barras Azuis = R3. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.....	68
Figura 15E	Valores da Validação Cruzada entre R2 e R5: Barras Vermelhas = R2, Barras Azuis = R5. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.....	69
Figura 15F	Valores da Validação Cruzada entre R3 e R5: Barras Vermelhas = R3, Barras Azuis = R5. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.....	69
Figura 16A	Valores da Validação Cruzada entre PA e R1 <i>occidentalis</i> . Barras Vermelhas = PA, Barras Azuis = R1 <i>occidentalis</i> . Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.....	70
Figura 16B	Valores da Validação Cruzada entre PA e R2 <i>occidentalis</i> . Barras Vermelhas = PA, Barras Azuis = R2 <i>occidentalis</i> . Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.....	70
Figura 16C	Valores da Validação Cruzada entre PA e TO. Barras Vermelhas = PA, Barras Azuis = TO. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.....	71
Figura 16D	Valores da Validação Cruzada entre R1 <i>occidentalis</i> e R2 <i>occidentalis</i> . Barras Vermelhas = R1 <i>occidentalis</i> , Barras Azuis = R2 <i>occidentalis</i> . Eixo X = Unidades de Valores da Validação	

	Cruzada e eixo Y = Frequência.....	71
Figura 16E	Valores da Validação Cruzada entre R1 <i>occidentalis</i> e TO. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.....	72
Figura 16F	Valores da Validação Cruzada entre R2 <i>occidentalis</i> e TO. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada eeixo Y = Frequência.....	72

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Características morfológicas e de coloração que diferenciam <i>Tabanus triangulum</i> de <i>Tabanus occidentalis</i> . Continua.....	18
Tabela 2	Número de espécimes utilizados por região de coleta para as análises morfométricas.....	30
Tabela 3	Descrição dos marcos anatômicos das asas dos espécimes das espécies pertencentes ao gênero <i>Tabanus</i> , utilizados no trabalho.....	34
Tabela 4	Análise de Variáveis Canônicas em <i>T. triangulum</i> e <i>T. occidentalis</i> , interespecificamente e intraespecificamente.....	48
Tabela 5	Distância Mahalanobis e Procrustes Distances, e seus respectivos p-valores, da Análise de Variáveis Canônicas entre <i>T. triangulum</i> e <i>T. occidentalis</i> , e suas localidades.....	50
Tabela 6	Diferença entre médias de <i>T. triangulum</i> e <i>T. occidentalis</i> .....	56
Tabela 7	Diferença entre médias das localidades de <i>T. triangulum</i> .....	56
Tabela 8	Diferença entre médias das localidades de <i>T. occidentalis</i> .....	57
Tabela 9	Matriz da classificação na validação cruzada entre <i>T. triangulum</i> (Grupo 1) e <i>T. occidentalis</i> (Grupo 2). Número de indivíduos (n) à esquerda na célula; porcentagem de indivíduos (%) à direita na célula.....	57
Tabela 10	Matriz da classificação na validação cruzada entre as localidades de <i>T. triangulum</i> . Número de indivíduos (n) à esquerda na célula; porcentagem de indivíduos (%) à direita na célula.....	58
Tabela 11	Matriz da classificação na validação cruzada entre as localidades de <i>T. occidentalis</i> . Número de indivíduos (n) à esquerda na célula; porcentagem de indivíduos (%) à direita na célula.....	58

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Revisão bibliográfica.....</b>	<b>21</b>
2.1	A bioecologia da família Tabanidae.....	21
2.2	Aspectos importantes do gênero Tabanus.....	23
2.3	A técnica da Morfometria Geométrica.....	24
<b>3</b>	<b>Metodologia.....</b>	<b>27</b>
3.1	Espécimes utilizados.....	27
3.2	Separação entre asa e tórax pela dissecação.....	31
3.3	Fixação da asa.....	31
3.4	Obtenção das imagens.....	31
3.5	Uso de marcos anatômicos.....	32
3.6	Digitalização dos marcos anatômicos e análises morfométricas.....	33
3.7	Método de Superimposição dos Quadrados Mínimos de Procrustes.....	35
3.8	Análise dos Componentes Principais (PCA).....	36
3.9	Análise das Variáveis Canônicas (CVA).....	36
3.10	Análise Discriminante.....	37
3.11	Distância de Mahalanobis.....	37
3.12	Regressão e Permutação.....	38
3.13	Softwares utilizados.....	38
<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>39</b>
4.1	Análise de Componentes Principais (PCA) para variação interespecífica e intraespecífica de <i>Tabanus triangulum</i> e <i>Tabanus occidentalis</i> ”.....	39
4.2	Análise da Regressão entre <i>T. occidentalis</i> e <i>T. triangulum</i> e entre suas respectivas localidades.....	45
4.3	Análise da Variável Canônica (CVA) entre <i>T. triangulum</i> e <i>T. occidentalis</i> .....	48
4.4	Análise Discriminante entre <i>T. triangulum</i> e <i>T. occidentalis</i> e dentro das mesmas, entre suas localidades.....	55
4.4.1	Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre <i>T. triangulum</i> e <i>T. occidentalis</i> .....	59



**4.4.2 Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre as localidades de *T. triangulum* e entre as localidades de *T. occidentalis***59

**4.4.3 Valores da Validação Cruzada resultante da Análise Discriminante entre *T. triangulum* e *T. occidentalis* (Figura 14), entre localidades de *T. triangulum* (Figura 15 e entre localidades de *T. occidentalis* (Figura 16).** .66

<b>5 Discussão.....</b>	<b>73</b>
<b>6 Conclusões.....</b>	<b>76</b>
<b>7 Considerações finais.....</b>	<b>77</b>
<b>Referências.....</b>	<b>78</b>

## 1 Introdução

O estudo taxonômico de espécies do gênero *Tabanus* (LINNAEUS, 1758) possui significativa relevância para o avanço do conhecimento sobre a dispersão geográfica, abundância estacional e aspectos relativos ao comportamento destes insetos no ambiente, em especial para identificar particularidades da bioecologia úteis à tomada de decisão no manejo das localidades que eventualmente necessitam das medidas de redução populacional.

Os tabanídeos podem causar prejuízos econômicos, sendo que se destacam os relatos de Silva *et al.* (1999) ao realizarem um estudo no Pantanal Central, Mato Grosso, Brasil, demonstraram que tabanídeos podiam transmitir mecanicamente *Trypanosoma vivax* ao atacar bovinos. Estes ataques podem causar redução de rendimento comercial, como produção de leite e/ou de carne (PERICH *et al.*, 1986; STEELMAN, 1976; HOLLANDER; WRIGHT, 1980). Outros relatos de tabanídeos atacando animais são encontrados na literatura. Um desses relatos é o ataque de *T. occidentalis* em répteis *Caiman crocodilus* (Linn.) (Alligatoridae) e *Eunectes murinus* (Linn.) (Boidae) (FERREIRA *et al.*, 2002), ou *Betrequia ocellata* (Diptera, Tabanidae, Rhynomizini) em *Caiman crocodilus* (HENRIQUES *et al.*, 2000), ou *Phorcotabanus cinereus* em *Cairina moschata* (Linnaeus) (Anseriformes, Anatidae) (LIMEIRA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2002), ou tabanídeos em gado Pyrenees, França (BALDACCHINO *et al.*, 2014), e em equinos na Amazônia Central (GORAYEB; RIBEIRO, 2001).

As técnicas utilizadas em taxonomia, que visam obter a correta classificação das espécies dos insetos de interesse acadêmico e socioeconômico, evoluíram com os recentes incrementos no conhecimento ocorridos nas outras áreas de conhecimento. Exemplos deste incremento são, a biotecnologia (*barcoding*), a instrumentação eletrônica dos laboratórios e métodos estatísticos associados aos experimentos científicos mais complexos. Deste modo, observou-se que as

tradicionais análises morfológicas, muitas vezes a olho desarmado ou com pouco auxílio da microscopia, salvo algumas exceções, foram substituídas por modernas e eficientes ferramentas de estudo de características taxonômicas. Além disto estas tradicionais análises morfológicas passaram a contar com elevado grau de consenso entre os especialistas, pois apresentam satisfatória precisão, garantia de repetição dos achados e maior rapidez na obtenção de resultados.

Neste sentido, Zelditch *et al.* (2004) afirmam que a morfometria geométrica foi apresentada inicialmente por Kendall (1977) e Kendall e Kendall (1980) em estudos pioneiros para responder as questões acerca do alinhamento das pedras de Stonehenge. No entanto, Fornel e Cordeiro-Estrela (2012) citam que somente com a publicação de dois artigos (KENDALL, 1984; BOOKSTEIN, 1984) é considerado o aparecimento da morfometria geométrica ou análise estatística das formas. A morfometria geométrica foi amadurecida entre o final dos anos 80 e início dos 90 do século 20 (ROHLF; MARCUS, 1993; MARCUS *et al.*, 1996 *apud* FORNEL; CORDEIRO-ESTRELA, 2012) e, mais tarde, Rohlf (1990) incrementou esta técnica com o desenvolvimento de programas de análise geométrica para computadores (MONTEIRO; REIS, 1999). A literatura cita inúmeros estudos de taxonomia por morfometria geométrica em insetos e muitos deles foram importantes para solucionar problemas de classificação de espécies ou localidades de uma mesma espécie, de importância econômica, como Gehatun *et al.* (2014), que avaliaram a ocorrência, através da caracterização de três localidades de *Glossina pallidipes* na região da Etiópia, onde há um alto índice de infecção por tripanossomose, tanto em animais quanto em humanos; Lopes *et al.* (2013) utilizou morfometria geométrica e tradicional para identificar espécies de *Anastrepha fraterculus* através da forma da ponta do acúleo e da forma da asa; Kitthawee e Dujardin (2009) testou a classificação de *Diachasmimorpha longicaudata* e constatou que na verdade é um complexo de três novas espécies crípticas (*D. longicaudata* A, B e BB); Matias *et al.* (2001) ao realizar um estudo na Bolívia, utilizando morfometria geométrica da asa, identificou espécimes até então desconhecido como indivíduos de *Rhodnius robustus*; Kandemir *et al.* (2011) reavaliaram a taxonomia de subespécies de abelhas melíferas baseando-se em morfometria geométrica da asa.

A ocorrência da espécie *T. triangularum* na Zona Sul do Rio Grande do Sul foi detectada pela primeira vez por Lutz *et al.* (1918) em levantamentos realizados no Estado do Rio Grande do Sul. Leclercq (1965) voltou a constatar a ocorrência de *T.*

*triangulum* no município de Pelotas, Rio Grande do Sul. No ano de 2015, Krüger e Krolow (2015) relataram ocorrências no bioma Pampa, em especial nos municípios de Capão do Leão, Arroio Grande, Morro Redondo e Pelotas, com relatos de localidades de *T. triangulum*. Turcatel *et al.* (2007) ao fazerem um levantamento das espécies de Tabanidae ocorrentes no Estado do Paraná, constatou que tanto *T. occidentalis* quanto *T. triangulum* estão presentes; Chainey *et al.* (1994) relatou a ocorrência de *T. triangulum* e *T. occidentalis* em Santa Cruz, Bolívia, uma região onde fazendeiros atribuem a diminuição na produção bovina aos ataques das mutuca;

As espécies *T. triangulum* e *T. occidentalis* são consideradas morfológicamente crípticas entre si. No entanto, ainda existem algumas características que são distintas entre as mesmas. Lima (2016) refez a descrição morfológica de *T. triangulum* e *T. occidentalis*, e baseado neste estudo foi feita uma tabela (Tabela 1) que mostra as distinções de certas características entre ambas as espécies.

Tabela 1 – Características morfológicas e de coloração que diferenciam *Tabanus triangulum* de *Tabanus occidentalis*. Continua.

Comparação de <i>T. triangulum</i> e <i>T. occidentalis</i> (Continuação)		
Estruturas	Características distintas	
Cabeça		
	<i>T. triangulum</i>	<i>T. occidentalis</i>
Olhos	Duas bandas transversais coloridas	Sem padrão de coloração em vida
Vértice	Pruína cinza e pelos pretos	Pruína castanha e pelos castanhos
Tubérculo	Pequeno vestígio de ocelo	Ocelo ausente
Fronte	Pelos amarelos	Pelos castanhos
Calo Frontal	Curto calo mediano	
Subcalo	Pruína castanho a amarelo	Pruína castanho acizentada
Parafaciália	Pelos amarelos	Pelos brancos
Gena	Castanho escuro e pruína cinza	Castanho com pruína cinza
Frontoclípeo		Pelos pretos na extremidade da antena
Palpo	Amarelo claro	Branco amarelado
Primeiro segmento		Alguns pelos pretos na porção distal
Segundo segmento	Pelos amarelos na porção proximal	Pelos amarelos na base do segmento
Teca	Alguns pelos pretos e brancos	Alguns pelos castanhos

Estruturas		Características distintas	
Labela Membranosa		Alguns pelos pretos e brancos	Alguns pelos castanhos
Antena		Levemente maior que o palpo	Mesmo tamanho do palpo
Flagelo		Placa basal castanha	Placa basal castanha alaranjada
Estilos		Tamanho 2/3 da placa basal	Tamanho subigual a placa basal
Tórax			
Mesonoto		Predominantemente preto	Predominantemente castanho escuro, quase preto
Escutelo		Preto	Apice castanho claro
Lobo Notopleural			Com pruína cinza
Lobo pós-alar			Com pruína cinza e pelos amarelos
Pleura		Tegumento preto e anepisterno com alguns pelos pretos próximos ao lobo notopleural	Tegumento castanho escuro, anepisterno com alguns pelos castanhos próximos ao lobo notopleural
Coxas		Tegumento preto	Tegumento castanho escuro
Fêmur anterior		Pelos pretos exceto área ventral com pruína branca e pelo pretos	Pelos pretos
Fêmures mediano e posterior		Cobertos de pelos castanho claros	Coberto de pelos brancos
Asa		Hialina	Hialina, exceto célula costal castanha
Abdômen			
Tergitos		Escurecendo a partir do 5º tergito, triângulo preto visível dos 1º e 2º segmentos	Escurecendo a partir do 4º segmento
Terminália			
Margem lateral		Com lobos laterais	Com pequenos lobos posteriores
Tergito X (10)		Margem interna mais larga, com pequena extensão superior	Margem externa comprimida na borda
Cercos		Arredondados	Subretangulares, mais longos que largos, com margem anterior arredondada
Dutos espermáticos			2/3 distais sofrendo pequena dilatação

Assim, persiste a necessidade de mais estudos comparativos com outras técnicas taxonômicas para consolidar o diagnóstico de *Tabanus occidentalis* e *T. triangulum* na Zona Sul, assim como as localidades de *T. occidentalis* do Pará e do Tocantins. Além disso, este estudo visa diagnosticar as espécies com origem em diferentes regiões brasileiras, seguindo a técnica de morfometria geométrica.

Portanto, o objetivo deste estudo foi trabalhar em dois níveis de diferenciações os indivíduos das espécies de *T. triangulum* e *T. occidentalis*: a) Interespecificamente; b) Intraespecificamente;

Espera-se que, a forma da asa seja diferente entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*, ou seja, interespecificamente, e que esta mesma forma da asa não apresente diferença entre as localidades de cada espécie, ou seja, intraespecificamente.

## **2 Revisão bibliográfica**

Esta parte visa relatar o Estado da Arte sobre aspectos da bioecologia da família Tabanidae, em especial do gênero *Tabanus*, bem como o histórico do surgimento da Morfometria Geométrica e visa fornecer exemplos da utilização desta técnica para resolver problemas de taxonomia e espécies com importância econômica.

### **2.1 A bioecologia da família Tabanidae**

Tabanidae (Diptera) é composta por membros popularmente chamados de Mutucas, os quais são distribuídos mundialmente (FAIRCHILD, 1981). Os tabanídeos machos apresentam uma alimentação baseada na ingestão de néctar de flores (ROBERTS, 1967; MAGNARELLI *et al.*, 1979). Já alguns tabanídeos fêmeas na maioria das espécies apresentam um hábito alimentar hematófago, ou seja, realizam a ingestão de sangue de animais, pois necessitam de proteína animal que tem importante papel na regulação do mecanismo da maturação dos folículos embrionários e do mecanismo da oviposição (FAIRCHILD, 1981; FOIL; HOGSETTE, 1994). Os tabanídeos ao se alimentarem do sangue, acabam transmitindo, patógenos para a corrente sanguínea deste hospedeiro, sendo assim considerados importantes vetores de doenças parasitárias, que atingem tanto animais silvestres, quanto animais domésticos (KRINSKY, 1976), podendo até afetar ao homem. Dentre os agentes patogênicos que podem ser transmitidos estão os vermes filarioides, vírus, protozoários e bactérias, que são causadores de doenças importantes como antraz, diversas tripanossomíases e filarioses (PECHUMAN; TESKEY, 1981). No Sudão, tabanídeos emergem em grandes números durante a estação chuvosa, causando assim um grande impacto econômico para o país (MOHAMED-AHMED *et*

*al.*, 2007). Já para o Brasil temos registros de transmissão de *Trypanossoma evansi*, *T. vivax* e o vírus da anemia infecciosa equina, sendo as ocorrências para as regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sul (BARROS *et al.*, 2003; BATISTA *et al.*, 2007, 2008).

A oviposição dos Tabanídeos ocorre em ambientes aquáticos ou semi-aquáticos, onde as larvas, na maioria carnívoras, utilizam como fonte de alimento, pequenos invertebrados de água doce. Já o desenvolvimento da larva dos tabanídeos pode durar um ano, em alguns casos mais de dois anos, enquanto o desenvolvimento pupal dura somente duas semanas (PECHUMAN; TESKEY, 1981). Por fim, os indivíduos adultos de Tabanídeos, chegam a atingir no máximo 3 ciclos gonotóficos, equivalendo a somente dois meses de vida (RAFAEL; CHARLWOOD, 1980).

Tabanídeos podem ser coletados utilizando animais domésticos ou silvestres como iscas, pois além de apresentarem uma ótima capacidade de voo, possuem um comportamento bem ativo quando rastreiam algum hospedeiro. No entanto, no método citado anteriormente existe uma complicação relacionada a especificidade dos tabanídeos por hospedeiros como isca (FERREIRA *et al.*, 2002; LIMEIRA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2002; FERREIRA, 2003; FERREIRA; RAFAEL, 2004), e outro problema relacionado ao fato de que algumas espécies de tabanídeos habitam o dossel de florestas, não se direcionando até as iscas (RAFAEL; GORAYEB, 1982; GORAYEB, 1985, 1999, 2000; HENRIQUES, 2004). Um terceiro problema da técnica de captura através de iscas é a impossibilidade de serem capturados machos, justamente pelo fato de se alimentarem de néctar, e não de sangue animal. Neste caso, são utilizadas com atrativos luminosos, atraindo machos de hábitos diurnos e crepusculares, assim como fêmeas diurnas e crepusculares (FROST, 1951; ANTHONY, 1960; PHILIP, 1982; FAIRCHILD, 1986; HENRIQUES; RAFAEL, 1999). Portanto, a integração entre os dois métodos de captura, tanto isca quanto com armadilhas, potencializa a eficiência na captura de tabanídeos, tanto na riqueza quanto na abundância.

## 2.2 Aspectos importantes do gênero *Tabanus*



O gênero *Tabanus* é composto por dezenas de espécies, sendo 191 para a região Neotropical. O gênero *Tabanus* e as espécies constituintes, podem ser identificadas de acordo com Coscarón e Papavero (2009a, 2009b);

Membros deste gênero são conhecidos também, assim como outros gêneros dentro de Tabanidae, como potenciais vetores de anthrax, tripanossomas e vermes (FAIRCHILD, 1980). Segundo Coscarón e Papavero (2009b), algumas espécies de *Tabanus*, apresentam uma preferência por se alimentar em bovinos do que em humanos, não sendo tão prejudiciais ao segundo hospedeiro. Portanto, *Tabanus* é um gênero de grande importância para a veterinária, como, por exemplo, em habitats temperados (WALL; SHEARER, 2001). Nestas mesmas áreas temperadas, tabanídeos adultos são pestes incômodas aos humanos (MULLENS, 2002). Uma explicação para este comportamento de hematofagia em bovinos e outros mamíferos ungulados é que, segundo Gillott (2005), os indivíduos do gênero *Tabanus* tiveram sua evolução proximamente relacionada com a evolução destes mamíferos, fazendo com que se adaptassem a hematofagia nestes hospedeiros.

Quanto a distribuição geográfica deste gênero, Saw Bawm *et al.* (2015), estudaram a abundância sazonal, dentre outros dípteros, de tabanídeos, na Taw Area, Myanmar, sendo constatado que os indivíduos do gênero *Tabanus* foram encontrados em maior quantidade durante o verão. Este resultado foi semelhante ao trabalho de Chvala *et al.* (1972) que encontraram maior quantidade de *Tabanus* no verão, na Croácia, além de constatarem que a taxa de encontro de *Tabanus* no verão estaria atribuída ao fato de as mutucas terem sido mais ativas durante a luz do dia. No entanto, Saw Bawm *et al.* (2015) não encontraram uma relação direta entre temperatura e a densidade dos *Tabanus*. Além disso, Saw Bawm *et al.* (2015), ao considerarem *Tabanus*, o número de indivíduos deste gênero, comparativamente as outras espécies, foi maior na estação chuvosa do que nas outras. Ainda segundo Saw Bawm *et al.* (2015), as temperaturas mensais da estação chuvosa foram muito semelhantes das temperaturas mentais do verão, isto pode estar relacionado ao fato de que os fatores climáticos desta estação chuvosa favoreceriam os *Tabanus* aumentando a taxa de sobrevivência e de alimentação dos mesmos.

Scoles *et al.* (2008), demonstraram que *Tabanus fuscicostatus* é um eficiente transmissor mecânico de *Anaplasma marginales*.

### **2.3 A técnica da Morfometria Geométrica**

De acordo com o histórico descrito por Monteiro e Reis (1999), durante muito tempo, morfometria era um termo utilizado para qualquer estudo que apresentava uma análise quantitativa da variação da morfologia dos organismos. Este termo foi designado a métodos que envolviam a medição de distâncias de forma entre espécies, e com os resultados obtidos, construir fenogramas. A partir da aparição de diversos métodos novos nesta área nos anos 80, passou a ser necessário o desenvolvimento de embasamentos filosóficos e teóricos, fazendo com que áreas como biologia, estatística e geometria fossem agrupadas em uma área de pesquisa. Esses métodos morfométricos são resultados de tentativas de buscar uma ligação entre caracteres geométricos das formas biológicas e a possibilidade de uma variação estatística. Ainda segundo Bookstein (1991 *apud* MONTEIRO; REIS, 1999), a morfometria é definida como “o estudo estatístico da covariância entre mudanças de forma e fatores causais”, destacando que a morfometria estuda as causas das diferenças de forma entre organismos, sendo ecológicas ou filogenéticas. Bookstein (1989 *apud* MONTEIRO; REIS, 1999) define a forma como, “todas as propriedades de uma configuração de pontos que não se alterem por efeitos de tamanho, posição e orientação”.

Segundo Monteiro e Reis (1999), a análise fatorial criada por Charle Spearman passou a ser mais amplamente utilizada em estudos taxonômicos e morfométricos a partir da década de 60 (ROHLF; SOKAL, 1962; SOKAL; SNEATH, 1963; GOULD, 1966, 1967).

A escola biométrica de morfometria, que estava iniciando em um contexto de questões morfométricas, encontrava-se em um dilema: a dificuldade de incorporar informação sobre a geometria da forma a partir dos dados utilizados em suas técnicas estatísticas (MONTEIRO; REIS, 1999). Além disso, a análise morfométrica ainda apresentava outra limitação, a falta de um método onde existisse uma análise da forma independente do tamanho. Isto ocorria, pois, todos os dados que eram utilizados na morfometria multivariada apresentavam informações sobre a forma e sobre o tamanho (MONTEIRO; REIS, 1999).

Monteiro e Reis (1999) relatam que pesquisadores como, Huxley (1932), Richards e Kavanagh (1943), Sneath (1967) e Bookstein (1978) tentaram, sem sucesso, chegar a uma explicação satisfatória da variação da forma através de criações e transformações, individuais, de métodos. De acordo com Monteiro e Reis (1999), os pesquisadores Lohman (1983), Rohlf e Archie (1984) e Rohlf (1986)

realizaram um estudo de contornos, ao invés da utilização de marcos anatômicos. No entanto, estes estudos não apresentavam uma incorporação entre a noção de homologia e a riqueza de informação dos marcos anatômicos

A falta de consenso entre os pesquisadores de qual seriam os dados morfométricos mais apropriados para se obter uma análise morfométrica correta, era a principal fonte da confusão na morfometria até a década de 80, segundo Bookstein (1993 apud MONTEIRO; REIS, 1999).

Finalmente, Monteiro e Reis (1999) relatam que as limitações apresentadas pela morfometria geométrica começaram a serem superadas, simultaneamente, em diversos centros de pesquisa ao redor do mundo.

Atualmente, quando se necessita realizar um experimento taxonômico, seja para descobrir novas espécies ou para revisar espécies já descritas, sempre se utiliza métodos novos que possam providenciar um ponto de vista diferente, comprovando ou não determinadas hipóteses. Um destes métodos, é a morfometria geométrica.

Um exemplo da morfometria geométrica sendo utilizada para a discriminação de espécies, é o de Calle *et al.* (2008), onde foi concluído que foia possibilidade de distinguir onze espécies do subgênero *Anopheles* (*Nyssorhyncus*) presentes na Colômbia, usando apenas a informação contida na forma da asa. Estes resultados permitiram que a configuração de marcos anatômicos utilizada neste trabalho, pudesse ser processada mediante o algoritmo de Procrustes, apoiando de maneira sólida o trabalho taxonômico com as espécies do subgênero *Nyssorhyncus*.

Outro exemplo da aplicação da morfometria geométrica na discriminação de espécies, é o trabalho de Jaramillo *et al.* (2015), onde foi constatado ser possível realizar uma discriminação interespecífica, entre espécies proximamente relacionadas pertencentes ao subgênero *Anopheles* (*Nyssorhyncus*). Assim foi mostrado que a morfometria geométrica é um método rápido, barato e eficiente para a identificação deste subgênero.

Finalmente, Lorenz *et al.* (2012) após realizar análises da morfometria geométrica na asa direita de três espécies do gênero *Anopheles*, *An. cruzii*, *An. homunculus* e *An. bellator*, comparando interespecificamente os tamanhos dos centroides, de cada espécie, constataram ser possível obter uma discriminação significativa entre elas.

Agora, quando se necessita estudar a existência, ou não, de uma diferenciação entre localidades, como por exemplo, de insetos, a morfometria geométrica pode servir como uma ferramenta para este estudo. Um exemplo desta aplicação, é o trabalho de Gaspe *et al.* (2012), onde foi constatado a evidência de uma correlação positiva entre os valores da distância de Mahalanobis a distribuição geográfica de diferentes localidades de *Triatoma infestans*. localidades separadas por mais de 4 quilômetros de distância, apresentaram um valor da distância de Mahalanobis significativamente diferente entre elas, ao passo que as localidades separadas por menos de 4 quilômetros de distância, apresentaram distâncias de Mahalanobis similares. Ainda segundo Gaspe *et al.* (2012), foi constatado que localidades de machos de *T. infestans* habitantes de domicílios, apresentaram tamanhos corporais e alares menores do que os machos habitantes das regiões peridomicilares, sendo tanto lugares fechados ou ao ar livre.

Outro exemplo da aplicação da morfometria geométrica para diferenciação entre localidades é o trabalho de Schachter-Broide *et al.* (2009), onde primeiramente foi feita a comparação do tamanho do centroide da asa direita, entre indivíduos de *Triatoma infestans* habitantes de domicílios e/ou armazéns e habitantes das regiões de peridomicílio. A partir deste estudo, foi elucidado que os indivíduos de *T. infestans* que habitam o domicílio e/ou armazéns apresentam maior tamanho do centroide do que os que habitam o peridomicílio. Schachter-Broide *et al.* (2009) posteriormente realizaram uma comparação do tamanho do centroide da asa e da forma das mesmas, em relação a sazonalidade. O resultado obtido nessa segunda parte do estudo foi a confirmação da existência desta correlação entre a sazonalidade e o tamanho do centroide e/ou a forma da asa, ao passo que, por exemplo, insetos coletados em estações diferentes, com 6 meses de diferença, diferiram menos na forma da asa, se comparado com insetos coletados na mesma estação (verão), com três anos de diferença.

### 3 Metodologia

A metodologia empregada neste trabalho segue uma sequência na qual consiste da descrição da obtenção dos espécimes utilizados (3.1); Separação da asa do tórax, através da Dissecção (3.2); fixação da asa imersa em uma substância denominada Enthellan em uma lâmina histológica (3.3); obtenção de imagens, das asas fixadas, em Estereoscópio Óptico (Olympus) acoplado a uma câmera digital (Mshot D50) (3.4); digitalização dos marcos anatômicos (Tipo I) nas imagens das asas, seguindo uma ordem de 1 a 15, com o software TPSDig (3.5 e 3.6); métodos matemáticos em cima dos dados (coordenadas dos marcos anatômicos) resultantes da digitalização, utilizando o software TPSRel, para obtenção de dados (Matrix Peso, Tamanho do Centroide, *Relative Warps*, *Partial Warps*, etc) necessários para as análises estatísticas a seguir (3.6); utilização do software MorphoJ (v. 1.06d) para o Método de Superimposição dos Quadrados Mínimos de Procrustes (3.7), para a Análise dos Componentes Principais (PCA) (3.8), para a Análise das Variáveis Canônicas (CVA) (3.9), para a Análise Discriminante (AD) (3.10), para obtenção da Distância de Mahalanobis (3.11) e para Regressão de Alometria e permutação (3.12); softwares utilizados no estudo para obtenção dos resultados (3.13).

#### 3.1 Espécimes utilizados

De acordo com Lima (2016), a coleta dos tabanídeos foi realizada com o auxílio de armadilhas do tipo Malaise modificadas (modelo TOWNES, 1972 com as modificações do frasco – coletor – para ver especificidades consultar TOWNES, 1972; BROWN, 2005). Contudo, estas coletas abrangeram a Planície Costeira do Rio Grande do Sul, em cinco regiões. Estas regiões são: Região 1 – Arroio Pelotas, Arroio Corrientes e Arroio Grande; Região 2 – Reserva Biológica do Lami, Vila

Pacheca no Rio Camaquã e RPPN Barba Negra; Região 3 – Estação Ecológica do TAIM; Região 4 – Litoral Norte; Região 5 – Parque Nacional da Lagoa do Peixe (Figura 1). Segundo Lima (2016) nos pontos de coleta foram instaladas total de 140 armadilhas Malaise, sendo 28 armadilhas por região. As armadilhas ficaram expostas durante oito dias.

O período total de coleta na Planície Costeira foi compreendido de 27 de outubro de 2011 a 12 de fevereiro de 2012. Todas as coletas foram realizadas com as devidas autorizações dos órgãos responsáveis pela manutenção das áreas naturais (Autorização SISBIO n°: 29229-2). Ao final do período de coletas o material obtido foi encaminhado para o Laboratório de Ecologia de Parasitos e Vetores, da Universidade Federal de Pelotas, para acondicionamento e triagem.

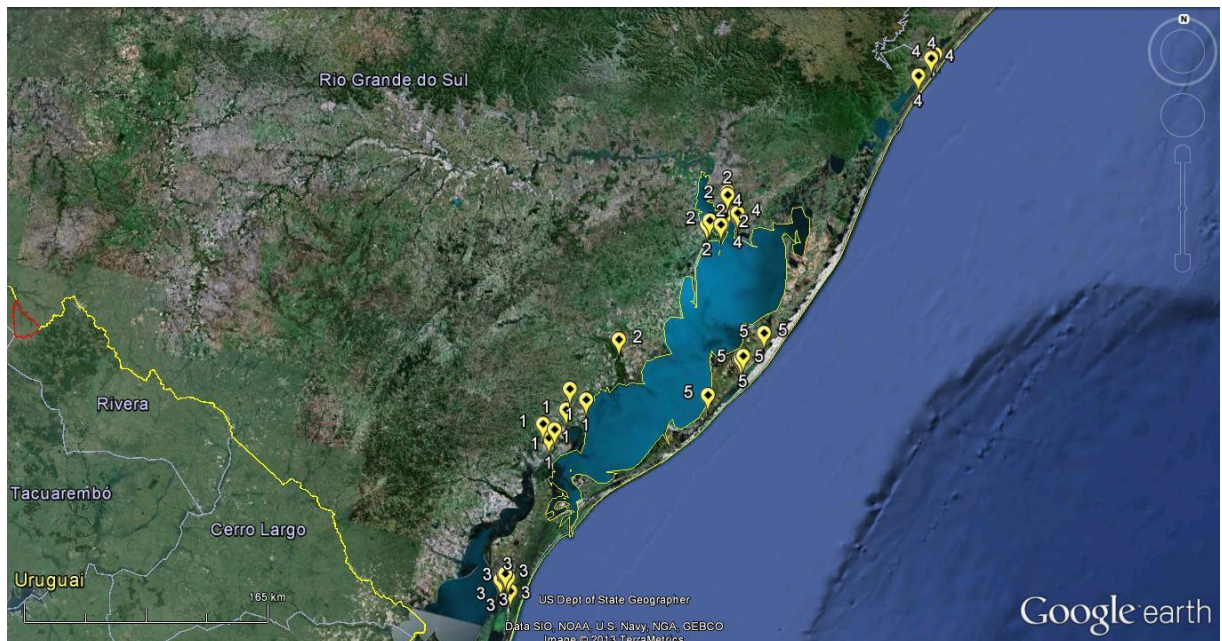


Figura 1 - Imagem de satélite com a distribuição geográfica das áreas amostrais, com 4 armadilhas Malaise cada na Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Pontos 1 = Região 1; Pontos 2 = Região 2; Pontos 3 = Região 3; Pontos 4 = Região 4; Pontos 5 = Região 5.

Fonte: Zafalon-Silva (2013)

A identificação dos espécimes utilizados neste trabalho, em nível de espécie, foi feita por Lima (2016).

Outros exemplares de *T. occidentalis* foram coletados em 2012 por Lima *et al.*, (2015) na Fazenda Encantada, Taquaraçu, Palmas, Tocantins (TO). A metodologia utilizada nas coletas destes espécimes, assim como a identificação dos mesmos estão descritas em Lima *et al.* (2015) (Figura 2).





Figura 2 - Imagem de satélite do ponto de coleta na Fazenda Encantada. Taquaraçu, Palmas, Tocantins (TO).

Fonte: Google Maps

Por último, os exemplares de Porto das Trombetas, Oximiná, Pará (PA), Brasil foram coletados por Krolow (dados não publicados) utilizando Armadilha Malaise. Este material está depositado coleção de Entomologia da Universidade Federal do Tocantins (CEUFT) (Figura 3).

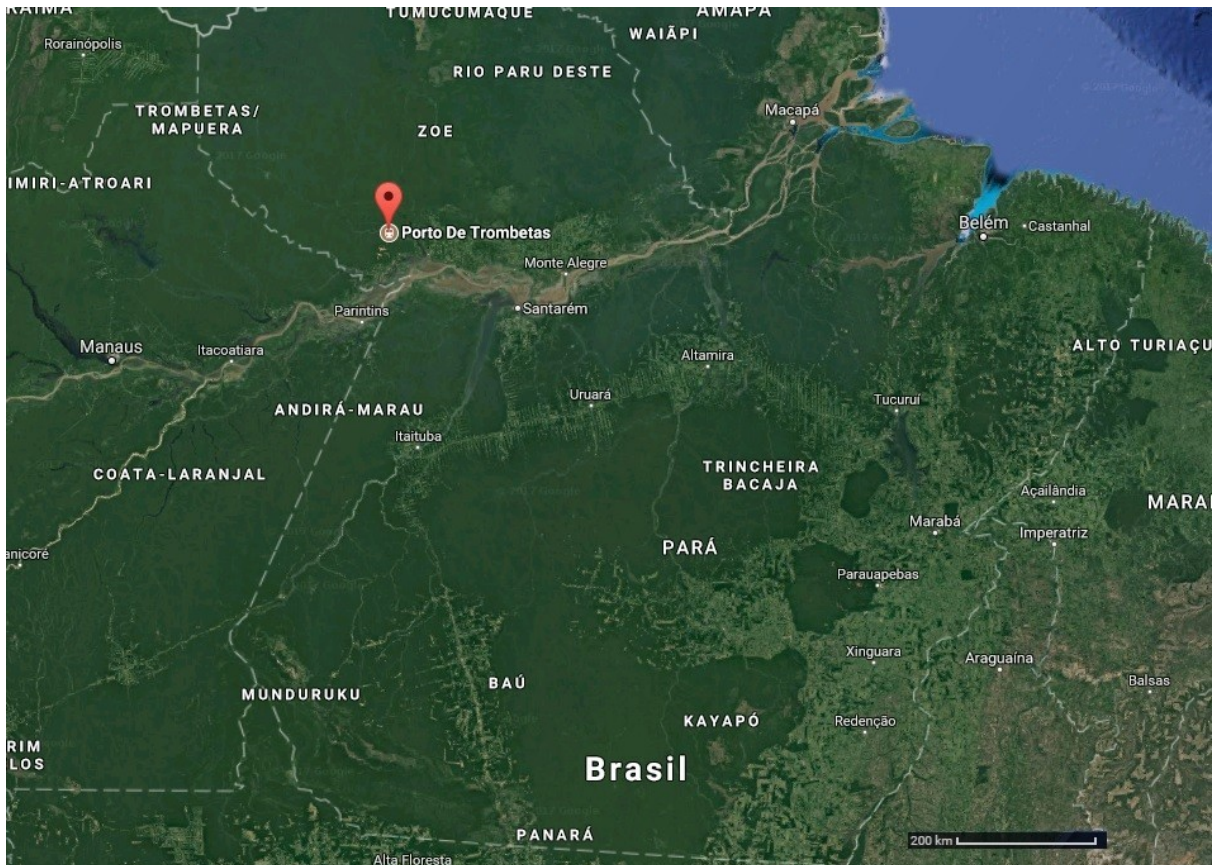


Figura 3 - Imagem de satélite do ponto de coleta no Porto de Trombetas, Oximiná, Pará (PA).  
Fonte: Google Maps

Na tabela 2 a seguir está discriminado a quantidade de espécimes, de *T. triangulum* e *T. occidentalis*, utilizados de cada região para o estudo.

Tabela 2 – Número de espécimes utilizados por região de coleta para as análises morfométricas.

Regiões de coleta	Número de indivíduos por espécie	
	<i>T. triangulum</i>	<i>T. occidentalis</i>
R1 (Arroio Pelotas, Arroio Corrientes e Arroio Grande)	204	5
R2 (Reserva Biológica do Lami, Vila Pacheca no Rio Camaquã e RPPN Barba Negra)	35	25
R3 (Estação Ecológica do TAIM)	29	-
R5 (Parque Nacional da Lagoa do Peixe)	18	-
TO (Fazenda Encantada, Taquaraçu, Palmas, Tocantins)	-	28
PA (Porto das Trombetas, Oximiná, Pará)	-	13



### **3.2 Separação entre asa e tórax pela dissecação**

Primeiramente o animal foi disposto lateral ou dorsoventralmente na placa de Petry com a asa de interesse estendida. Posteriormente foi realizado a localização da articulação que tem como função ligar a asa e o tórax do tabanídeo. Esta articulação está situada na porção final anterior da asa. Nesta articulação foi necessário, primeiro, realizar uma inserção com uma agulha histológica, em seguida foi feito um movimento de baixa intensidade de força em um sentido horizontal, indo na direção do tórax para a asa. Este movimento tem como finalidade realizar a separação, definitiva, entre a asa e o tórax do tabanídeo. Em seguida feito a fixação da asa para fins de observação em estereoscópios ou microscópios.

### **3.3 Fixação da asa**

Para tal a asa do tabanídeo de interesse foi imersa em Enthellan ou Bálsamo, evitando assim com que a estrutura acabe se deslocando. Para que a asa seja fixada por definitivo na lâmina, colocou-se uma lamínula sobre esta asa imersa. Em seguida a lâmina com a asa fixada foi levada para dentro de uma estufa. Nesta estufa, após 3 a 5 dias, o Bálsamo ou Enthellan irão se tornar mais rígidos, graças à ação da alta temperatura, entre 60 e 80 graus célsius, sobre estes compostos. Ao término de 3 a 5 dias, as lâminas foram retiradas da estufa, colocadas para esfriar e, por fim, guardadas em laminários e identificadas.

### **3.4 Obtenção das imagens**

Após terminada a confecção das lâminas, com as asas fixadas, elas foram levadas ao estereoscópio óptico Olympus. Este estereoscópio apresenta uma câmera digital (Mshot D50), acoplada à sua estrutura, que é necessária para a realização da obtenção das fotografias das asas fixadas nas lâminas.

A partir das imagens obtidas, com a asa ilustrada, neste estereoscópio, foram determinados os marcos anatômicos de interesse a ser analisado. Esta determinação deverá seguir o conceito descrito, a seguir, no tópico “Marcos Anatômicos”. Por fim, baseando-se nestes marcos anatômicos, realizou-se as

medidas morfométricas. Este procedimento acerca das imagens foi realizado nas asas de todos os tabanídeos de interesse.

Neste estudo, as asas direitas foram escolhidas, pois estas estruturas apresentam uma identificação clara de marcos anatômicos homólogos que são representados pelas veias e ou escleritos (MONTEIRO; REIS, 1999; KLINGENBERG; MCLNTYRE, 1998). Outro motivo pelo qual as asas direitas são utilizadas é que assim, evita-se a pseudoreplicação (GASPE *et al.*, 2012). Além disso, uma rede de venações compartimentaliza a asa contribuindo com um conjunto de possíveis “*outlines*”, e com um número de potenciais marcos anatômico.

### 3.5 Uso de marcos anatômicos

Quando se quer testar a evidência de uma variação fenotípica entre espécies e localidades, correlacionando com a distribuição geográfica das mesmas, usa-se alguns procedimentos de Morfometria Geométrica descritos por Monteiro e Reis (1999).

Na Morfometria Geométrica se mede uma estrutura baseando-se em uma configuração de marcos anatômicos, sendo que cada um deles é disposto em um plano Cartesiano, apresentando uma coordenada “xy” (MONTEIRO; REIS, 1999).

Dada uma matriz “p x k”, temos, que “p” são os pontos na configuração, e “k” são as dimensões (MONTEIRO; REIS, 1999).

Neste estudo, os pontos “p” representam os marcos anatômicos das asas dos tabanídeos. Já as dimensões “k”, representam as dimensões espaciais apresentadas pela imagem da asa do tabanídeo.

Neste estudo, as imagens das asas, apresentarão somente duas dimensões “k”, comprimento e largura, e 15 pontos “p”, ou seja, 15 marcos anatômicos. Estes 15 marcos anatômicos serão dispostos em regiões homólogas das asas. Dentre estas regiões, temos os cruzamentos entre duas nervuras, ou “*cross-veins*”.

Os marcos anatômicos escolhidos para este experimento serão do Tipo I (BOOKSTEIN, 1991), ao passo que, estes apresentam uma homologia mais clara, e são mais objetivos, além de garantir maior replicabilidade na análise e diminuir o erro intra-operador durante a digitalização.

### 3.6 Digitalização dos marcos anatômicos e análises morfométricas

Primeiramente, as imagens das asas fotografadas no estereoscópio Olympus foram abertas no software TPSDig. Em seguida através da ferramenta “Digitize marcos anatômicos”, foram digitalizados um total de 15 marcos anatômicos do tipo 1 (BOOKSTEIN, 1991), baseando-se no trabalho de A. Torres (não-publicado). Estes marcos anatômicos foram digitalizados seguindo uma ordem de 1 a 15 (Figura 4).

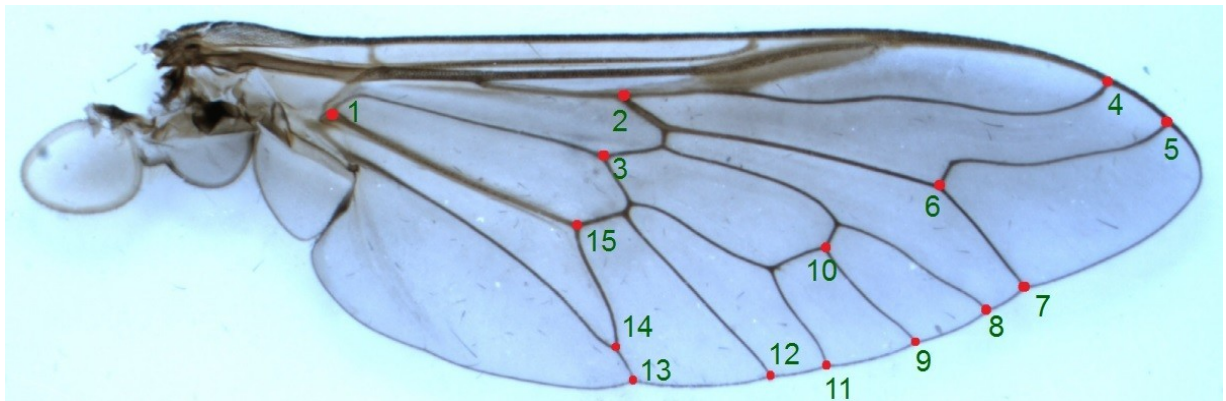


Figura 4 - Asa direita do tabanídeo com os marcos anatômicos digitalizados, em uma ordem de 1 a 15, com o software TPSDig.

Cada marco anatômico coincide com uma intersecção entre venações da asa. Assim, temos 15 intersecções que foram utilizadas neste trabalho, que estão listadas na tabela 3. Segundo Rafael *et al.* (2012), as siglas e respectivas nomenclaturas para as venações da asa de Diptera são: C (costal), Sc (subcostal), RA (radial anterior), RP (radial posterior), RP1 (radial posterior 1), RP1A (radial posterior 1A), RP1B (radial posterior 1B), RP2 (radial posterior 2), RP2A (radial posterior 2A), RP2B (radial posterior 2B), MA (medial anterior), MA1 (medial anterior 1), MA2 (medial anterior 2), MP (medial posterior), MP1 (medial posterior 1), MP2 (medial posterior 2), CuA1 (cubital anterior 1), CuA2 (cubital anterior 2), CuP (cubital posterior), AA (anal anterior), AP (anal posterior).

Tabela 3 – Descrição dos marcos anatômicos das asas dos espécimes das espécies pertencentes ao gênero *Tabanus*, utilizados no trabalho.

Marcos Anatômicos	Localização na asa
1	intersecção entre veias Cu, M e RA
2	intersecção entre veias RP e RP2
3	intersecção entre ramificações da veia M
4	intersecção entre veias C e RP1
5	intersecção entre veias C e RP2A
6	intersecção entre veias RP2A e RP2B
7	extremidade da veia RP2B
8	extremidade da veia MA1
9	extremidade da veia MA2
10	intersecção entre ramificações da veia M e veia MA2
11	extremidade da veia MP
12	extremidade da veia CuA
13	extremidade da veia CuA2 + AA
14	intersecção entre veias AA e CuA2
15	Intersecção entre veias CuP e CuA2

Utilizando a ferramenta “Set Scale”, no software TPSDig, uma escala de 0.001433 foi determinada para que todas as digitalizações em todas as asas estivessem padronizadas. O *software* TPSDig foi utilizado por sua facilidade de manuseio, sem necessidade de alto conhecimento técnico, além de ter sido usado em outros estudos.

Após a digitalização dos marcos anatômicos, arquivos “.TPS” foram gerados. Nestes arquivos encontra-se informações acerca da digitalização como: o número de marcos anatômicos (15); as coordenadas (X e Y) de cada marco anatômico, que serviram como base para as análises estatísticas; o diretório do arquivo da imagem da asa fotografada, pois é necessário para que estes arquivos sejam encontrados pelo próximo *software* a ser utilizado, o TPSRel; a escala preestabelecida, para que todas as imagens estejam padronizadas

Os arquivos TPS, abertos pelo aplicativo “Bloco de Notas” do Windows, sofreram alterações para que estes fossem posteriormente utilizados em outro software, denominado TPSRel. Nestas alterações, os dados morfométricos de cada digitalização, de cada asa, de cada indivíduo, foram compilados em um só arquivo. No entanto, foi feita uma divisão destes arquivos pelas Regiões citadas na

metodologia de coleta, resultando assim em um arquivo para a Região 1 (R1), um para a Região 2 (R2), um para a Região 3 (R3) e um para a Região 4 (R4). Posteriormente, foram criados mais dois arquivos para as localidades de *T. occidentalis* das regiões Paraná (PA) e Tocantins (TO).

Além disso, foi feita a divisão dos arquivos, de cada Região, por espécie, gerando um arquivo TPS para *T. triangulum* e um para *T. occidentalis*, já que as duas espécies foram coletadas naquele local. Todas estas alterações nos arquivos TPS e reorganizações dos mesmos foram necessárias para que pudessem ser utilizados corretamente no *software* TPSRel para os testes estatísticos.

No *software* TPSRel (Figura 3) foram abertos estes novos arquivos .TPS citados anteriormente. Em seguida no TPSRel, foram utilizadas ferramentas dentro deste *software*, como: a *Consensus*; os *Partial Warps*; e os *Relative Warps*, para obter os respectivos dados morfométricos e estatísticos iniciais.

O TPSRel, também gerou um relatório, chamado “Report”, que mostra todos os dados, por escrito, que foram gerados em cada análise realizada. Além destes dados anteriormente citados, através da ferramenta “Save” no TPSRel, outros dados foram obtidos, como, a matrix peso, o tamanho do centroide, a *Relative Warp Scores Matrix*.

Posteriormente, todos esses dados gerados no TPSRel, como a *matriz* peso, o *Relative Warps Score Matrix*, o Tamanho do Centroide, o consenso, o *Principal Warps*, foram exportados para o Excel e organizados em planilhas. Estes dados se utilizaram, posteriormente, nas análises estatísticas.

### 3.7 Método de Superimposição dos Quadrados Mínimos de Procrustes

Primeiramente, antes de qualquer análise, foi feita uma Superimposição de Procrustes, no qual, o *conjunto* de coordenadas, ou seja, a forma, de cada asa sofre uma rotação, uma translação e uma uniformização da escala. Assim, é possível diminuir ao máximo a diferença de medida da forma, ou seja, os valores da distância de Procrustes entre cada objeto, neste caso, cada asa. Portanto, todos os *sets* de coordenadas ficam no mesmo tamanho, posição e orientação.

### 3.8 Análise dos Componentes Principais (PCA)

A Superimposição de Procrustes, acompanhado de a Matriz de Covariância, serviram como base para a realização da Análise de Componentes Principais (PCA), que não é exatamente uma análise estatística, mas sim uma análise exploratória dos dados. Na PCA são encontradas variáveis hipotéticas, ou componentes, representando ao máximo a variação nos dados multivariados (HARPER, 1999). Estas novas variáveis são combinações lineares das variáveis originais. A PCA é usada para que os dados sejam reduzidos a somente duas variáveis, os dois primeiros componentes, para propósitos de plotagem de gráficos. A PCA encontra os autovalores e os autovetores da matriz de variância-covariância. Estes autovalores dão a medida da variação representada pelos correspondentes autovetores (componentes). Além disto, a percentagem da variação representada por estes componentes também é dada.

Ainda na PCA, é feita uma replicação, neste caso 10.000, do *bootstrap*, no qual os componentes *bootstrapped* são reordenados e revertidos para aumentar a correspondência com os eixos originais (PERES-NETO *et al.*, 2003).

### 3.9 Análise das Variáveis Canônicas (CVA)

Em seguida, foi feito uma Análise de Variáveis Canônicas usando como base a matriz peso. Na CVA, há uma descrição das diferenças entre os grupos especificados *a priori* em um conjunto de dados multivariados. Este método também reduz a dimensionalidade dos dados, tentando obter combinações lineares das características originais correlacionadas denominadas variáveis canônicas, sendo que a variação entre essas variáveis seja zero, ou nula (KHATTREE; NAIK, 2000).

Portanto, esta análise foi realizada para a verificação da posição dos grupos no espaço multivariado decorrente das variáveis canônicas, assim como localizar e descrever as deformações das asas (KHATTREE; NAIK, 2000).

Para a realização desta análise, foi utilizado o *software* MorphoJ versão 1.06d (KLINGENBERG, 2010). Foram utilizados um total de 357 indivíduos para a análise entre as duas espécies, *T. triangulum* e *T. occidentalis*. Já para a análise entre as localidades de *T. triangulum*, foram utilizados 286 indivíduos. Por último, para a análise entre as localidades de *T. occidentalis*, foram utilizados 71 indivíduos.

### 3.10 Análise Discriminante

É uma análise que busca fazer uma classificação das observações desconhecidas, além de, na discriminação de grupos, procurar quais as variáveis apresentam uma maior importância para tal discriminação.

Para esta análise, é necessário que os grupos já estejam pré-estabelecidos e conhecidos, e também que tenham sido feitas classificações corretas das observações.

Na Análise Discriminante, para as comparações entre dois grupos, sejam localidades de uma espécie ou duas espécies diferentes, foram calculadas as distâncias Mahalanobis entre as duas médias multivariadas.

### 3.11 Distância de Mahalanobis

Em estatística, a Distância de Mahalanobis é baseada nas correlações entre variáveis com as quais distintos padrões podem ser identificados e analisados. É uma estatística útil para determinar a similaridade entre uma amostra desconhecida e uma conhecida.

Segundo Manly (2004 *apud* JARAMILLO *et al.*, 2015), utiliza-se a valores da distância de Mahalanobis para uma classificação *jackknife* e *cross-validated*, onde aloca-se cada indivíduo em seu grupo mais próximo sem utilizá-lo a determinar o centro do grupo. O estimador *jackknife* de um parâmetro é encontrado, deixando de fora sistematicamente cada observação a partir de um conjunto de dados e calculando a estimativa e, em seguida, encontrando a média destes cálculos.

Os dados em ambos os grupos a comparar deverão ter o mesmo número de variáveis, no entanto, não necessita o mesmo número de elementos.

As distâncias de Mahalanobis permitem observar não apenas as variações (variância), mas também a covariância. Outra vantagem de usar a medida de Mahalanobis para discriminar é que as distâncias são calculadas em unidades de desvio-padrão a partir da média do grupo, o que faz com que a elipse englobante calculada formada à volta do *cluster* defina a zona de um desvio-padrão. Isto permite ao analista atribuir uma probabilidade estatística a essa medida. Em teoria, amostras com valores da distância de Mahalanobis de 3, são classificadas como não-membros do grupo em causa. Contudo, as amostras com valores da distância de

Mahalanobis de até 1, apresentam uma grande possibilidade de serem classificados como membros do grupo em causa (MANLY, 2004; MAHALANOBIS, 1936).

### **3.12 Regressão e Permutação**

Segundo Jaramillo *et al.* (2015), utiliza-se as estimativas de tamanho global com a finalidade de avaliar as contribuições para a discriminação específica, baseadas na forma, ao passo que esta avaliação é realizada utilizando-se uma regressão Multivariada da forma da asa no tamanho da asa. Ainda segundo Jaramillo *et al.* (2015), a significância estatística desta regressão é avaliada através da utilização de um procedimento matemático, denominado Permutação. Neste caso específico, o número de permutações necessárias para o teste da significância é de dez mil.

### **3.13 Softwares utilizados**

Para a realização da Análise Discriminante, da Análise das Variáveis Canônicas (CVA) e da PCA, foram utilizados o software MorphoJ v 1.06d e o PAST 3.

O software MDSht D50 foi utilizado para realizar as marcações dos marcos anatômicos nas imagens das asas, e para realizar as medidas morfométricas baseando-se nesses marcos anatômicos.



## **4 Resultados**

### **4.1 Análise de Componentes Principais (PCA) para variação interespecífica e intraespecífica de *Tabanus triangulum* e *Tabanus occidentalis*”.**

Neste gráfico (Figura 5A) é observado que a localidade de *T. occidentalis* da região do Pará (PA) apresenta valores do Componente Principal 1 bem maiores do que as localidades TO de *T. occidentalis* e R1, R2, R3, R5 de *T. triangulum*. Isto sugere que a localidade de *T. occidentalis* da região do Pará, tem uma direção de variação diferente das demais localidades assim como uma diferença na forma da asa.

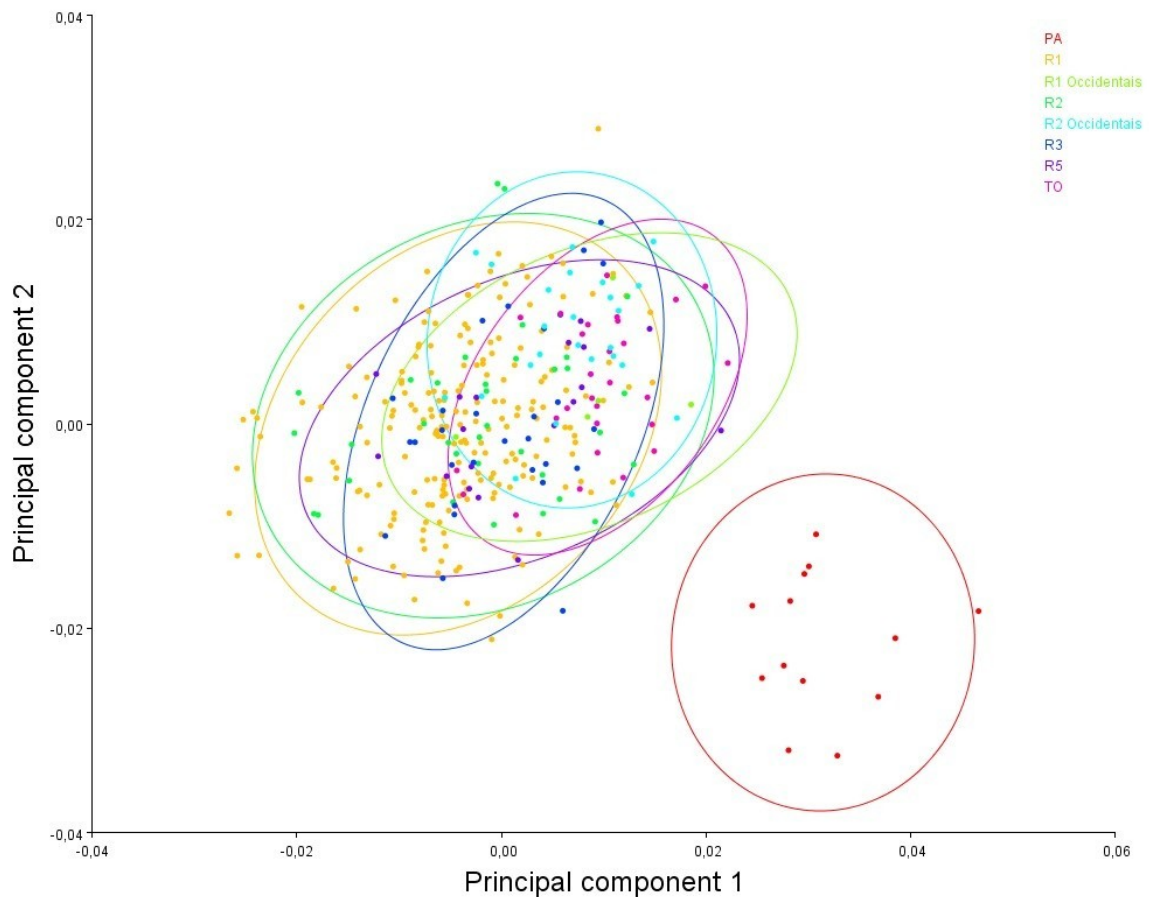


Figura 5A - Valores obtidos da Análise dos Componentes Principais (PCA) a partir da Matriz de Peso relacionada a todos os 357 indivíduos do estudo. Eixo X = Componente Principal 1 e; eixo Y = Componente Principal 2. *T. triangulum* (pontos laranjas = R1, pontos verdes = R2, pontos azul escuro = R3, pontos roxos = R5) e *T. occidentalis* (pontos vermelhos = PA, pontos rosa = TO, pontos verde claro = R1 *occidentalis*, pontos azul claro = R2 *occidentalis*)

Observa-se na figura 5B, que dentro de *T. triangulum* não se tem uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as localidades, quanto a forma da asa, já que todas as elipses estão proximamente agrupadas em um mesmo quadrante do plano cartesiano. Portanto, é possível concluir que *T. triangulum* é uma espécie homogênea.

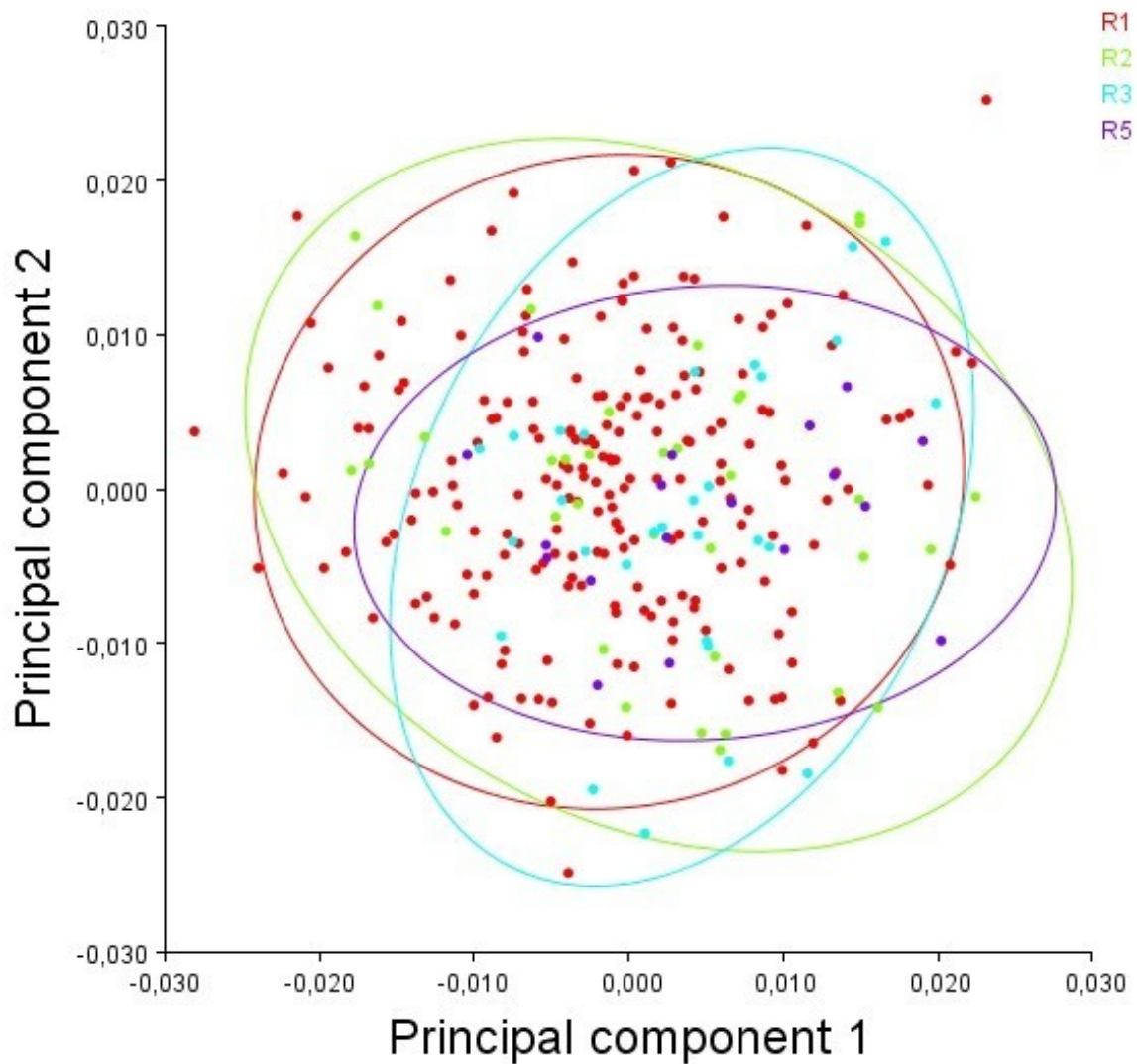


Figura 5B - Valores obtidos da Análise dos Componentes Principais (PCA) a partir da Weight Matrix relacionada a todos os 357 indivíduos do estudo. Eixo X = Componente Principal 1 e; eixo Y = Componente Principal 2. Localidades de *T. triangulum* (pontos vermelhos = R1, pontos verde claro = R2, pontos azul claro = R3 e pontos azul escuro (R5)

Já na Figura 5C é observado que somente a localidade de *T. occidentalis* da região do Pará (PA) apresenta valores do Componente Principal 1 bem maiores do que as outras localidades (R1, R2 e TO) de *T. occidentalis*. Sugerindo que a localidade de *T. occidentalis* do PA apresenta uma forma da asa bastante diferente das demais analisadas.

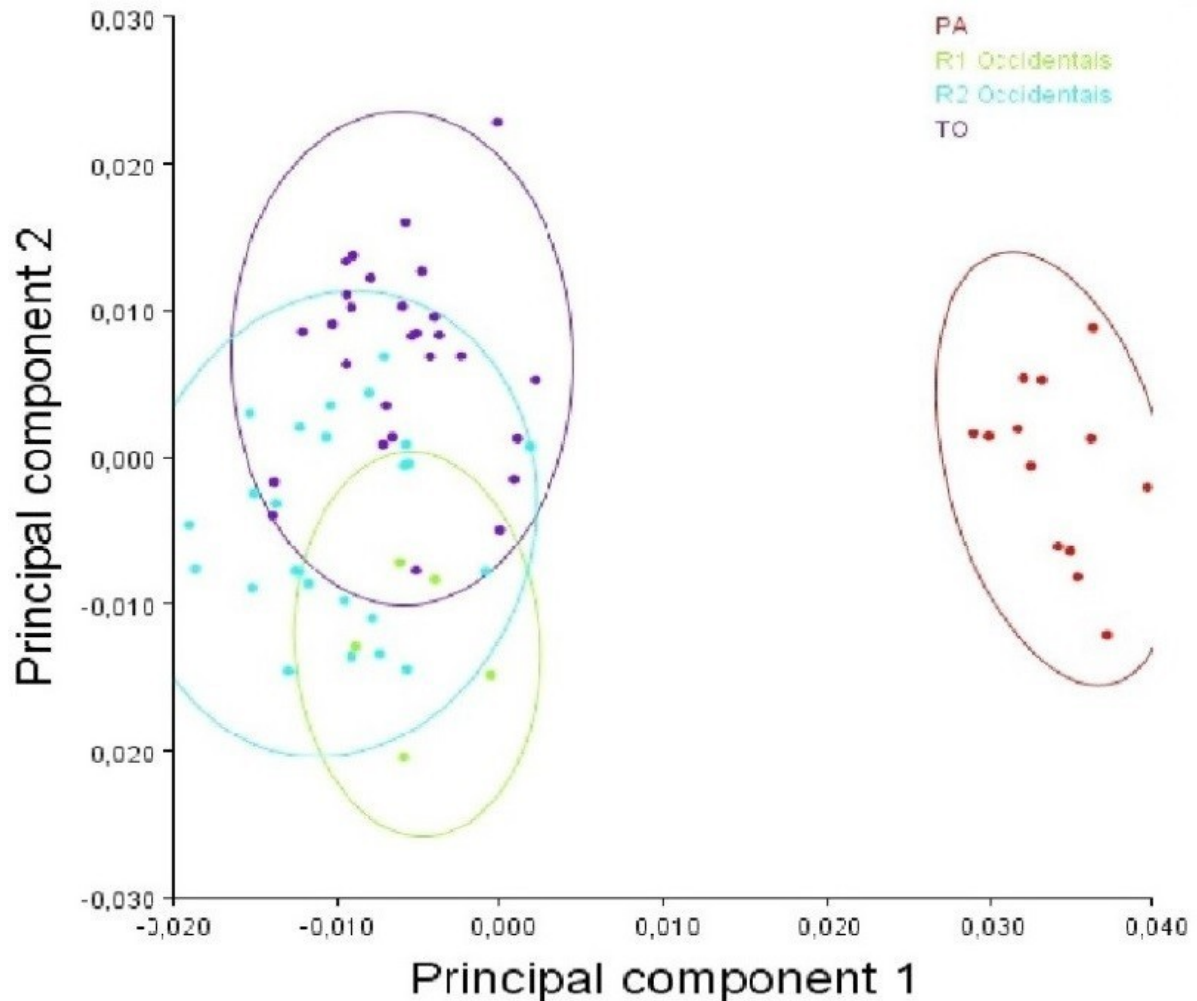


Figura 5C - Valores obtidos da Análise dos Componentes Principais (PCA) a partir da Weight Matrix. Eixo X = Componente Principal 1 e; eixo Y = Componente Principal 2. Localidades de *T. occidentalis*. Pontos vermelhos = PA, pontos verde claro = R1 occidentalis, pontos azul claro = R2 occidentalis e pontos azul escuro = TO

Em seguida temos como resultado o diagrama de deformação (Figura 6). Neste gráfico é possível observar as diferenças de posição dos marcos anatômicos das asas entre dois grupos comparados, além de ilustrar a deformação na forma da asa que esta diferença de posição causa.

Neste gráfico (6A), observa-se que a mudança na forma da asa, em relação a componente principal 1 (PC1) ocorre em todos os marcos anatômicos, com diferentes intensidades e direções. Essas mudanças são observadas a partir da comparação da forma da asa entre a espécie *T. triangulum* e *T. occidentalis*. Dentre estas mudanças (Figura 6A), temos os marcos anatômicos 2, 3, e 15 que apresentam uma variação na forma em direção a porção anterior da asa, fazendo com que esta região da asa seja mais alongada. Já os marcos anatômicos 7 e 8 demonstram uma deformação na asa em direção a porção posterior apical, fazendo

com que a asa se torne mais larga e abalorada nesta região. Os marcos anatômicos 9, 11 e 12 demonstram uma deformação em direção a porção posterior da asa e ao mesmo tempo para o interior da asa, fazendo com que a asa se torne mais estreita nesta região (Figura 6A). Os marcos anatômicos 10, 13 e 14 demonstram uma deformação em direção a porção superior da asa, fazendo com que a asa seja mais estreita (Figura 6A).

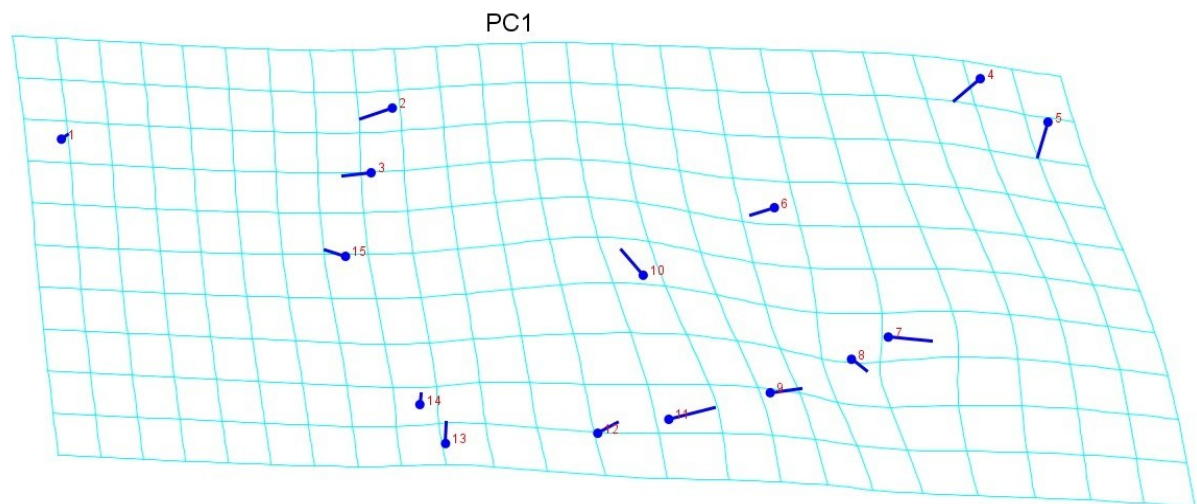


Figura 6A - Diagrama de Deformação derivado da PC1 entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*; Os vetores azuis representam as deformações da configuração de *T. triangulum* em relação à configuração de *T. occidentalis* e a grade clara representa as deformações nas asas de *T. triangulum*

No diagrama de deformação derivado do componente principal 1 (PC1) entre as localidades de *T. triangulum* (Figura 6B), nota-se que os marcos anatômicos 1, 2 e 3 apresentam uma deformação na forma com direção para a região anterior da asa. Já os marcos anatômicos 4 e 5, apresentam uma deformação intensa com direção para a base da asa, fazendo com que o ápice da mesma se torne pontiagudo (Figura 6B). O marco anatômico 6 tem uma deformação em direção ao centro da asa. Os marcos anatômicos 9, 11 e 12 apresentam deformação com direção para a região posterior da asa (Figura 6B). O marco anatômico 10 tem uma deformação com direção para a região superior da asa (Figura 6B). Já os marcos anatômicos 13 e 14, a deformação está com direção para o centro da asa, tornando essa região inferior da asa mais curta, e a asa como um todo mais estreita (Figura 6B). Por fim, o marco anatômico 15 deforma-se para a porção anterior da asa (Figura 6B)

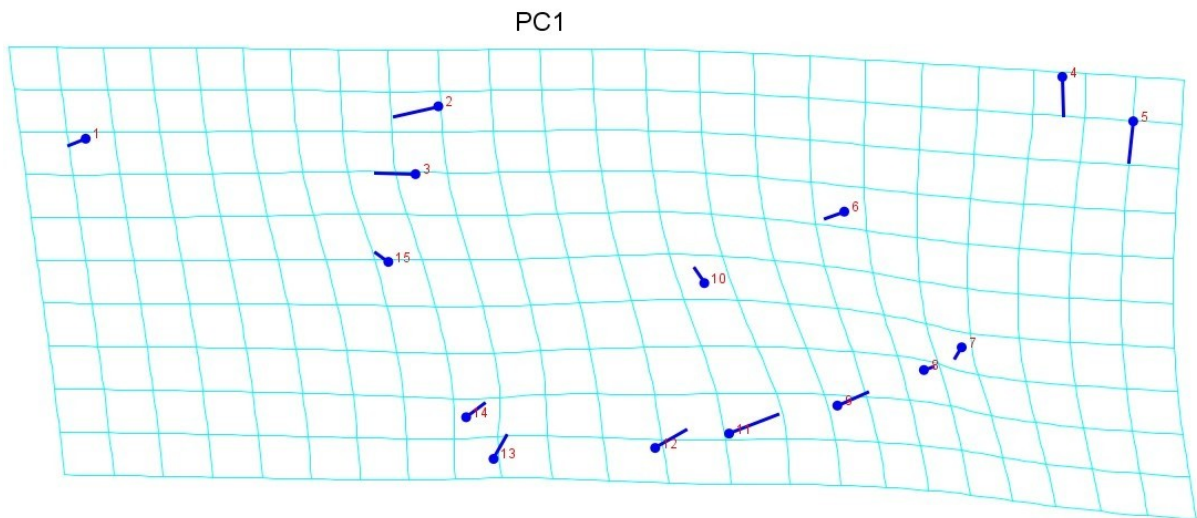


Figura 6B - Diagrama de Deformação derivado da PC1 entre as localidades de *T. triangulum*. Os vetores azuis representam as deformações da configuração das localidades de *T. triangulum* com a configuração consenso da espécie e a grade clara apresenta a deformação na asa de *T. triangulum*.

Na Figura 6C, nota-se uma grande deformação da asa na região dos marcos anatômicos 4 e 5 com direção para região anterosuperior da asa, 7 com direção para o ápice da asa, 8 com direção para região inferior da asa e o 10 com direção para região central da asa.

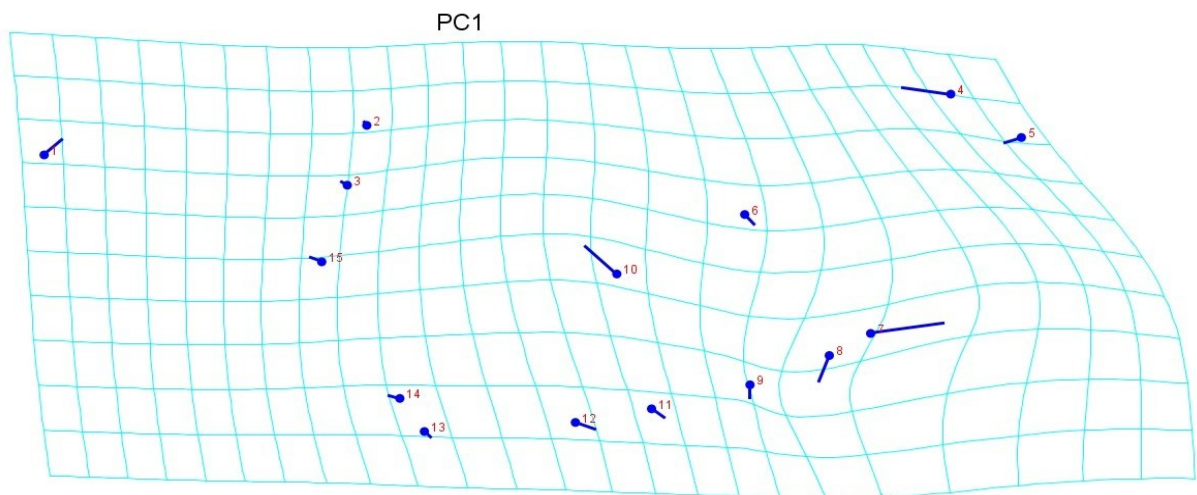


Figura 6C - Diagrama de Deformação derivado da PC1 entre as localidades de *T. occidentalis*. Os vetores azuis representam as deformações da configuração das localidades de *T. occidentalis* com a configuração consenso da espécie e a grade clara apresenta a deformação na asa de *T. occidentalis*.



#### **4.2 Análise da Regressão entre *T. occidentalis* e *T. triangulum* e entre suas respectivas localidades**

Na Análise da Regressão e Alometria, a variável dependente é a coordenada de Procrustes que vai de 1 a 30, e a variável independente é o log do tamanho do centroide. Os resultados obtidos onde temos a relação entre estas duas variáveis estão ilustrados na figura 7. Com estes dados, constata-se que não existe uma alometria na variação da forma da asa quando comparadas as espécies *T. triangulum* e *T. occidentalis*, ou seja, esta variação é isométrica. Esta isometria demonstra que todas as variações em todos os marcos anatômicos seguem uma proporção entre si. Temos como resultado os valores da análise de regressão, onde são relacionados o log do tamanho do centroide com a coordenada de Procrustes 1 (Procoord 1) (Figura 7B e 7C) e relacionados log do tamanho do centroide e valor da regressão 1 (RS1) (Figura 7A) gerando um plano cartesiano onde estão localizados os indivíduos de cada localidade, de cada espécie.

Na figura 7A, nota-se de forma mais ampla que *T. triangulum* e *T. occidentalis* no geral tem suas localidades próximas entre si ( $p < 0,05$ ) posicionando-se no quadrante superior direito com valores positivos no Log do tamanho do centroide (eixo X) e no valor da regressão 1 (RS1) (eixo Y) do plano cartesiano. Ainda na Figura 7A, tem como exceção a localidade do Pará que está distante de todas as demais localidades analisadas, localizando-se no quadrante inferior esquerdo com valores negativos tanto para o eixo X quanto para o eixo Y.

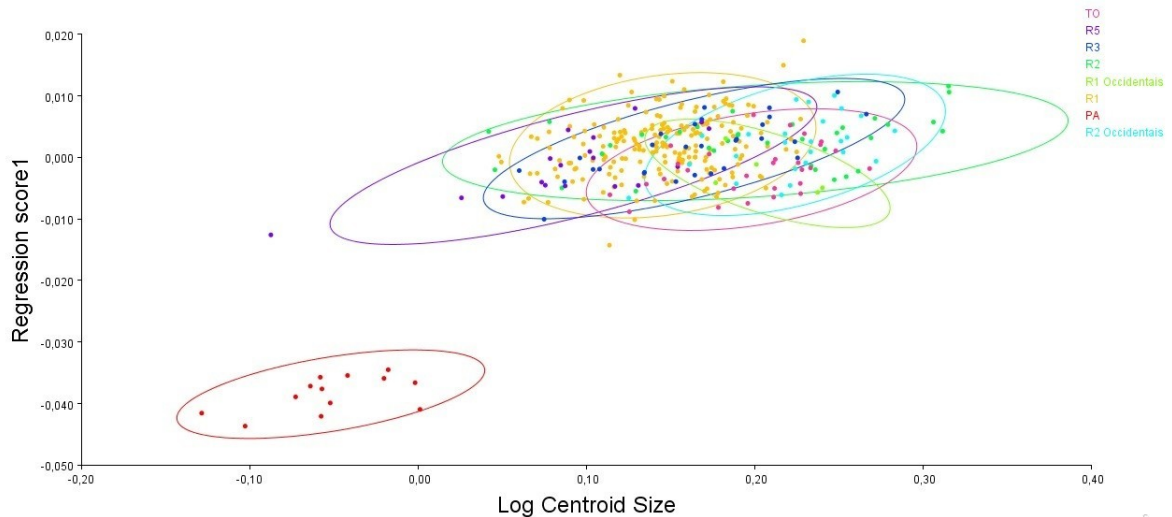


Figura 7A - Valores da Regressão e Alometria, no qual Log do Tamanho do Centroide e Valores de Regressão 1 são relacionados. Eixo X = Log do Tamanho do Centroide e Eixo Y = Valores da Regressão 1, *T. occidentalis* PA = Vermelho, *T. occidentalis* R1 = Verde Musgo, *T. occidentalis* R2 = Azul Claro, *T. triangulum* R2 = Verde Claro, *T. triangulum* R3 = Azul Escuro, *T. triangulum* R5 = Roxo, *T. occidentalis* TO = Rosa. Elipses de Igual Frequência (Probabilidade 0,95).

De uma forma mais específica, analisando as espécies separadamente, de acordo com o log do tamanho do centroide, *T. triangulum* é uma espécie, no geral, homogênea, apresentando diferenças significativas somente entre R1 e R5, e R2 e R5 (Figura 7B).

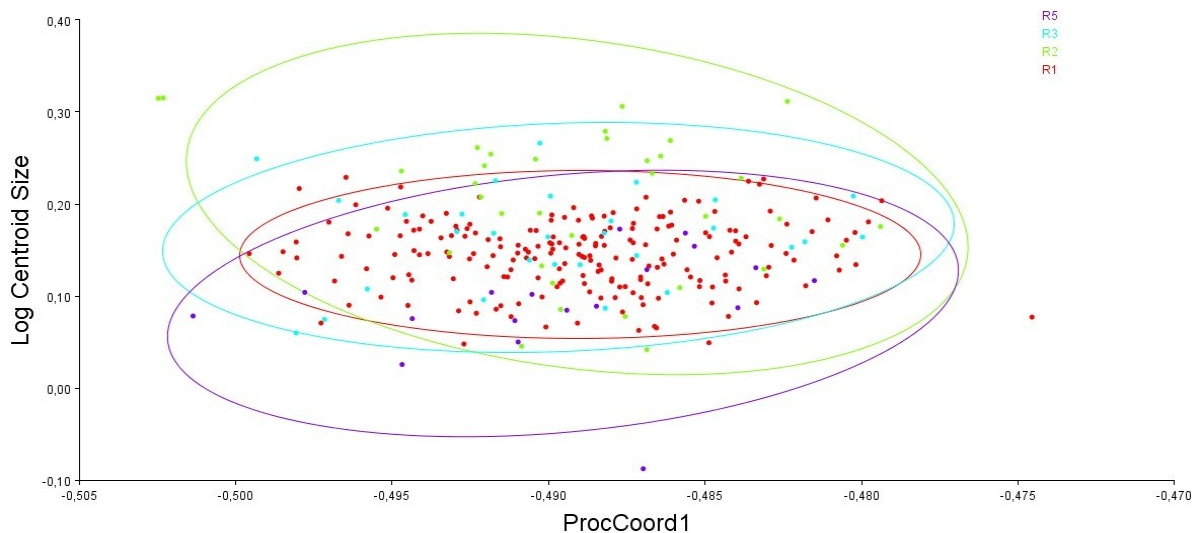


Figura 7B - Valores da Regressão e Alometria, no qual Log do Tamanho do Centroide e Valores de Regressão 1 são relacionados. Eixo X = ProcCoord 1. Eixo Y = Log do Tamanho do Centroide, R1 = vermelho, R2 = verde, R3 = azul e R5 = roxo. Elipses de Igual Frequência (Probabilidade 0,95).

Já no caso de *T. occidentalis* percebe-se que a localidade do PA está distante das demais no gráfico (Figura 7C). Isto mostra que PA é uma localidade



completamente diferente das demais quanto a forma da asa. Ambos os dados corroborando com a figura 7A.

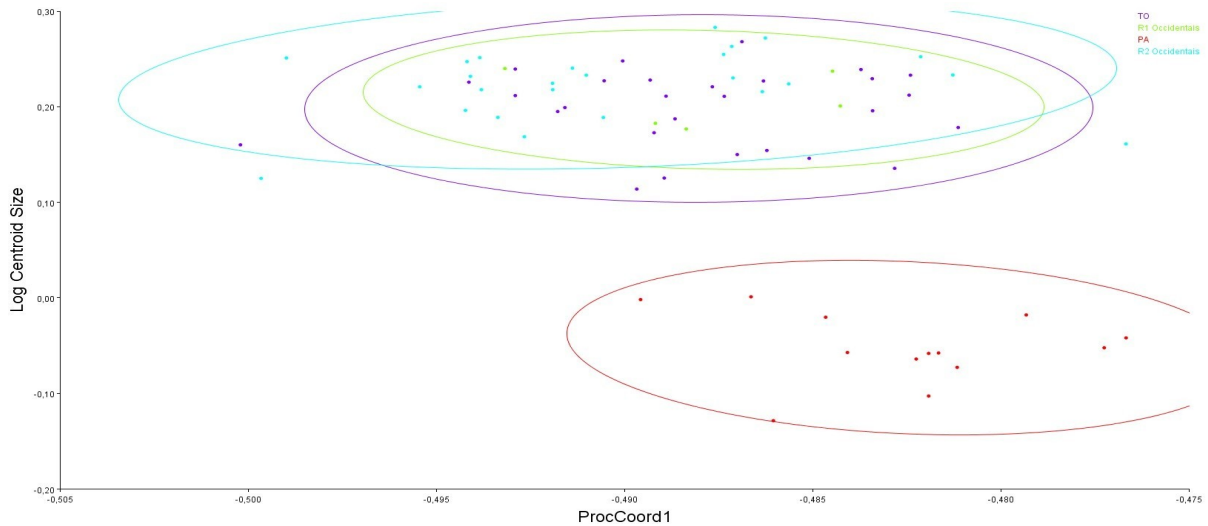


Figura 7C - Valores da Regressão e Alometria, no qual Log do Tamanho do Centroide e Valores de Regressão 1 são relacionados. Eixo X = Procoord 1, Eixo Y = Log do Tamanho do Centroide, Tocantins = Roxo, R1 *occidentalis* = Verde, PA = Vermelho, R2 *occidentalis* = Azul. Elipses de Igual Frequência (Probabilidade 0,95).

Ainda na Análise da Regressão e Alometria, temos o diagrama de deformação que demonstra a mudança na forma da asa entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*, considerando o log do tamanho do centroide (Figura 8).

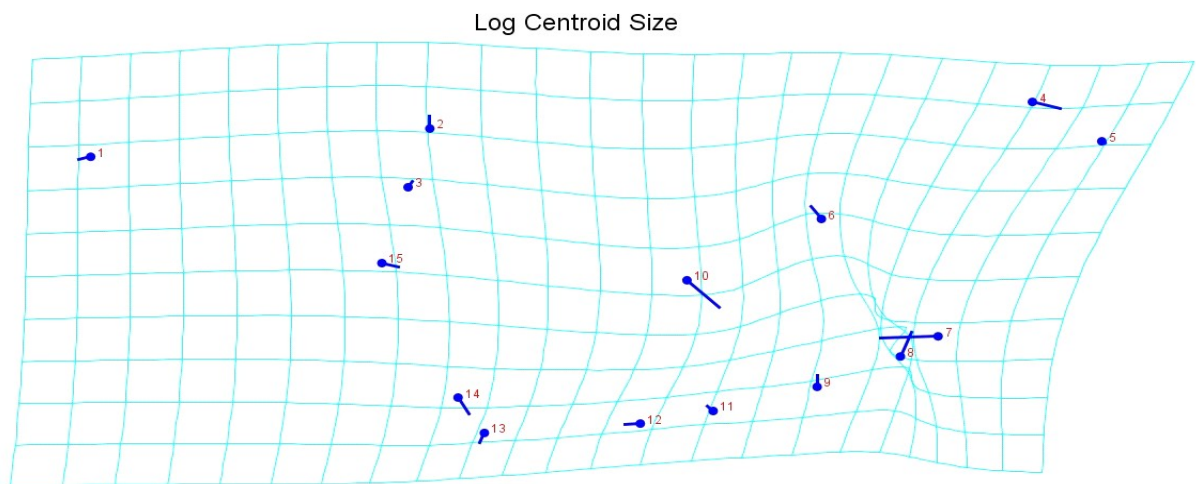


Figura 8 - Diagrama de deformação resultante da Análise de Regressão e Alometria entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*, levando em consideração o log do tamanho do centroide. Os vetores azuis representam as deformações da configuração de *T. triangulum* em relação à configuração de *T. occidentalis*, e a grade azul representa as deformações na asa de *T. triangulum*.

### 4.3 Análise da Variável Canônica (CVA) entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*

Foi feita uma análise da variação entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*, e entre suas respectivas localidades, com escala a partir do inverso da variação dentro do grupo. O resultado obtido está ilustrado a seguir (Tabela 4). Observa-se que a variável canônica 1 (CV1) apresenta um Autovalor de 1,606.

A CVA entre as localidades de *T. triangulum* (Tabela 4), forneceu 3 variáveis nas quais a CV1 explica 69,9%, a CV2 explica 22,2% e a CV3 explica 7,9% da variação entre as localidades de *T. triangulum*.

Já entre as localidades de *T. occidentalis* (Tabela 4), foram fornecidas 3 CVAs, nas quais a CV1 explica mais de 85%, a CV2 explica 11,8% e a CV3 explica 2,9% da variação dentro de *T. occidentalis*.

Tabela 4 – Análise de Variáveis Canônicas em *T. triangulum* e *T. occidentalis*, interespecificamente e intraespecificamente

	Variável Canônica	Autovalores	% Variância	% Acumulada
<i>T. triangulum</i> – <i>T. occidentalis</i>	CV1	1,606	100,0	100,0
<i>T. triangulum</i> - R1, R2, R3 e R5	CV1	0,67424864	69,859	69,859
	CV2	0,21448565	22,223	92,081
	CV3	0,07642890	7,919	100,000
<i>T. occidentalis</i> – R1, R2, TO e PA	CV1	27,35450866	85,204	85,204
	CV2	3,79129769	11,809	97,014
	CV3	0,95877866	2,986	100,000

Já o valor da distância de Mahalanobis entre os grupos *T. triangulum* e *T. occidentalis*, é de 3,1663 (Tabela 5). Pelo fato de o valor da distância de Mahalanobis ser maior que 3 (três), *T. triangulum* e *T. occidentalis* podem ser consideradas estatisticamente diferentes entre si, quando comparada a forma da asa.

O valor da distância de Procrustes entre os grupos *T. triangulum* e *T. occidentalis* é de 0,0169 (Tabela 5). Com este dado, observa-se também que as duas espécies podem ser consideradas diferentes, já que o valor da distância de Procrustes é maior que 0,01

Ainda na CVA, são obtidos os valores da distância de Mahalanobis entre os grupos (R1, R2, R3 e R5) de *T. triangulum* (Tabela 5).

Isto sugere que, de acordo com esse teste, a localidade R1 é discriminada de R5, pois a distância de Mahalanobis tem um valor maior que 3. Já nos outros casos, não são observados valores de Mahalanobis maiores que 3, mantendo as localidades destas comparações estatisticamente semelhantes entre si.

Já o valor da distância de Procrustes entre os grupos também foi obtida na CVA (Tabela 5). Esses valores da distância de Procrustes corroboram com os valores da distância de Mahalanobis, mostrando que somente R1 e R5 podem ser considerados diferentes entre si.

Ainda na CVA, são obtidos os valores da distância de Mahalanobis entre os grupos de *T. occidentalis* (Tabela 5). Além disso, temos os valores de significância para os testes de permutação (1000 permutações) para as distâncias de Mahalanobis entre os grupos (Tabela 5). Os valores de significância são  $<0,0001$  para valores da distância de Mahalanobis, em todas as comparações entre as localidades.

Isto sugere que, de acordo com esse teste, todas as localidades são diferentes entre si quanto a forma da asa, pois a distância de Mahalanobis tem um valor maior que 3. A maior diferença observada foi a da localidade de PA em relação a todas as outras, apresentando valores de distância de Mahalanobis maiores que 10.

Ainda assim, os valores de significância mostram que provavelmente todas as localidades são significativamente diferentes entre si, por apresentarem valores abaixo de 0,0001.

Já o valor da distância de Procrustes entre os grupos também foi obtida na CVA (Tabela 5). Além disso temos os valores de significância para os testes de permutação (1000 permutações) para as distâncias de Procrustes entre os grupos (Tabela 5).

Os valores de significância para as comparações entre as duas espécies, e entre as localidades de *T. triangulum* não foram gerados pelo MorphoJ.

Tabela 5 – Distância Mahalanobis e Procrustes Distances, e seus respectivos p-valores, da Análise de Variáveis Canônicas entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*, e suas localidades.

Análise de Variáveis Canônicas	Comparações	Distância Mahalanobis	p-valores	Distância de Procrustes	p-valores
	<i>T. triangulum</i> e <i>T. occidentalis</i>	3,1663		0,0169	
<i>T. triangulum</i>	R1 x R2	1,4460		0,0045	
	R1 x R3	1,8077		0,0070	
	R1 x R5	1,4465		0,0109	
	R2 x R3	3,0333		0,0050	
	R2 x R5	2,8660		0,0099	
	R3 x R5	2,1868		0,0071	
	R1 occid - PA	12,7626	<0,0001	0,0415	0,0003
<i>T. occidentalis</i>	R2 occid - PA	13,6285	<0,0001	0,0443	<0,0001
	R2 occid – R1 occid	4,6322	<0,0001	0,0123	0,0604
	TO - PA	13,1107	<0,0001	0,0409	<0,0001
	TO – R1 occid	6,4249	<0,0001	0,0204	<0,0001
	TO – R2 occid	3,9171	<0,0001	0,0128	<0,0001

Já os valores das variáveis canônicas, são ilustrados a seguir nas Figuras 9A, 9B e 9C.

Na figura 9A está ilustrado a relação entre a variável canônica 1 com a frequência (número de indivíduos), entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*. Observou-se que na grande maioria dos indivíduos, *T. occidentalis* e *T. triangulum* são claramente discriminadas entre si, mesmo com uma pequena porção dos indivíduos se sobrepondo (Figura 9A).

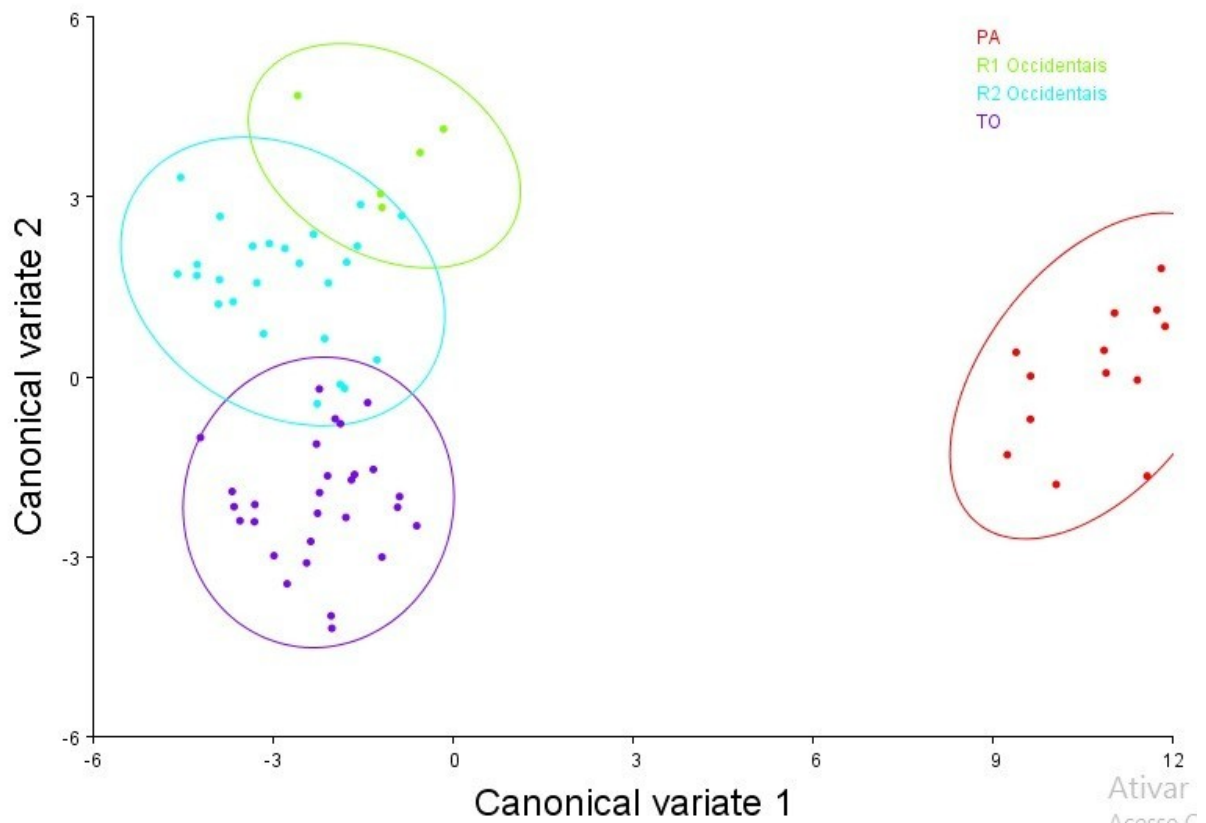


Figura 9A - Valores da Variável Canônica entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*: eixo X = Variável Canônica 1; eixo Y = Frequência; Barras Vermelhas = *T. triangulum*; Barras Azuis = *T. occidentalis*

Já os valores das variáveis canônicas entre as localidades de *T. triangulum* é ilustrado a seguir (Figura 9B). Neste gráfico está ilustrado a relação entre a variável canônica 1 e a variável canônica 2, entre grupos (R1, R2, R3 e R5) de *T. triangulum*. Se comparado ao dos valores de PC, nota-se que as elipses das localidades não ficam agrupadas, apresentando diferenças maiores entre as mesmas ( $p < 0,05$ ). Os indivíduos da localidade R5 encontram-se na direita do plano cartesiano, apresentando valores da CV1 entre 1 e 3,9, com a elipse alongada verticalmente em relação a CV2 ( $p < 0,05$ ). Já os indivíduos da localidade R3 encontram-se entre valores da CV1 de 0,9 e 3, e entre valores da CV2 de -2,5 e 2, com um *outlier* com valor 4 ( $p < 0,05$ ). A Elipse de R3 bem alongada em relação a CV2, e mais estreita em relação a CV1 ( $p < 0,05$ ). Em seguida, os indivíduos da localidade R2 encontram-se dispostos no centro do gráfico, mas com sua elipse alongada diagonalmente em direção aos valores mais altos de CV1 e CV2 ( $p < 0,05$ ). Por fim, os indivíduos da R1 encontram-se mais ao centro do gráfico, com valores da CV1 entre -1 e 3 e valores da CV2 entre -2,4 e 3. A elipse de R1 está centralizada no gráfico ( $p < 0,05$ ) (Figura 9B).

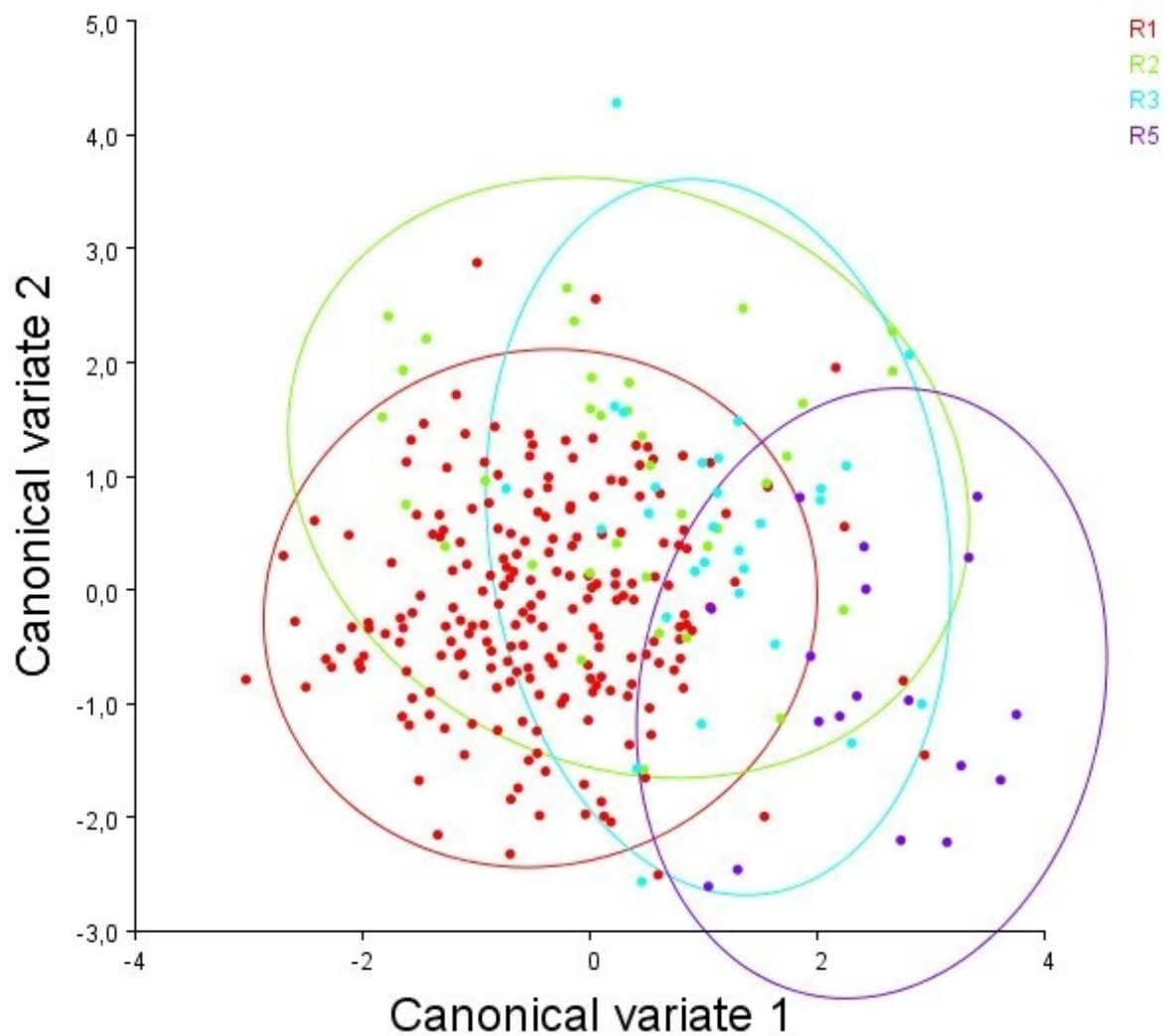


Figura 9B - Valores da Variável Canônica entre localidades de *T. triangulum*: eixo X = Variável Canônica 1; eixo Y = Variável Canônica 2; Vermelho = R1; Verde = R2; Azul = R3; Roxo = R5

Por fim, os valores da CV entre as localidades de *T. occidentalis* são ilustrados na Figura 9C. Nota-se, na Figura 9C, mais uma vez que todas as localidades são diferentes entre si, com pequenas porções das elipses se sobrepondo. Uma exceção na sobreposição das elipses é a da região PA, que se dispõe bem distante das demais no plano cartesiano, com valores da CV1 bem maiores, entre 9 e 12, que as demais localidades de *T. occidentalis* (Figura 9C).

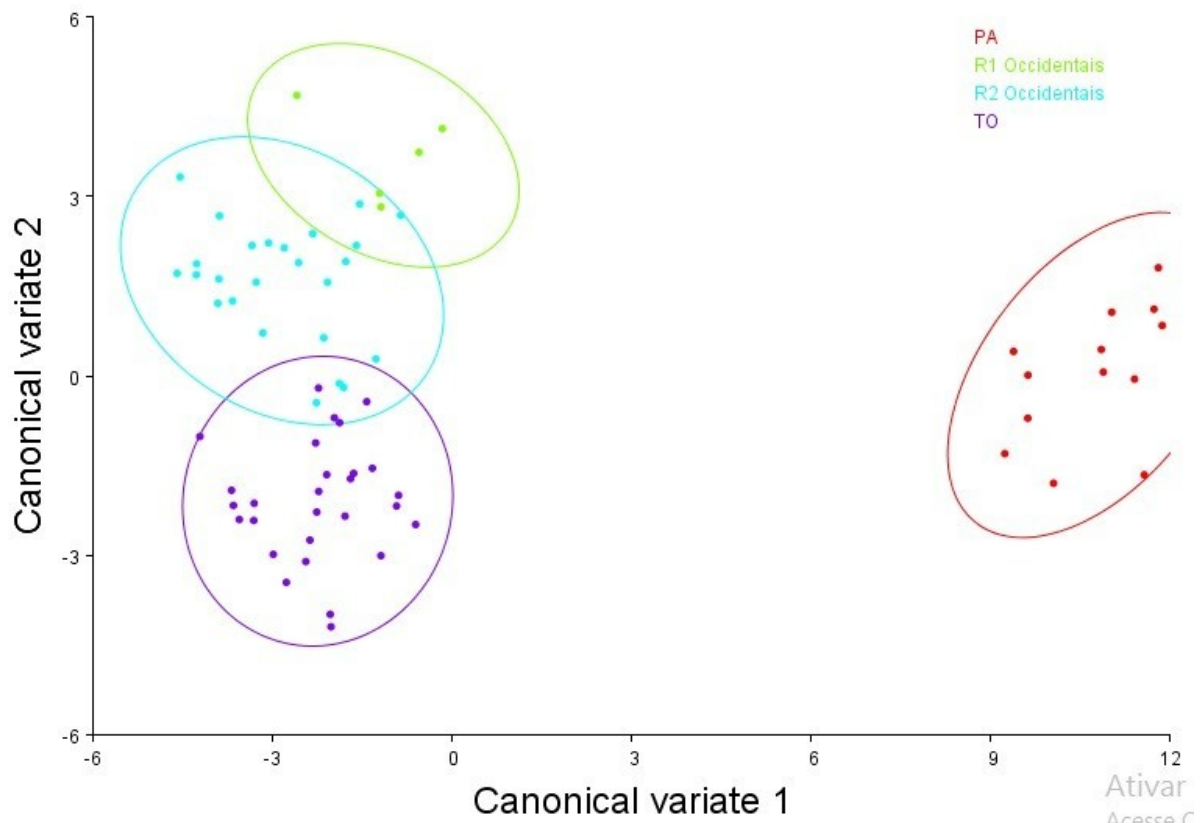


Figura 9C - Valores da Variável Canônica entre as localidades de *T. occidentalis*: eixo X = Variável Canônica 1; eixo Y = Variável Canônica 2; Vermelho = PA; Verde = R1occidentais; Azul = R2 *occidentalis*; Roxo = TO (C).

O gráfico do diagrama de deformação, derivado da CV1 é ilustrado na Figura 10A, onde demonstra as mudanças na forma da asa, através da visualização dos marcos anatômicos, em relação a variável canônica 1 (CV1). Nota-se de acordo com este gráfico, que as deformações nos marcos anatômicos da asa, comparando *T. occidentalis* e *T. triangulum*, apresentam uma direção contrária e menor intensidade quando comparado ao gráfico diagrama de deformação da PCA (Figura 10A). Ainda no gráfico diagrama de deformação da CVA, é observado que a deformação de maior intensidade ocorre na região póstero-inferior da asa (Figura 10A).



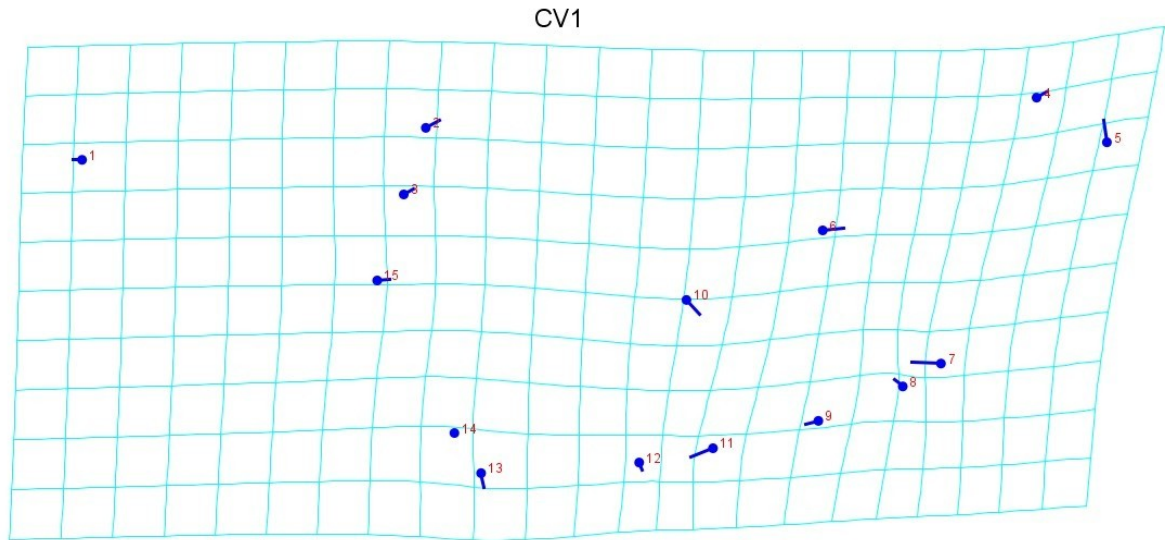


Figura 10A - Diagramas de Deformação derivados da CV1, mudança na forma da asa: entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*, considerando a posição dos marcos anatômicos, em relação a CV1. Os vetores azuis representam as deformações entre as configurações dos grupos comparados.

O gráfico do diagrama de deformação derivado da CV1 entre as localidades de *T. triangulum* é ilustrado na Figura 10B. Neste gráfico o Diagrama de deformação derivado da CV1, nota-se que comparado com o gráfico do PC diagrama de deformação derivado da PC1, as deformações são de menor intensidade, quase nula, e as direções destas deformações também são diferentes, em alguns casos até opostas. Isto indica que de acordo com a CVA, relacionando a CV1, que poucos marcos anatômicos (1, 2, 3, 4, 10 e 11) apresentam uma grande deformação (Figura 10B).

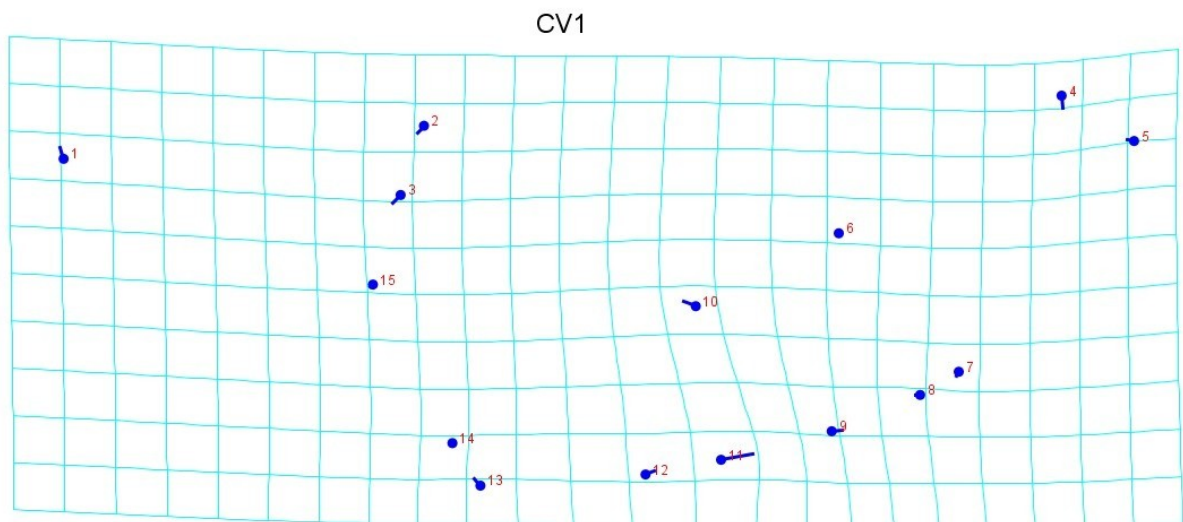


Figura 10B - Diagramas de Deformação derivados da CV1, mudança na forma da asa entre as localidades de *T. triangulum*. Os vetores azuis representam as deformações entre as configurações dos grupos comparados.



Entre as localidades de *T. occidentalis*, em relação a variável canônica 1 (CV1) (Figura 10C). De acordo com a Figura 10C as maiores diferenças na forma da asa, analisando a posição de cada marco anatômico, estão localizadas nos marcos anatômicos 4, com direção para a região superior da asa, 7 com direção para região posterior da asa, 8 com direção para a região inferior da asa e no 10, com direção para a região central da asa.

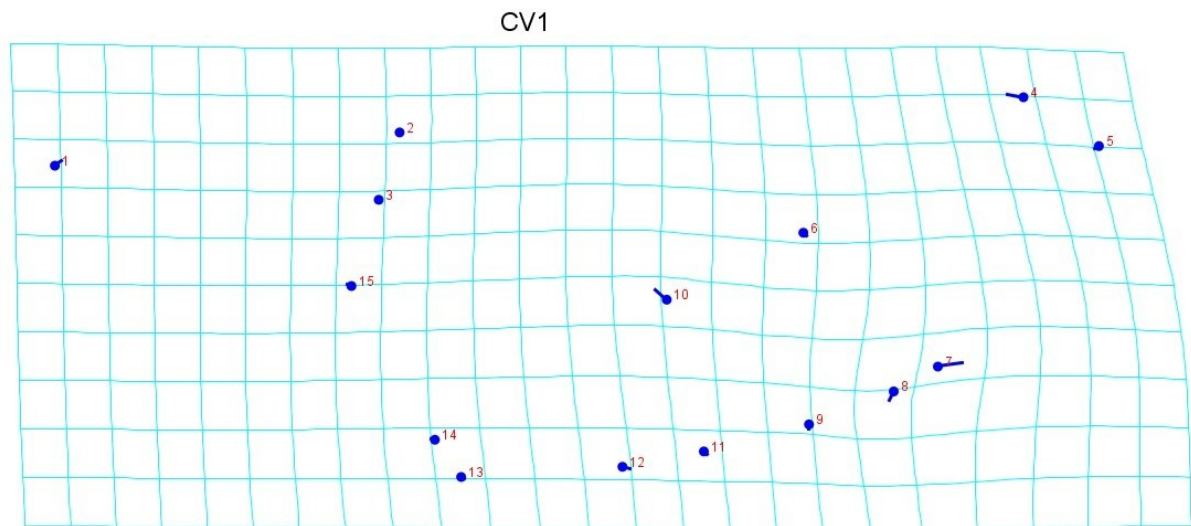


Figura 10C - Diagramas de Deformação derivados da CV1, mudança na forma da asa entre as localidades de *T. occidentalis*. Os vetores azuis representam as deformações entre as configurações dos grupos comparados.

#### 4.4 Análise Discriminante entre *T. triangulum* e *T. occidentalis* e dentro das mesmas, entre suas localidades.

Nesta análise, foram obtidos alguns resultados relacionados a discriminação entre *T. triangulum* e *T. occidentalis* (Tabela 6), entre as localidades de *T. triangulum* (Tabela 7) e entre as localidades de *T. occidentalis* (Tabela 8). Um resultado é a diferença entre médias, no qual temos os valores da distância de Procrustes, da distância de Mahalanobis, do t-quadrado, do nível de significância (paramétrico). Outro resultado apresentado nesta análise é o do nível de significância para testes de permutação (10.000 permutações) da distância de Procrustes, e do valor de t-quadrado.

As espécies *T. triangulum* e *T. occidentalis* apresentam formas distintas (Procrustes = 0,169; Mahalanobis = 3,166; T-Quadrado = 570,25;  $P < 0,0001$ ) (Tabela 6).

Tabela 6 - Diferença entre médias de *T. triangulum* e *T. occidentalis*.

	Distância de Procrustes	Distância Mahalanobis	T-Quadrado	P-valor (paramétrico)	P-valor para 1000 permutações: Distância de Procrustes	P-valor para 1000 permutações: T-Quadrado
<i>T. triangulum</i> – <i>T. occidentalis</i>	0,1693121	3,1663	570,25	<0,0001	<0,0001	<0,0001

As comparações que não apresentam distinção na forma são R1-R2 (Procrustes = de 0,0045; Mahalanobis aproximadamente = 1,50; T-Quadrado = 66,43; P=0,0007), R1-R3 (Procrustes =0,0070; Mahalanobis = 1,82; T-Quadrado = 84,28; P<0,0001), R2-R3 (Procrustes = 0,005; Mahalanobis = 1,59; T-Quadrado = 40,3168; P=0,5757), e R3-R5 (Procrustes = 0,007; Mahalanobis = 2,66; T-Quadrado = 78,4; P=0,2532) (Tabela 7).

Já as comparações que apresentam distinção na forma são R1-R5 (Procrustes = 0,0109; Mahalanobis = 3,22; T-Quadrado = 171,5304 P<0,0001), e R2-R5 (Procrustes = 0,01; Mahalanobis = 3,41; T-Quadrado = 137,8207; P=0,0069) (Tabela 7).

Tabela 7 - Diferença entre médias das localidades de *T. triangulum*.

	Distância de Procrustes	Distância Mahalanobis	T-Quadrado	P-valor	P-valor para 1000 permutações: Distância de Procrustes	P-valor para 1000 permutações: T-Quadrado
R1 – R2	0,00449870	1,4912	66,4351	0,0007	0,2090	<0,0001
R1 – R3	0,00704342	1,8219	84,2818	<0,0001	0,0050	<0,0001
R1 – R5	0,01090089	3,2203	171,5304	<0,0001	<0,0001	<0,0001
R2 – R3	0,00500599	1,5944	40,3168	0,5757	0,6560	0,5780
R2 – R5	0,00993243	3,4051	137,8207	0,0069	0,0130	0,0080
R3 – R5	0,00710540	2,6567	78,3902	0,2532	0,2300	0,2180

Segundo a tabela 8, todas as comparações apresentam distinção na forma da asa, a entre PA e R1 *occidentalis* (Procrustes = 0,041; Mahalanobis = 16,46; T-Quadrado = 978,54; P=0,3840), a entre PA e R2 *occidentalis* (Procrustes = 0,005; Mahalanobis = 15,89; T-Quadrado = 2183,774; P<0,0001), a entre PA e TO (Procrustes = 0,409; Mahalanobis = 17,91; T-Quadrado = 2847,12; P<0,0001), a entre R1 *occidentalis* e R2 *occidentalis* (Procrustes = 0,012; Mahalanobis = 8,71; T-Quadrado = 316,42; P=0,4771), a entre R1 *occidentalis* e TO (Procrustes = 0,204; Mahalanobis = 11,41; T-Quadrado = 552,77; P=0,0422), e a entre R2 *occidentalis* e TO (Procrustes = 0,013; Mahalanobis = 4,52; T-Quadrado = 269,906; P<0,0001)

Tabela 8 - Diferença entre médias das localidades de *T. occidentalis*.

Parâmetros Analisados na Análise Discriminante						
Comparações	Distância de Procrustes	Distância Mahalanobis	T-Quadrado	P-valor	P-valor para 1000 permutações: Distância de Procrustes	P-valor para 1000 permutações: T-Quadrado
PA – R1 occid	0,04145426	16,4615	978,5451	0,3840	<.0001	<.0001
PA – R2 occid	0,04425090	15,9792	2183,7739,	<.0001	<.0001	<.0001
PA – TO	0,04086596	17,9079	2847,1171	<.0001	<.0001	<.0001
R1 occid – R2 occid	0,01234490	8,7144	316,4188	0,4771	0,0560	0,4770
R1 occid – TO	0,02043658	11,4147	552,7697	0,0422	<.0001	0,0470
R2 occid – TO	0,01279142	4,5206	269,9064	<.0001	<.0001	<.0001

A Análise Discriminante também gera matrizes que compara um par de grupos mostrando a taxa de reclassificação entre os mesmos. Estes dados são entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*, (Tabela 9) entre as localidades de *T. triangulum* (Tabela 10) e entre as localidades de *T. occidentalis* (Tabela 11). Valores acima de 85% de reclassificação serão considerados suficientes para constatar uma distinção entre os grupos comparados.

Tabela 9 - Matriz da classificação na validação cruzada entre *T. triangulum* (Grupo 1) e *T. occidentalis* (Grupo 2). Número de indivíduos (n) à esquerda na célula; porcentagem de indivíduos (%) à direita na célula.

	Grupo 1 - Grupo 1	Grupo 1 - Grupo 2	Grupo 2 - Grupo 1	Grupo 2 - Grupo 2
Cross-validation	264 (92.3%)	22 (7.7%)	9 (12.7%)	62 (87.3%)

Estes resultados desta análise (Tabela 9), demonstram que mais uma vez, *T. triangulum* e *T. occidentalis* podem ser diferenciadas entre si, graças a morfometria geométrica. Isto porque a taxa de reclassificação de um grupo para ele mesmo é muitas vezes maior do que ele ser reclassificado para o outro grupo

Estes resultados da tabela 10 demonstram que a reclassificação de R1 para R2 foi baixa (27%), no entanto o contrário foi alto (51.4%). Já de R1 para R3 temos um valor baixo (23%) assim como o contrário (38%) (Tabela 10). No caso de R1 para R5 a reclassificação foi muito baixa (8%) e o contrário também (11%) (Tabela 10). Quanto à reclassificação de R2 para R3, nota-se um valor (51.4%) bem próximo da comparação contrária (58.6%) (Tabela 10). Já entre R2 e R5 nota-se uma reclassificação baixa (28.6%), sendo o contrário um pouco mais alto (38.9%) (Tabela 10). Por fim, a reclassificação de R3 para R5 (48.2%) é bem próximo da reclassificação contrária (44.4%) (Tabela 10).

Tabela 10 - Matriz da classificação na validação cruzada entre as localidades de *T. triangulum*. Número de indivíduos (n) à esquerda na célula; porcentagem de indivíduos (%) à direita na célula.

	Grupo 1 - Grupo 1	Grupo 1 - Grupo 2	Total	Grupo 2 - Grupo 1	Grupo 2 - Grupo 2	Total
<i>T. triangulum</i> R1 (G1) – R2 (G2)	149 (73%)	55 (27%)	204 (100%)	18 (51.4%)	17 (48.6%)	35 (100%)
<i>T. triangulum</i> R1 (G1) – R3 (G2)	157 (77%)	47 (23%)	204 (100%)	11 (38%)	18 (62%)	29 (100%)
<i>T. triangulum</i> R1 (G1) – R5 (G2)	188 (92%)	16 (8%)	204 (100%)	2 (11.1%)	16 (88.9%)	18 (100%)
<i>T. triangulum</i> R2 (G1) – R3 (G2)	17 (48.6%)	18 (51.4%)	35 (100%)	17 (58.6%)	12 (41.4%)	29 (100%)
<i>T. triangulum</i> R2 (G1) – R5 (G2)	25 (71.4%)	10 (28.6%)	35 (100%)	7 (38.9%)	11 (61.1%)	18 (100%)
<i>T. triangulum</i> R3 (G1) – R5 (G2)	15 (51.8%)	14 (48.2%)	29 (100%)	8 (44.4%)	10 (55.6%)	18 (100%)

G1 = Grupo 1; G2 = Grupo 2

Já na tabela 11, a comparação entre PA e R1 *occidentalis* mostra que a reclassificação de uma para a outra tem valor 0 (zero). Isso também ocorre para a comparação entre PA e R2 *occidentalis* e para a comparação entre PA e TO (Tabela 11).

Já na reclassificação de R1 *occidentalis* para R2 *occidentalis*, temos um valor alto (80%), já o contrário é de somente 36% (Tabela 11).

Tabela 11 – Matriz da classificação na validação cruzada entre as localidades de *T. occidentalis*. Número de indivíduos (n) à esquerda na célula; porcentagem de indivíduos (%) à direita na célula.

	Grupo 1 - Grupo 1	Grupo 1 - Grupo 2	Total	Grupo 2 - Grupo 1	Grupo 2 - Grupo 2	Total
<i>T. occidentalis</i> PA (G1) – R1 (G2)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)	5 (100%)	5 (100%)
<i>T. occidentalis</i> PA (G1) – R2 (G2)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	1 (4%)	24 (96%)	25 (100%)
<i>T. occidentalis</i> PA (G1) – TO (G2)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)	28 (100%)	28 (100%)
<i>T. occidentalis</i> R1 (G1) – R2 (G2)	1 (20%)	4 (80%)	5 (100%)	9 (36%)	16 (64%)	25 (100%)
<i>T. occidentalis</i> R1 (G1) – TO (G2)	3 (60%)	2 (40%)	5 (100%)	5 (18%)	23 (92%)	28 (100%)
<i>T. occidentalis</i>	21 (84%)	4 (16%)	25 (100%)	4 (14%)	24 (86%)	28 (100%)

	Grupo 1 - Grupo 1	Grupo 1 - Grupo 2	Total	Grupo 2 - Grupo 1	Grupo 2 - Grupo 2	Total
R2 (G1) – TO (G2)						
G1 = Grupo 1; G2 = Grupo 2						

#### 4.4.1 Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*

O diagrama de deformação entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*, obtida como resultado da Análise Discriminante está ilustrado a seguir (Figura 11).

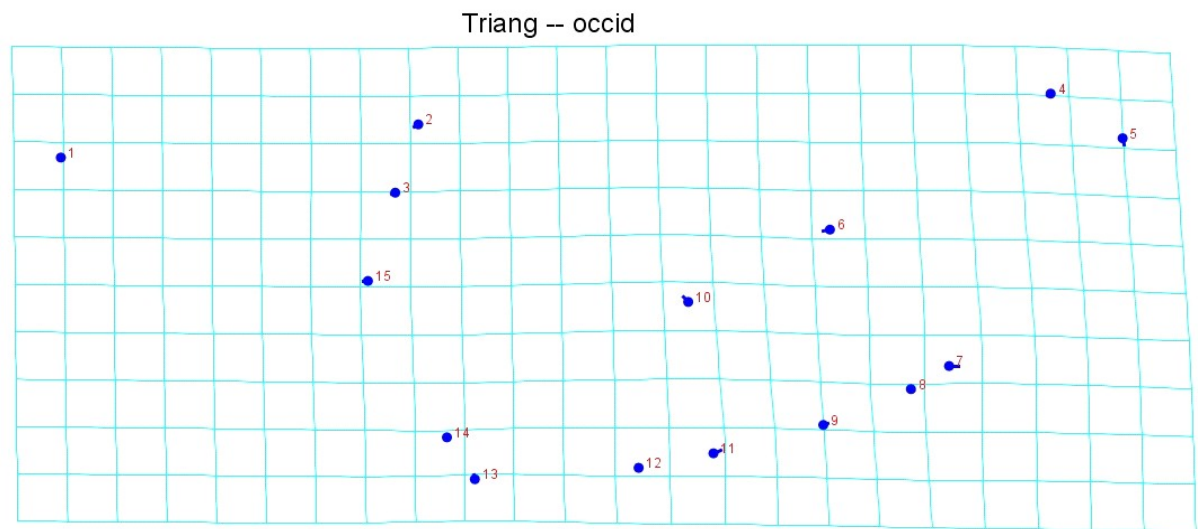


Figura 11 - Diagrama de Deformação derivado da Análise Discriminante resultante da comparação entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*. Os vetores azuis representam as deformações da configuração de *T. triangulum* em relação à configuração de *T. occidentalis* e a grade clara representa as deformações nas asas de *T. triangulum*.

Neste caso, diferente do que foi observado na PCA e na CVA, a deformação na forma da asa quase não existe, quando comparadas *T. triangulum* e *T. occidentalis* entre si. Observa-se somente pequenas mudanças em alguns marcos anatômicos (2, 5, 6, 7, 10 e 11) (Figura 11).

#### 4.4.2 Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre as localidades de *T. triangulum* e entre as localidades de *T. occidentalis*

Neste gráfico acima (Figura 12A), nota-se que não existe uma diferença na forma da asa de R1 e R2, considerando a posição dos marcos anatômicos. Este

gráfico corrobora com os valores anteriores da distância de Mahalanobis e valores da distância de Procrustes

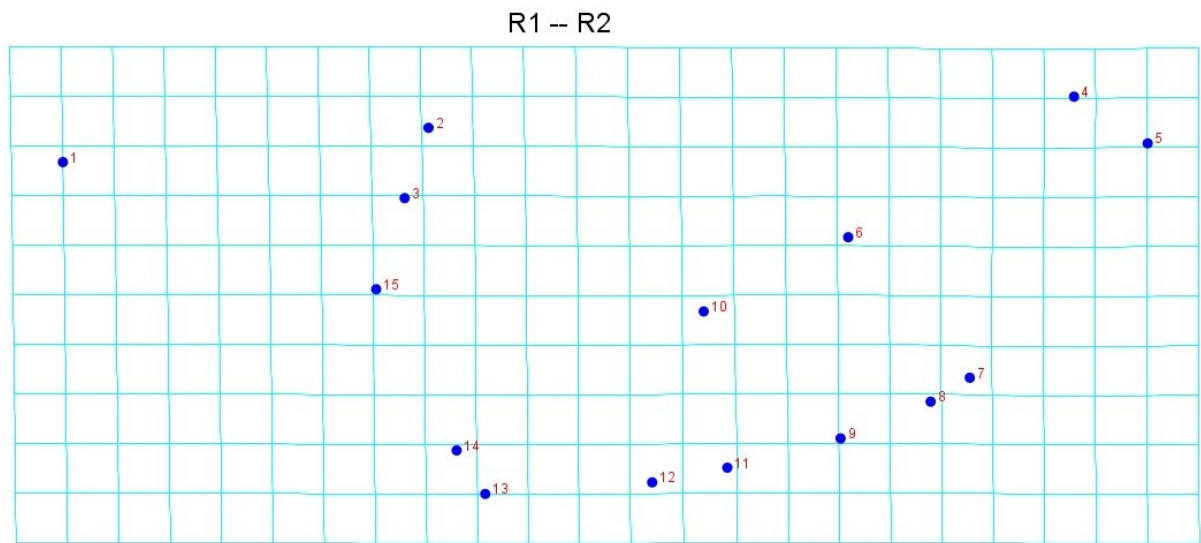


Figura 12A - Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R1 e R2. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R1) em relação à segunda configuração (R2) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R1).

Nota-se também, na Figura 12B, que R1 e R3 realmente não apresentam diferenças entre si, quanto a forma da asa, analisando a posição dos marcos anatômicos de cada.

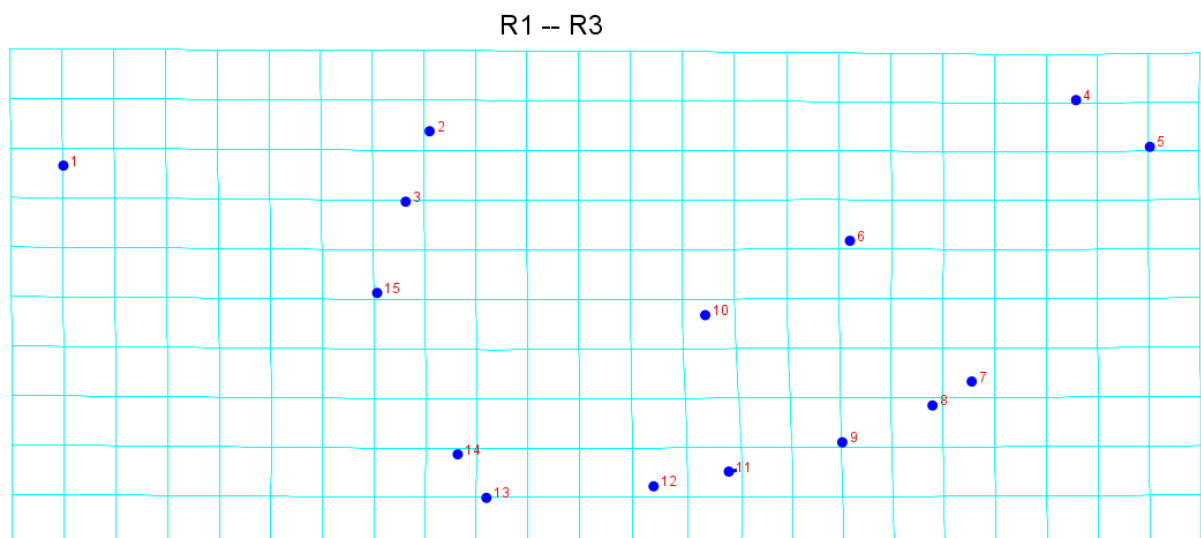


Figura 12B - Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante R1 e R3. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R1) em relação à terceira configuração (R3) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R1).

Apesar de os valores da distância de Mahalanobis ser acima de 3 entre R1 e R5, o gráfico diagrama de deformação (figura 12C) não demonstra quaisquer diferenças na posição dos marcos anatômicos entre essas duas localidades.

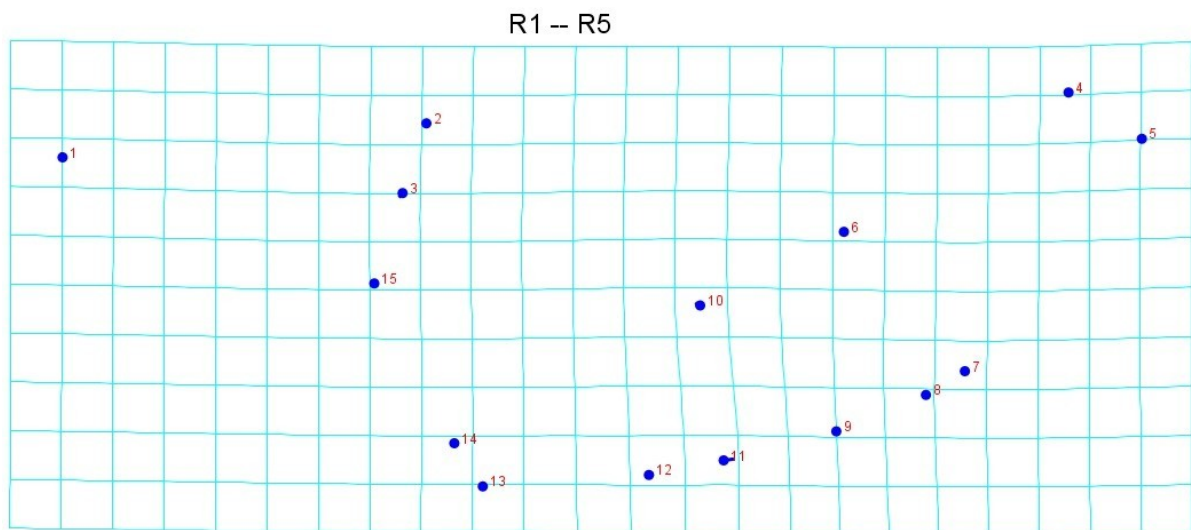


Figura 12C - Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R1 e R5. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R1) em relação à segunda configuração (R5) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R1).

Já na Figura 12D, observa-se que realmente R2 e R3 não apresentam diferenças quanto a forma da asa, analisando a posição dos marcos anatômicos.

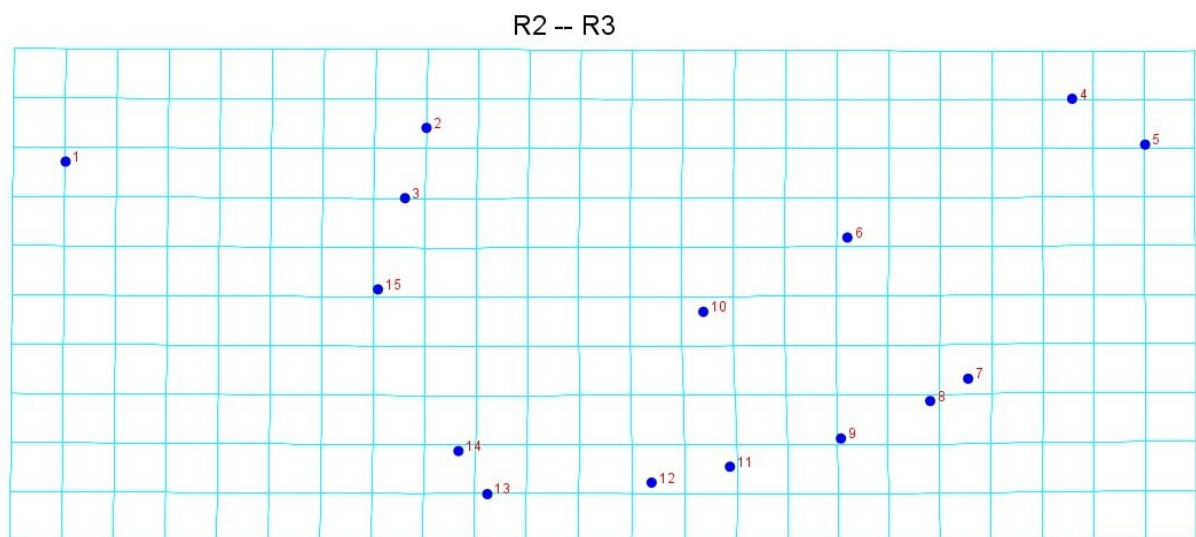


Figura 12D - Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante R2 e R3. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R2) em relação à segunda configuração (R3) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R2).

Em seguida, na Figura 12E, nota-se uma contraposição aos valores da distância de Mahalanobis que foi maior que 3, caracterizando que as localidades R2 e R5 são diferentes entre si. Esta contraposição está no fato de, de acordo com o gráfico anterior, não existir diferenças entre as duas localidades quanto a forma da asa (12E).



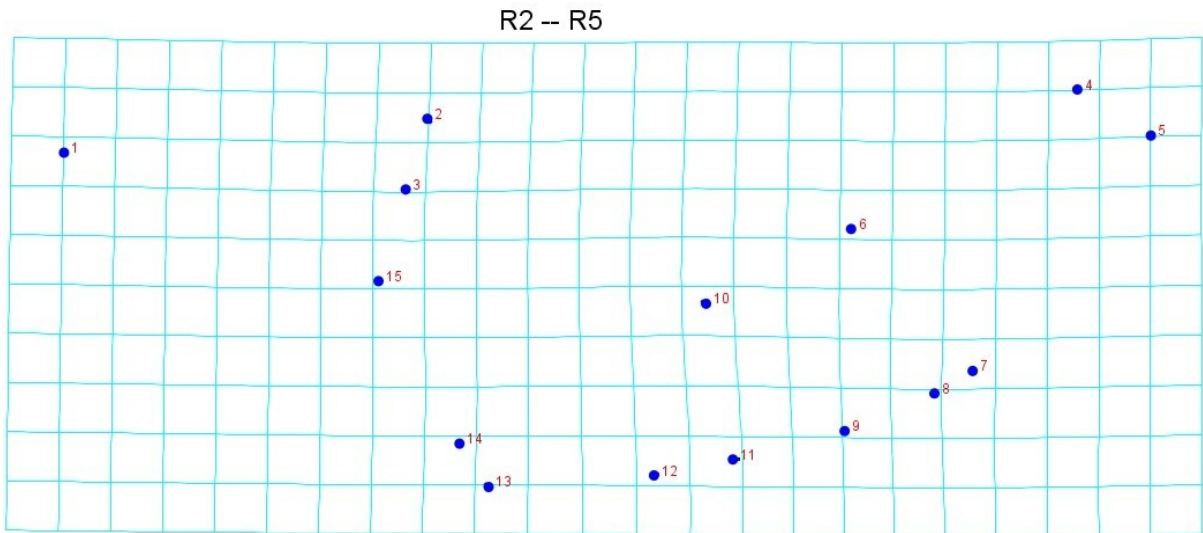


Figura 12E - Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R2 e R5. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R2) em relação à segunda configuração (R5) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R2).

Por fim, nota-se na Figura 12F que não há uma diferença expressiva na forma da asa entre R3 e R5.

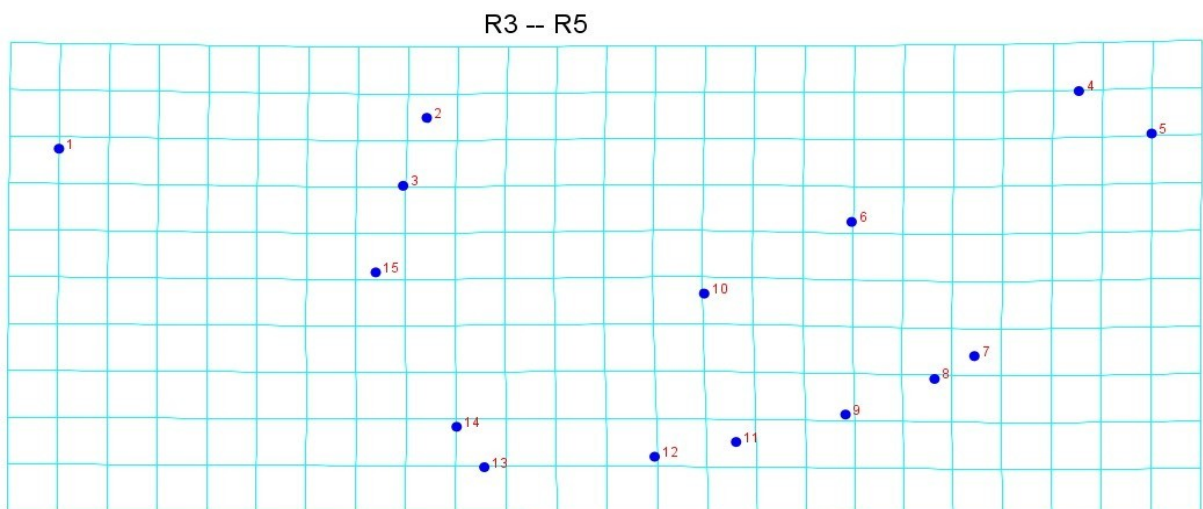


Figura 12F - Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R3 e R5. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R3) em relação à segunda configuração (R5) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R3).

Na Figura 13A, comparação entre PA e R1 *occidentalis*, nota-se que as maiores deformações ocorrem na região dos marcos anatômicos 4 e 5 com direção para o ápice posterior da asa, 7 e 8 com direções opostas entre si, e o 10 com direção para a região central mais inferior da asa.



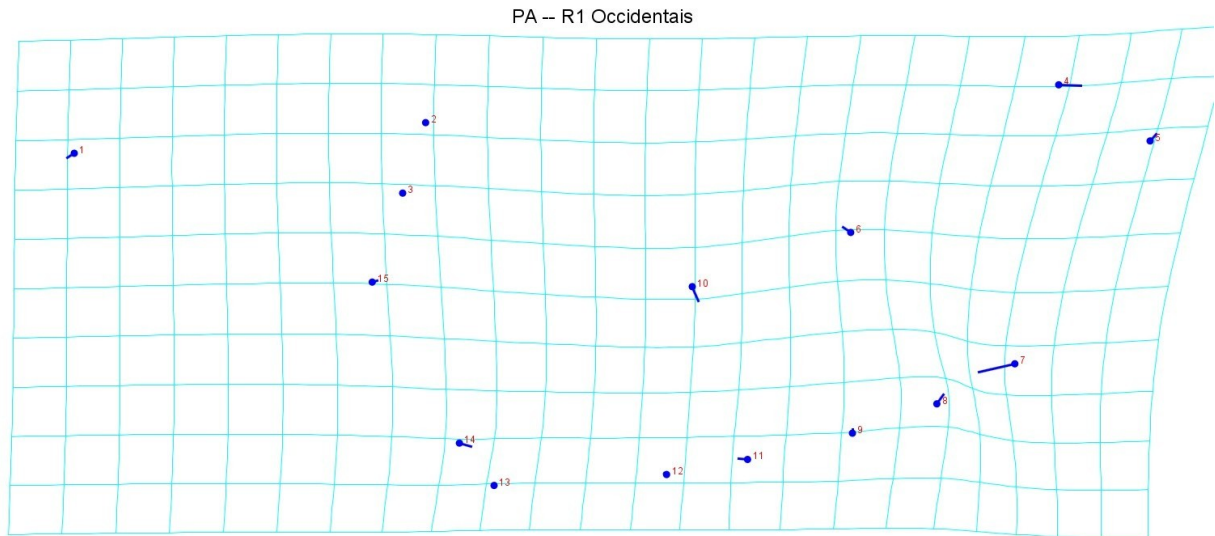


Figura 13A - Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre PA e R1 *occidentalis*. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (PA) em relação à segunda configuração (R1 *occidentalis*) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (PA).

Nota-se na Figura 13B, que as maiores deformações na forma da asa entre PA e R2 *occidentalis* estão nos marcos anatômicos 4, 7, 8 e 10. O marco anatômico 4 tem uma deformação com direção para o ápice da asa. Já o marco anatômico 7, a deformação é em direção para região anterior da asa (13B). O marco anatômico 8 tem deformação com direção para o ápice da asa. Por fim, o marco anatômico 10 tem uma deformação com direção para a região inferior da asa (13B).

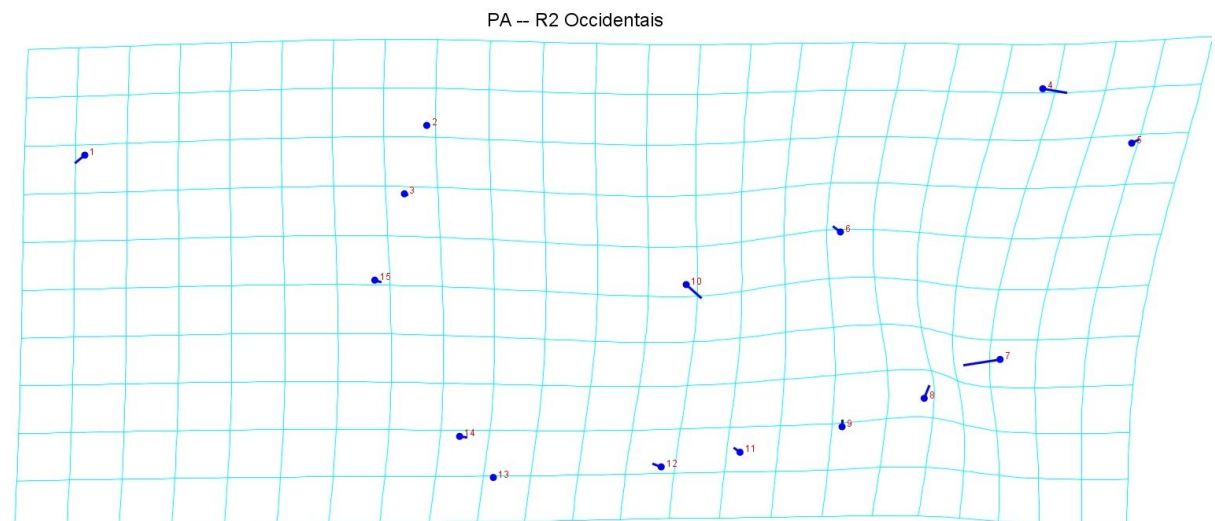


Figura 13B - Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre PA e R2 *occidentalis*. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (PA) em relação à segunda configuração (R2 *occidentalis*) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (PA).

Na Figura 13C, observa-se que há uma diferença na forma da asa entre PA e TO. As principais deformações estão sendo causadas pelas diferenças nos marcos

anatômicos 4 com uma deformação com direção para o ápice da asa, o 7 com uma deformação com direção para a região anterior da asa, o 8 com uma deformação com direção para o ápice superior da asa, o 10 com uma deformação com direção para a porção inferior da asa, o 12 com uma deformação com direção para a região anterior da asa, e por fim o 13 com uma deformação com direção para a região anterior da asa (13C).

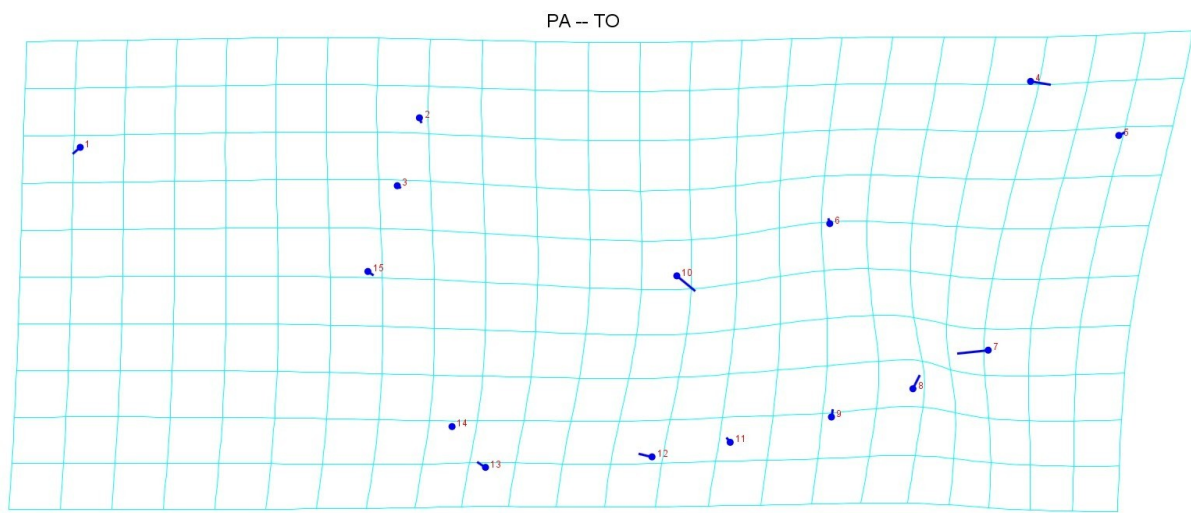


Figura 13C - Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre PA e TO. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (PA) em relação à segunda configuração (TO) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (PA).

De acordo com a Figura 13D, não é observado uma variação na forma da asa entre R1 *occidentalis* e R2 *occidentalis* suficiente para que estas populações sejam consideradas diferentes entre si. O único marco anatômico que apresenta uma variação, mesmo que branda, é o 10 com direção para a região posterior da asa (13D).

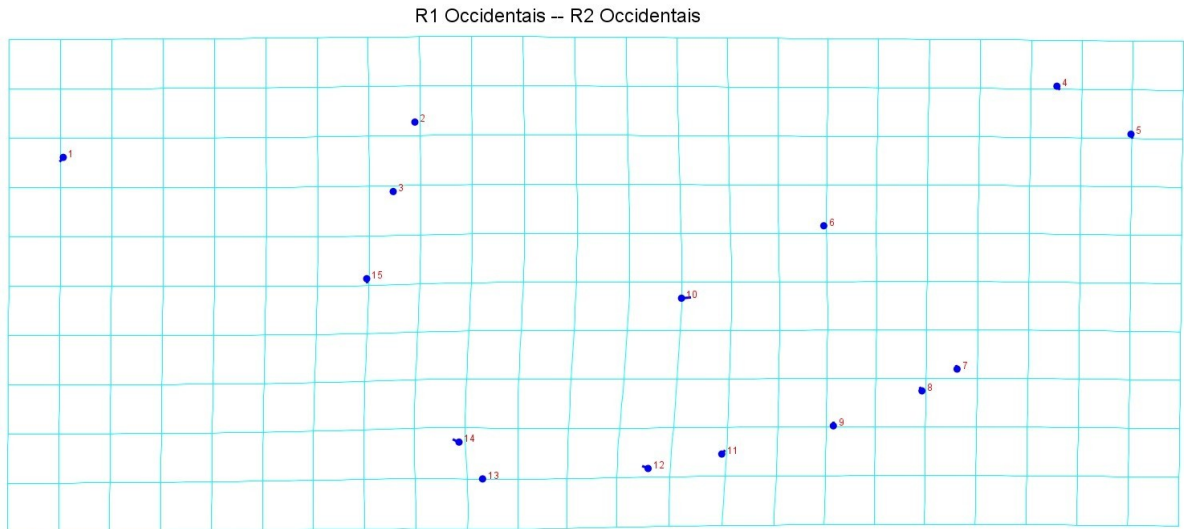


Figura 13D - Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R1 *occidentalis* e R2 *occidentalis*. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R1 *occidentalis*) em relação à segunda configuração (R2 *occidentalis*) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R1 *occidentalis*).

Na Figura 13E, gráfico da diagrama de deformação, é evidenciado uma pequena diferença na forma da asa entre R1 *occidentalis* e TO. Os únicos marcos anatômicos que apresentam alguma deformação são o 7, 10, 11, 12, 13 e 14, mas de baixa intensidade (13E).

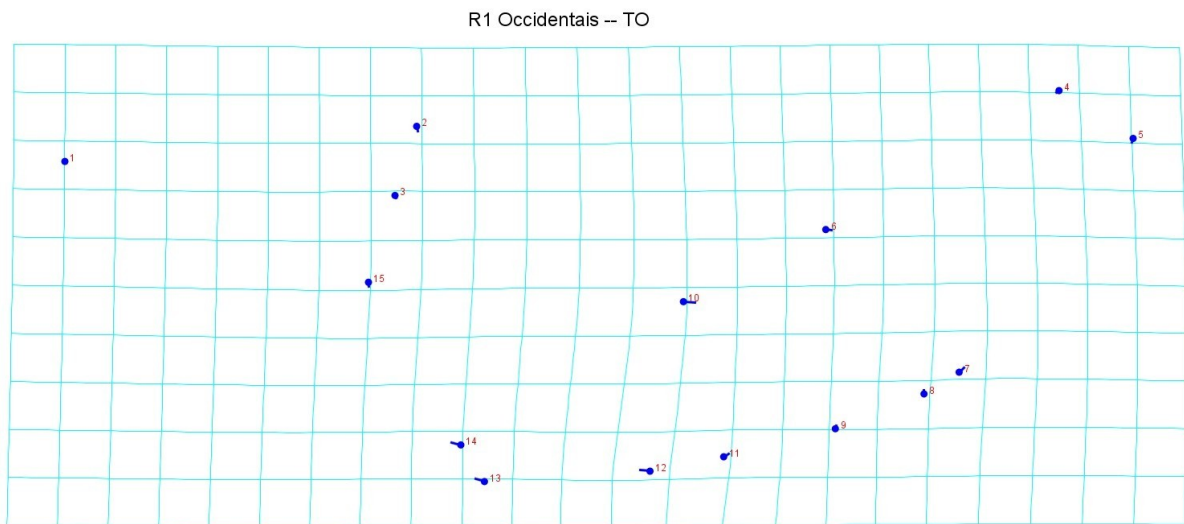


Figura 13E - Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R1 *occidentalis* e TO. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R1 *occidentalis*) em relação à segunda configuração (TO) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R1 *occidentalis*).

Na Figura 13F, observa-se a inexistência de uma diferença na forma da asa entre R2 *occidentalis* e TO.

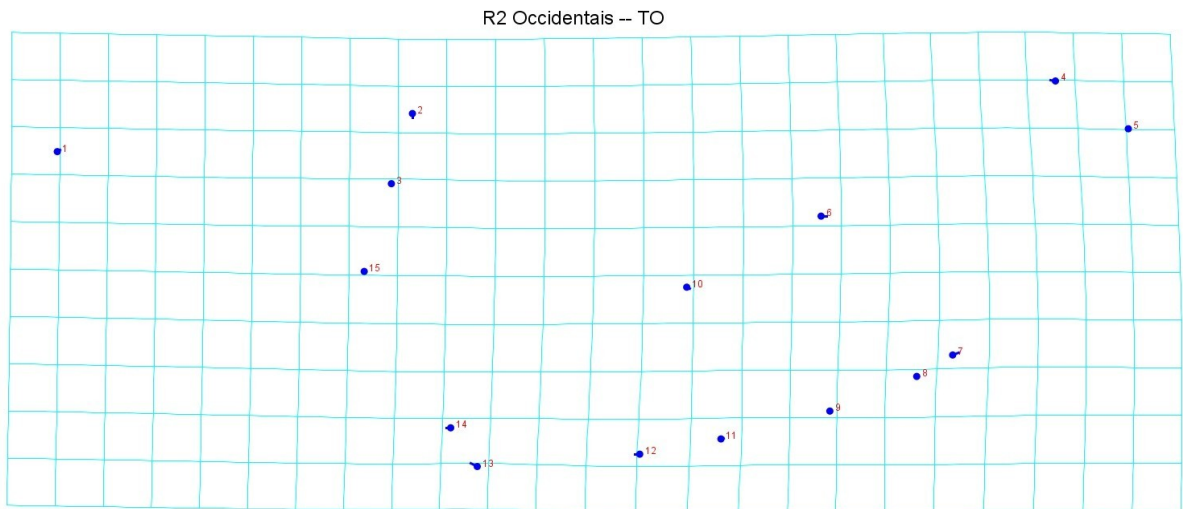


Figura 13F - Diagrama de Deformação resultante da Análise Discriminante entre R2 occidentalis e TO. Os vetores azuis representam as deformações da primeira configuração (R2 occidentalis) em relação à segunda configuração (TO) e a grade clara representa as deformações nas asas da primeira configuração (R2 occidentalis).

#### 4.4.3 Valores da Validação Cruzada resultante da Análise Discriminante entre *T. triangulum* e *T. occidentalis* (Figura 14), entre localidades de *T. triangulum* (Figura 15 e entre localidades de *T. occidentalis* (Figura 16)

Por fim, os valores da validação cruzada, resultantes da Análise Discriminante entre *T. triangulum* e *T. occidentalis* está ilustrado a seguir (Figura 14), complementando os dados anteriores, provando também que as duas espécies apresentam morfologia das asas diferentes entre si.

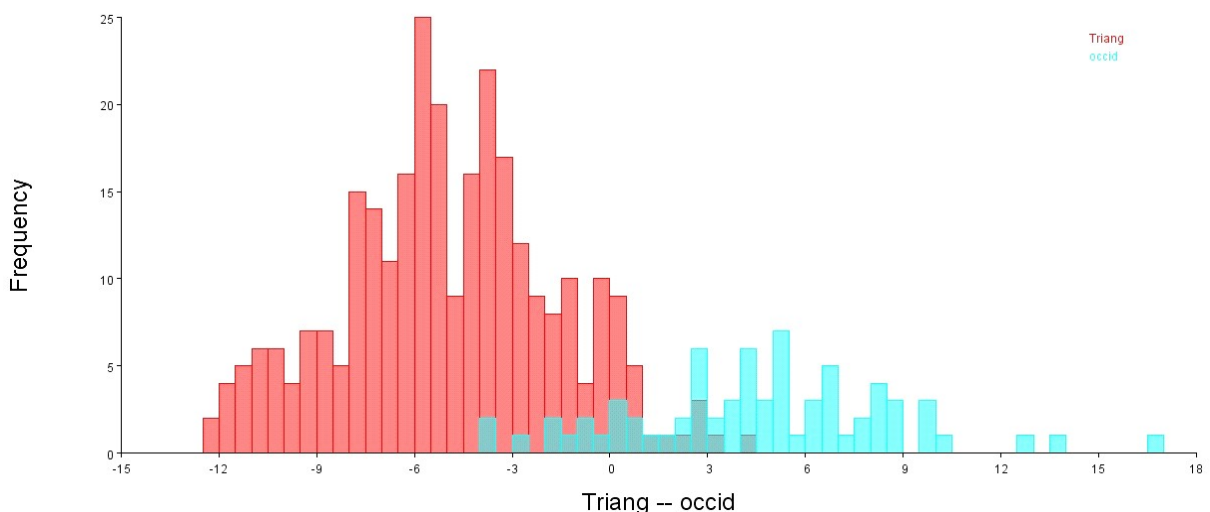


Figura 14 - Gráfico ilustrando valores da validação cruzada entre *T. triangulum* e *T. occidentalis*: eixo X = *T. triangulum* e *T. occidentalis*; eixo Y = Frequência; Barras Vermelhas = *T. triangulum*; Barras Azuis = *T. occidentalis*.

No gráfico (figura 15A) comprova que R1 e R2 são semelhantes entre si quanto a forma da asa.

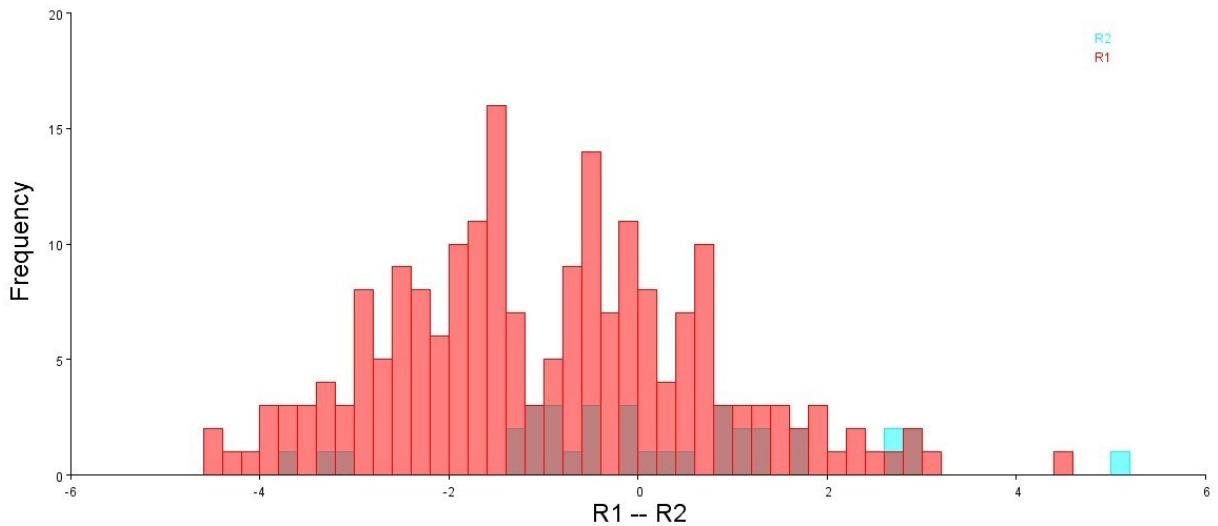


Figura 15A - Valores da Validação Cruzada entre R1 e R2: Barras Vermelhas = R1, Barras Azuis = R2. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.

Já nesta Figura 15B a sobreposição das colunas das localidades R1 e R3 aumenta, diminuindo ainda mais a diferença entre as duas.

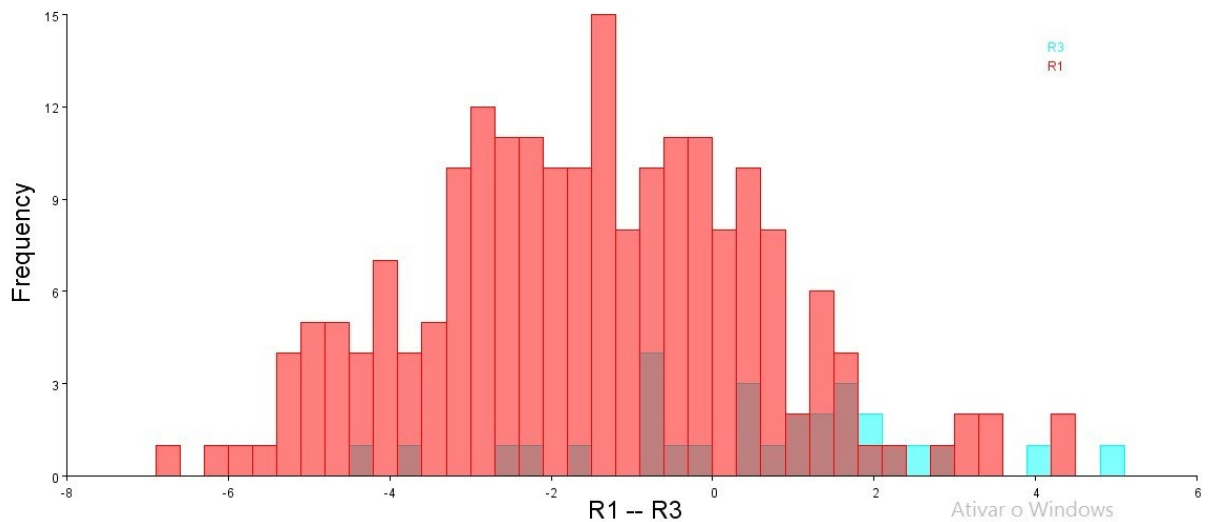
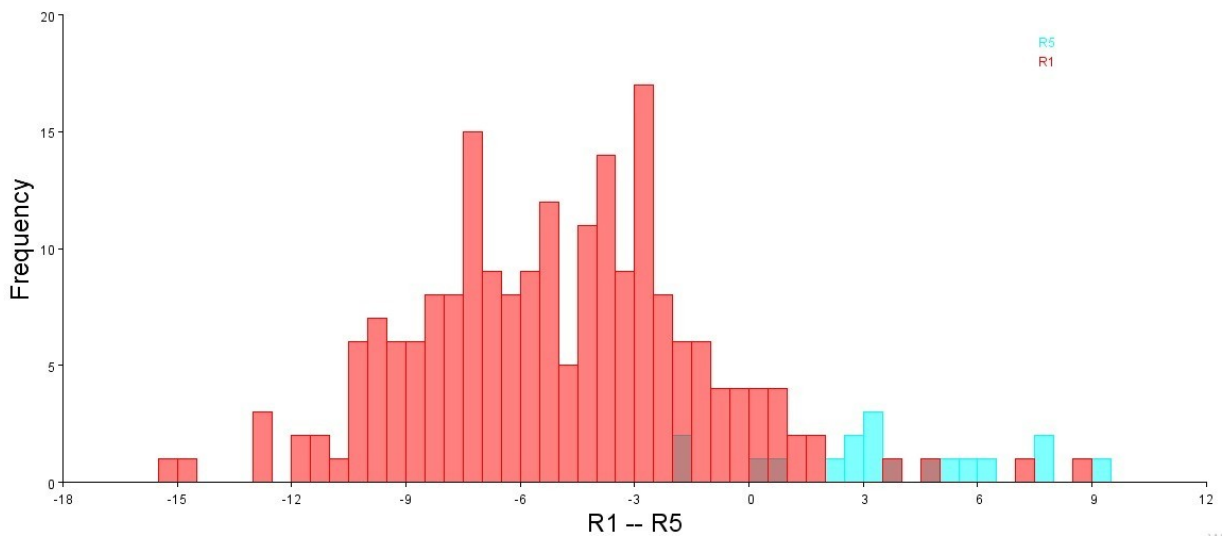
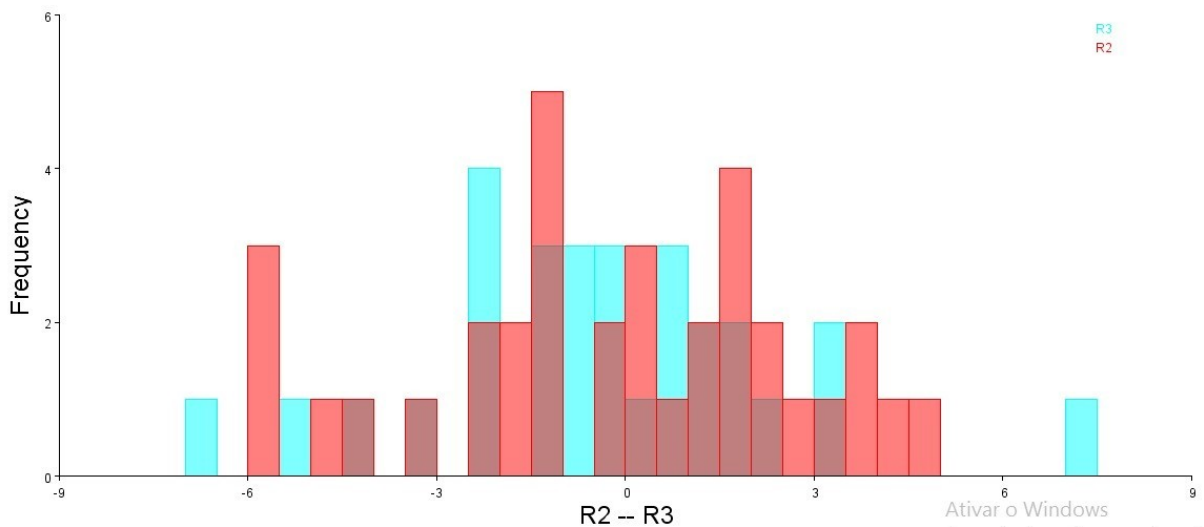


Figura 15B - Valores da Validação Cruzada entre R1 e R3: Barras Vermelhas = R1, Barras Azuis = R3. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.

Na figura 15C na validação cruzada, algumas colunas da localidade R1 se sobrepõem com as da R5, mas ainda assim, nota-se a diferenciação entre as duas localidades.



Já na Figura 15D nota-se uma maior sobreposição das colunas das duas localidades, maximizando o resultado de que R2 e R3 são semelhantes entre si.



A figura 15E mostra uma grande sobreposição entre as colunas das localidades R2 e R5, diminuindo a diferenciação entre elas.

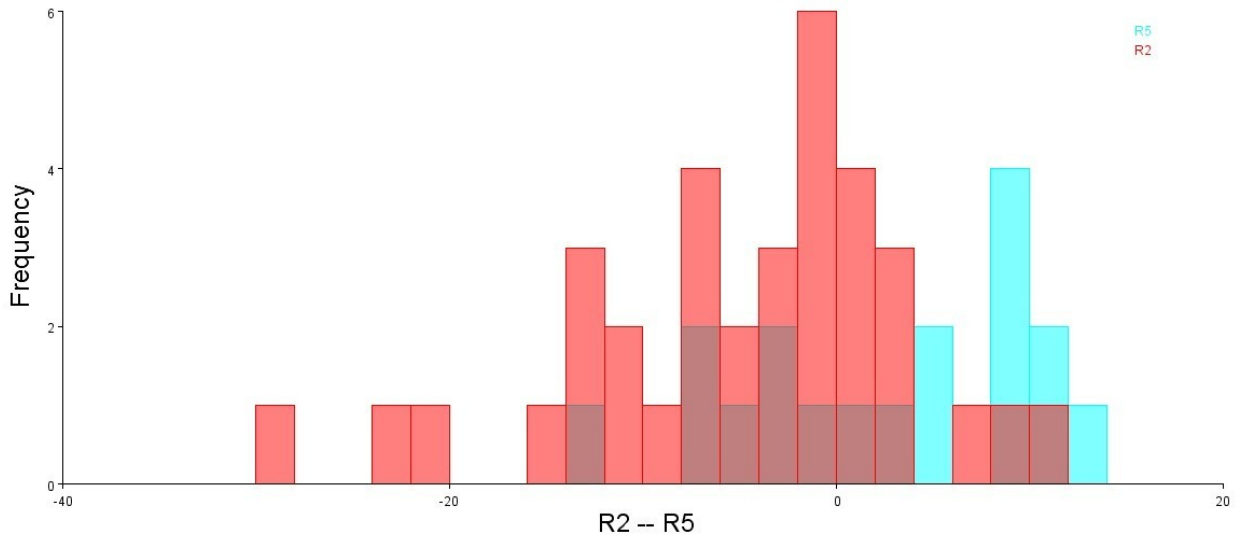


Figura 15E - Valores da Validação Cruzada entre R2 e R5: Barras Vermelhas = R2, Barras Azuis = R5. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.

Finalmente, A Figura 15F, mostra uma grande sobreposição das duas localidades R3 e R5 entre si, praticamente anulando a diferença entre as duas.

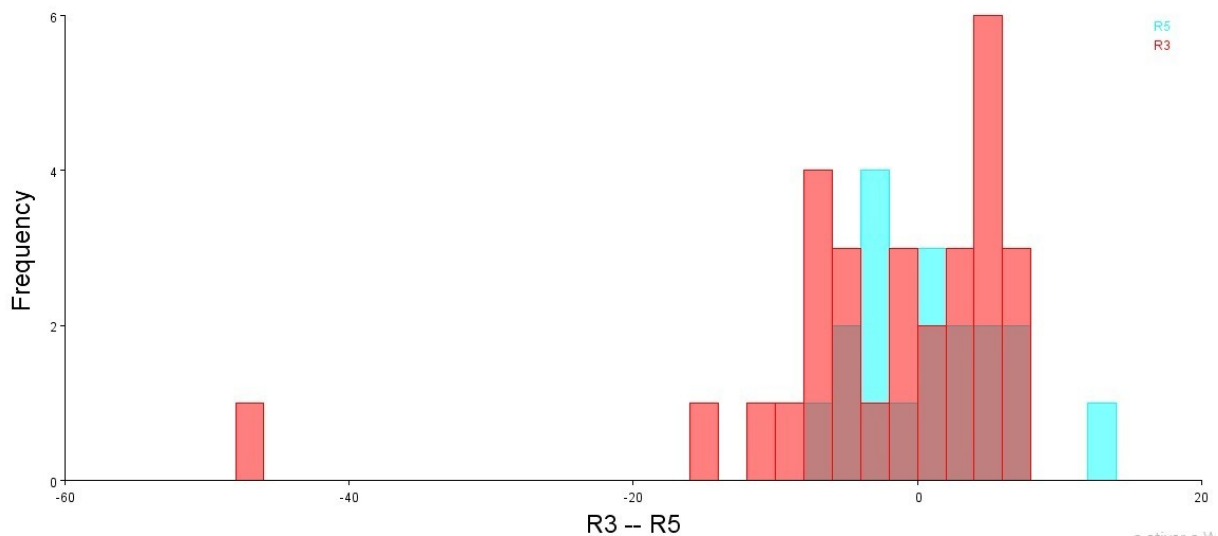


Figura 15F - Valores da Validação Cruzada entre R3 e R5: Barras Vermelhas = R3, Barras Azuis = R5. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.

Os gráficos que ilustram os valores da validação cruzada entre as localidades de *T. occidentalis* são apresentados a seguir nas figuras 16A, 16B, 16C, 16D, 16E e 16F.

Na Figura 16A, observa-se que mesmo com a validação cruzada PA e R1 *occidentalis* são diferentes entre si, sem nenhuma sobreposição de colunas entre elas.



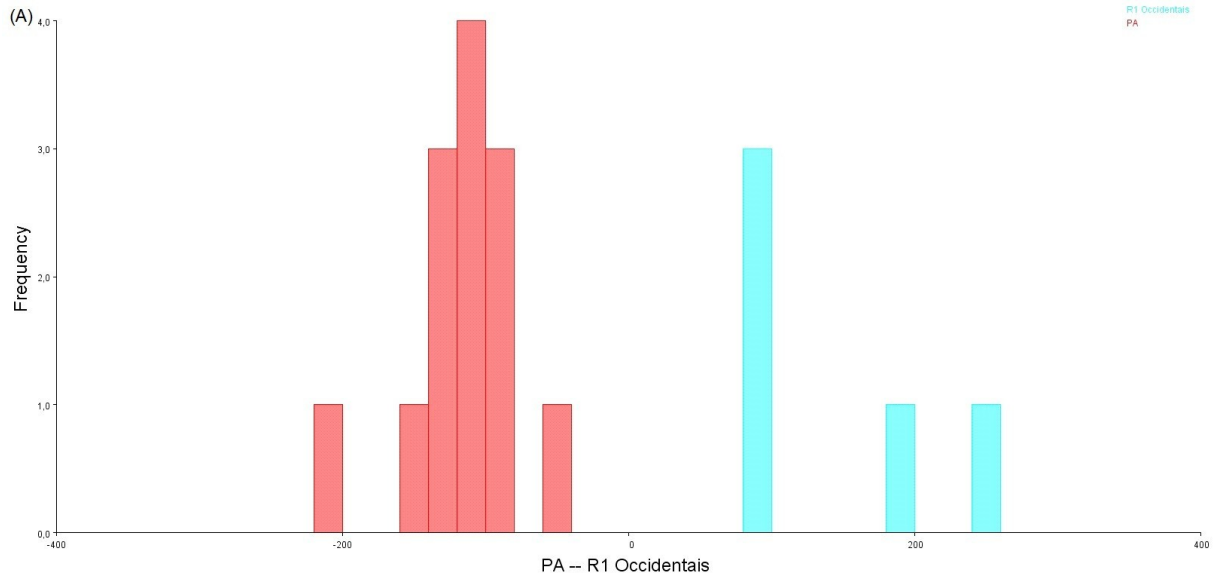


Figura 16A - Valores da Validação Cruzada entre PA e R1 *occidentalis*. Barras Vermelhas = PA, Barras Azuis = R1 *occidentalis*. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.

Já na figura 16B nota-se que PA e R2 *occidentalis* são ainda consideradas diferentes entre si, sendo que as colunas também não se sobrepõem.

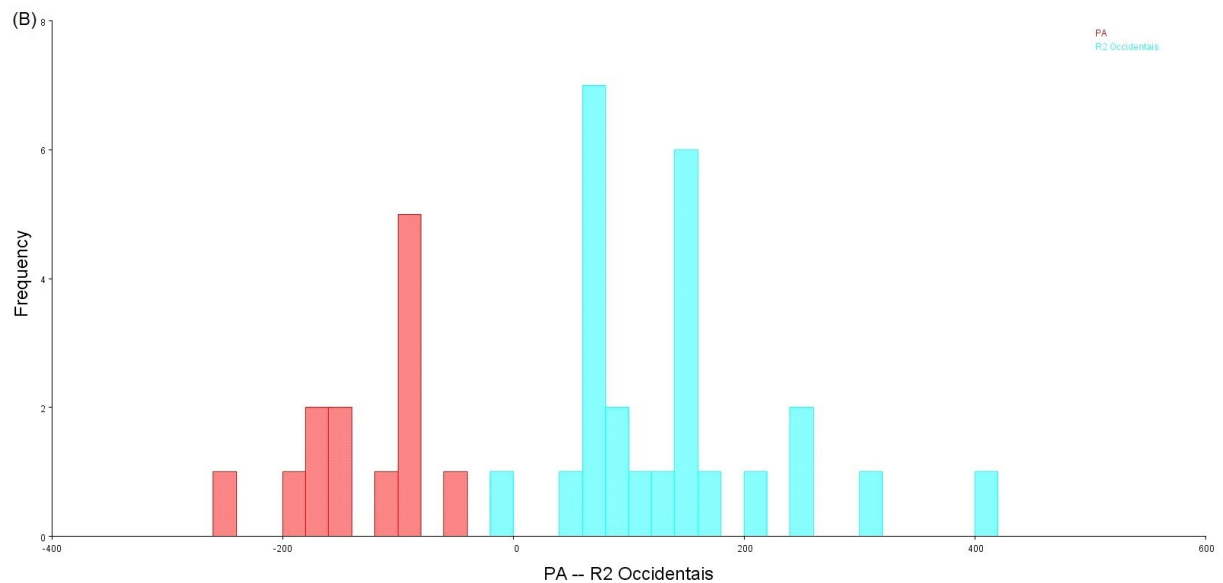


Figura 16B - Valores da Validação Cruzada entre PA e R2 *occidentalis*. Barras Vermelhas = PA, Barras Azuis = R2 *occidentalis*. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.

Na Figura 16C, observa-se que PA e TO se mantêm diferentes uma da outra, sem nenhuma sobreposição de colunas.



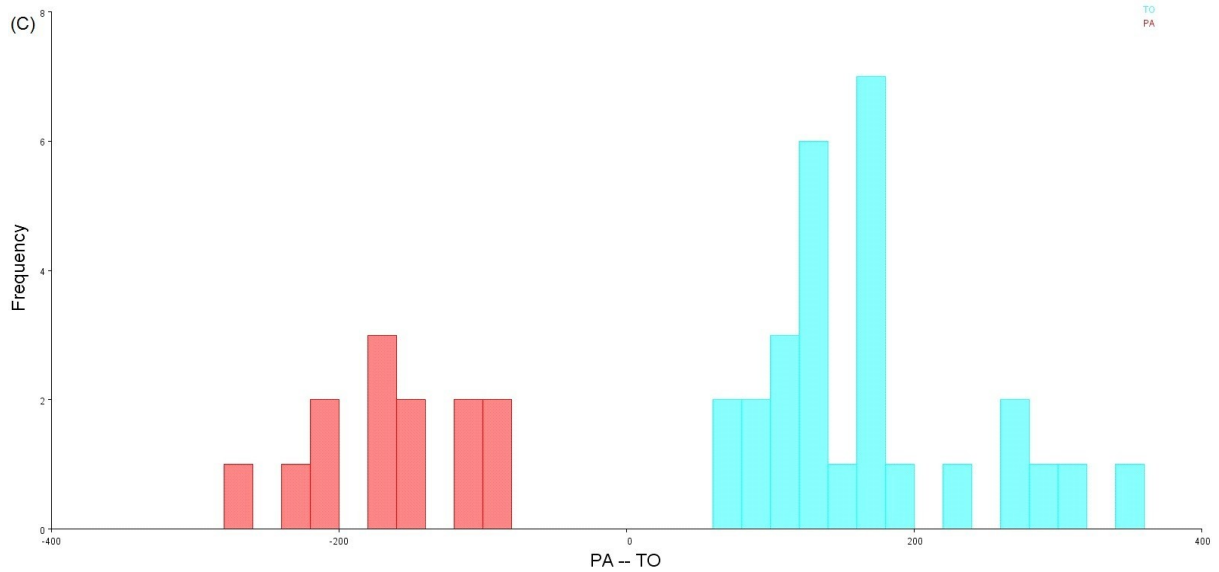


Figura 16C - Valores da Validação Cruzada entre PA e TO. Barras Vermelhas = PA, Barras Azuis = TO. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.

Na Figura 16D é evidenciado um resultado completamente diferente, mostrando que *R1 occidentalis* e *R2 occidentalis* são muito semelhantes, com sobreposição quase que total das colunas das duas localidades.

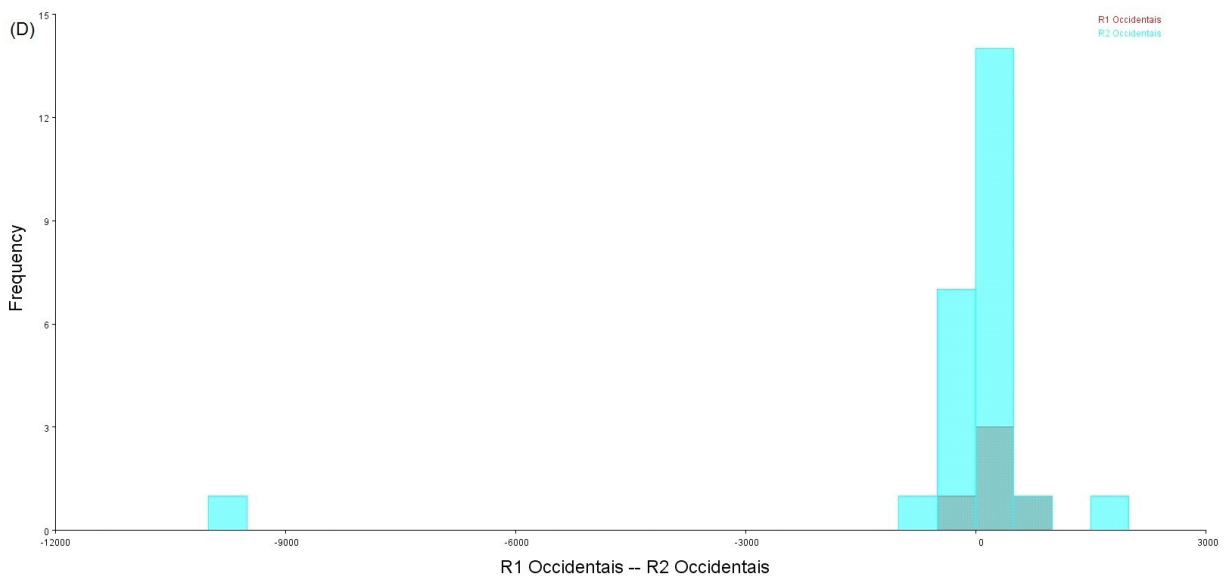


Figura 16D - Valores da Validação Cruzada entre *R1 occidentalis* e *R2 occidentalis*. Barras Vermelhas = *R1 occidentalis*, Barras Azuis = *R2 occidentalis*. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.

Na figura 16E, é possível observar que alguns indivíduos de *R1 occidentalis* se sobrepõem com os de TO.

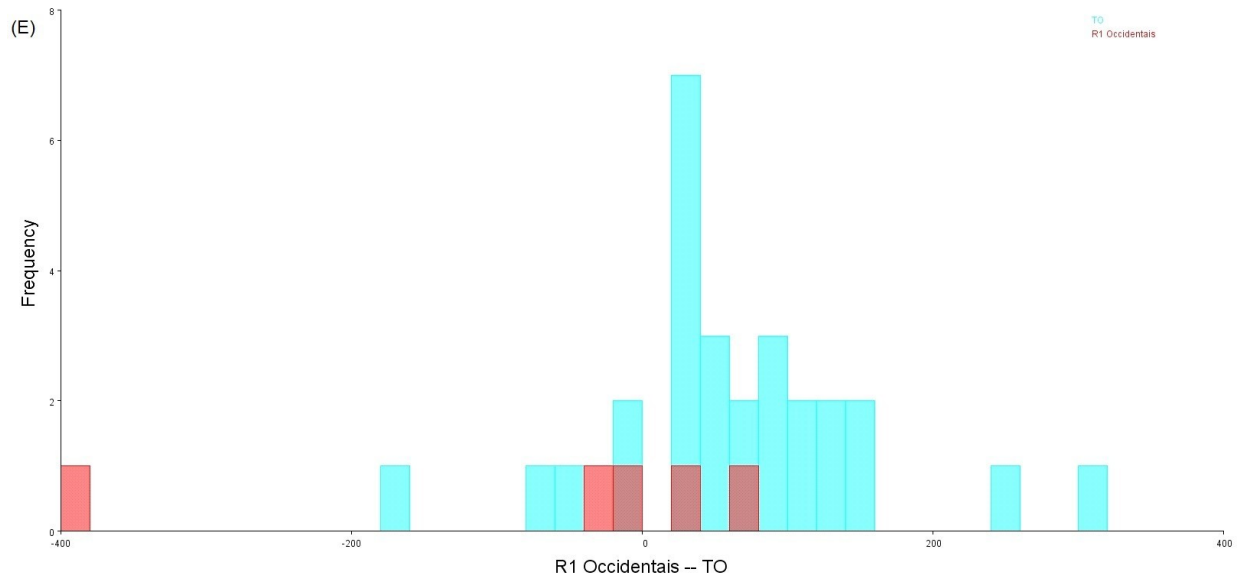


Figura 16E - Valores da Validação Cruzada entre R1 *occidentalis* e TO. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.

Por fim, na figura 16F, observa-se uma maior sobreposição dos indivíduos de R2 *occidentalis* com os de TO.

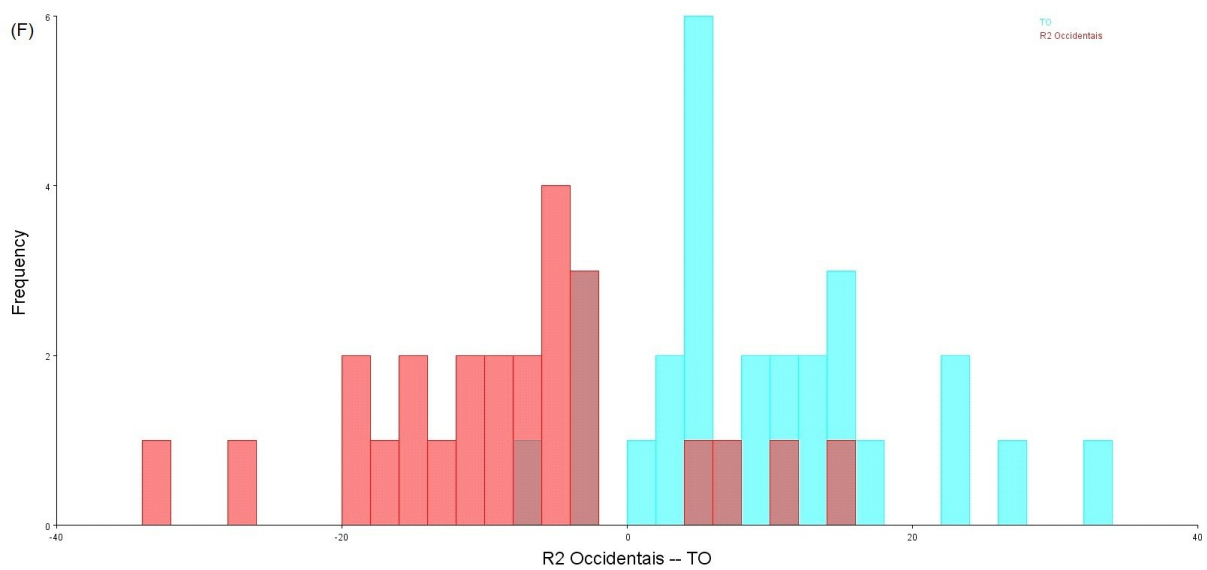


Figura 16F - Valores da Validação Cruzada entre R2 *occidentalis* e TO. Eixo X = Unidades de Valores da Validação Cruzada e eixo Y = Frequência.

## 5 Discussão

A utilização da morfometria geométrica nas asas do lado direito dos indivíduos de *T. triangulum* e *T. occidentalis* gerou resultados que evidenciaram alguns aspectos em relação a estas duas espécies.

Foi possível comprovar que ocorre a discriminação interespecífica entre *T. triangulum* e *T. occidentalis* através da análise da forma da asa. Os dados que suportam essa conclusão são o valor da distância de Mahalanobis entre as duas espécies, sendo maior que 3, os gráficos dos valores da validação cruzada, assim como a tabela de reclassificação entre as duas espécies. Esta última mostrou que a reclassificação de um grupo para o outro é baixa, já a de um grupo para ele mesmo é alta, comprovando a diferença.

Outros trabalhos de taxonomia através da morfometria geométrica encontraram resultados semelhantes a este estudo, como, por exemplo, o de Calle *et al.* (2008) ao discriminar onze espécies do subgênero *Anopheles* (*Nyssorhyncus*) presentes na Colômbia; de Lorenz *et al.* (2012) ao discriminar três espécies do gênero *Anopheles*, *An. cruzii*, *An. homunculus* e *An. bellator*; de Perre *et al.* (2014) ao discriminar três espécies de *Anastrepha fraterculus*, com sucesso, usando o acúleo e da asa como objeto de estudo; e de Manting *et al.* (2015), que constatou uma variação dentro das espécies de *Odontomachus* quanto a forma da mandíbula.

Quando as localidades de *T. triangulum* foram comparadas entre si, quanto a forma da asa, R5 mostrou-se diferente tanto de R1 quanto de R2, graças à análise da Distância de Mahalanobis entre esses grupos. Os gráficos de valores da validação cruzada, somente comprovaram a diferença entre R1 e R5. Mesmo tendo sido evidenciado essas diferenças entre R1 e R2 com R5, não foram constatadas, graças ao gráfico diagrama de deformação, diferenças na posição dos marcos anatômicos entre essas localidades.

Dentre as demais comparações como R1/R2, R2/R3, R3/R5 e R1/R3, não foram evidenciados valores estatísticos suficientes para que pudessem ser considerados diferentes entre si, quanto a forma da asa.

A distância geográfica entre as localidades R1 e R5, de *T. triangulum* é a maior, se comparada às outras distâncias entre as outras localidades (R2-R3 e R3-R5). Já a distância entre R2 e R5 é a segunda maior. Isto poderia explicar a maior diferenciação na forma da asa entre essas duas localidades (R1 e R5) e uma menor mas ainda significativa entre R2 e R5. Semelhante a isso, Gaspe *et al.* (2012), encontraram a evidência de uma correlação positiva entre os valores da distância de Mahalanobis e a distribuição geográfica de diferentes localidades de *Triatoma infestans*. Localidades separadas por mais de 4 quilômetros de distância, apresentaram um valor da distância de Mahalanobis significativamente diferente entre elas, ao passo que as localidades separadas por menos de 4 quilômetros de distância, apresentaram distâncias de Mahalanobis similares.

Quando analisada a espécie *T. occidentalis* intraespecificamente, foi constatado que todas as localidades R1 *occidentalis*, R2 *occidentalis*, TO e PA, apresentavam entre si valores da distância de Mahalanobis acima de 3, chegando até valores altos como 16 entre PA e R2 *occidentalis*, 17 entre PA e TO e 16,5 entre PA e R1 *occidentalis*. Portanto, nenhuma localidade poderia ser considerada igual à outra, e sim todas diferentes uma das outras. Outros resultados como valores da validação cruzada ajudaram a evidenciar essa diferença entre as localidades.

Em especial, tanto no gráfico dos valores de PC, da PCA, e quanto no gráfico dos valores das variáveis canônicas, da CVA, a localidade PA de *T. occidentalis* apareceu bem distante de todas as demais localidades com valores discrepantes. Talvez esta localidade seja uma variação diferente de *T. occidentalis*, ou talvez seja outra espécie.

Vale notar que, apesar de a localidade do estado do Tocantins (TO) ser muito distante geograficamente das localidades do Rio Grande do Sul, R1 *occidentalis* e R2 *occidentalis*, os valores de Mahalanobis não foram tão altos quantos aos da comparação desta mesma localidade do Tocantins (TO) com a localidade do Pará (PA), que são geograficamente mais próximas entre si. Um dado semelhante foi encontrado em Motoki *et al.* (2012) que constaram que o grau de diferenciação entre as localidades de *An. darlingi* foram menores do que o esperado para uma espécie com larga distribuição geográfica.

Já outras possíveis explicações para estes dados da diferenciação na forma da asa entre localidades da mesma espécie estariam nos fatores ambientais, na localidade e no hábito alimentar destas localidades.

Quanto aos fatores ambientais, Schachter-Broide *et al.* (2009) constataram que a variação do tamanho da asa entre localidades de *T. infestans* (Hemiptera: Reduviidae) são relacionadas às variações sazonais, no qual a diferenciação da forma da asa é relacionada ao tempo entre as coletas de cada localidade, sugerindo que a forma é mais afetada pela genética e o tamanho da asa é mais afetado pelos fatores ambientais. Ainda segundo Schachter-Broide *et al.* (2009) confirmaram a correlação entre a sazonalidade e o tamanho do centroide (CS) e/ou a forma da asa, ao passo que, por exemplo, insetos coletados em estações diferentes, com 6 meses de diferença, diferiram menos na forma da asa, se comparado com insetos coletados na mesma estação (verão), com 3 anos de diferença.

Quanto ao hábito alimentar, Gaspe *et al.* (2012), constatou que localidades de machos de *T. infestans* habitantes de domicílios, apresentaram tamanhos corporais e alares menores do que os machos habitantes das regiões peridomiciliares, sendo tanto lugares fechados ou ao ar livre. No entanto, contrário a Gaspe *et al.* (2012), Schachter-Broide *et al.* (2009), ao fazer a comparação do tamanho do centroide (CS) da asa direita constatou que os indivíduos de *T. infestans* que habitam o domicílio e/ou armazéns apresentam maior CS do que os que habitam o peridomicílio.

Já quanto a localidade, Schachter-Broide *et al.* (2004) ao explorar a variação do tamanho, forma, ou a combinação deste dois fatores em diferentes níveis espaciais: uma vila, um ecótopo, e *sítes* de coleta individuais, constatou que o tamanho da asa diferiu entre os *ecotopes*, mas não entre as vilas; e a forma da asa divergiu ao comparar vilas com *ecotopes*.

## 6 Conclusões

Neste trabalho foi elucidado que *T. triangulum* e *T. occidentalis* são distintas entre si quanto a forma da asa direita. Já quanto a análise intraespecífica, dentro de *T. triangulum*, as localidades R1 e R5 foram consideradas significativamente distintas entre si, e as localidades R2 e R5 também. Finalmente, dentro de *T. occidentalis*, todas as localidades PA, R1 *occidentalis*, R2 *occidentalis* e TO, são distintas entre si quanto a forma da asa.

## 7 Considerações finais

Portanto, a Morfometria Geométrica é uma técnica que pode ser utilizada com sucesso na discriminação interespecífica dentro de *Tabanus* spp. (Diptera: Tabanidae), assim como na discriminação intraespecífica duas espécies deste gênero, *T. triangulum* e *T. occidentalis*.

Além disto, esta técnica se mostrou rápida, relativamente barata, sendo o material mais caro o Estereoscópio Óptico acoplado a uma câmera digital, e simples, com pouca necessidade de conhecimento técnico específico para realizar a metodologia.

A Morfometria Geométrica também se mostrou muito robusta estatisticamente, apresentando resultados com grande significância ( $p < 0,0001$ ).

## Referências

ANTHONY, D. W. Tabanidae attracted to an ultraviolet light trap. **The Florida Entomologist**, v.43, p.77-80, 1960.

BALDACCHINO, F.; PUECH, L.; MANON, S.; HERTZOG, L.; JAY-ROBERT, P. Biting behaviour of Tabanidae on cattle in mountainous summer pastures, Pyrenees, France, and effects of weather variables. **Bulletin of Entomological Research**, v.104, n.4, p.471-479, 2014.

BARROS, A. T. M.; FOIL, L. D.; VAZQUES, S. A. S. Mutucas (Diptera: Tabanidae) do Pantanal: Abundância Relativa e Sazonalidade na Sub-região de Nhecolândia. **Embrapa, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v 48, p.1-20, 2003.

BATISTA, J. S.; BEZERRA, F. S. B.; LIRA, R. A.; CARVALHO, J. R. G.; NETO, A. M. R.; PETRI, A. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.1, p.63-69, 2008.

BATISTA, J. S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M. M. G.; MADRUGA, C. R.; SIMÕES, S. D. V.; MAIA, T. F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary parasitology**, v.143, n.2, p.174-181, 2007.

BAWN, S.; TINT, T. S.; LAT, L. H. Seasonal abundance of horse flies (Diptera: Tabanidae) and stability fly (Diptera: Muscidae) collected by NZI trap within Taw. Area, Myanmar. **Journal of Environmental and Applied Research**, v.3, n.1p. 1-6, 2015.

BOOKSTEIN, F. L. The measurement of biological shape and shape change. **Lecture notes in biomathematics**, Springer-Verlag, New York, v.24, 1978.

BOOKSTEIN, F. L. A Statistical Method for Biological Shape Comparisons. **Journal of Theoretical Biology**, v.107, p.475-520, 1984.

BOOKSTEIN, F. L. "Size and Shape": a comment on semantics. **Syst. Zool.**, v.38, p.173-180, 1989.

BOOKSTEIN, F. L. **Morphometric Tools for Landmark Data, Geometry and Biology**. New York: Cambridge University Press, 1991.



BOOKSTEIN, F. L. A brief history of the morphometric synthesis, p. 15-40. In: MARCUS, L. F.; BELLO, E.; GARCIA VALDECASAS, A. (eds.), **Contributions to Morphometrics**. Monografías. Madrid: Museu Nacional de Ciencias Natulares, 1993.

BROWN, B. V. Malaise trap catches and the crisis in Neotropical dipterology. **American Entomologist**, v.51, p.180-183, 2005.

CALLE, D. A.; QUIÑONES, M. L.; ERAZO, H. F.; JARAMILLO, N. Discriminación por morfometría geométrica de once especies de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) presentes en Colombia. **Biomédica**, v.28, n.3, p.371-385, 2008.

CHAYNEY, J. E.; HALL, M. JR.; ARAMAYO, B. J. L.; BETELLA, P. A Preliminary Checklist and Key on the Genera and Subgenera of Tabanidae (Diptera) of Bolivia with Particular Reference to Santa Cruz Department. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.89, n.3, p.321-345, jul./set. 1994.

CHVALA M., LYNBORG L. & J. MOUCHA (1972): The Horse Flies of Europe. — Entomol. Soc. Copenhagen, Copenhagen: 1-498

COSCARÓN, S.; PAPAVERO, N. Manual of Neotropical Diptera. Tabanidae. **Neotropical Diptera**, v.6, p.1-137, 2009a.

COSCARÓN, S.; PAPAVERO, N. Catalogue of Neotropical Diptera. Tabanidae. **Neotropical Diptera**, v.16, p.1-199, 2009b.

Fairchild, G.B. (March 1980). "Tabanidae (Diptera) from the Dominican Republic". *Florida Entomologist*. **The Florida Entomologist**, Vol. 63, No. 1. 63 (1): 166–188

FAIRCHILD, G. B. Tabanidae. In: HULBERT, STUART H.; RODRIGUEZ, GILBERTO; SANTOS, NEWTON D. (Org.). **Aquatic Biota of Tropical South America, Part 1, Arthropoda**. San Diego: San Diego State University., 1981. p.452-460.

FAIRCHILD, G. B. The Tabanidae of Panama. **Contributions of the American Entomological Institute**, v.22, p.1-139, 1986.

FERREIRA R. L. M.; HENRIQUES A. L.; RAFAEL J. A. Activity of Tabanids (Insecta: Diptera: Tabanidae) attacking the reptiles *Caiman crocodiles* (Linn.) (Alligatoridae)

and *Eunectes murinus* (Linn.) (Boidae), in the Central Amazon, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, p.133-136, 2002.

FERREIRA R. L. M. **Preferência alimentar, atividade de voo diurna e anual, comportamento de ataque, preferência por habitat e idade fisiológica de adultos de mutucas (Diptera: Tabanidae) na Amazônia Central, Brasil**. 2003. 163f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Instituto Nacional Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2003.

FERREIRA R. L. M.; RAFAEL J. A. Activity of tabanids (Diptera, Tabanidae) attacking a domestic duck - *Cairina moschata* Linnaeus (Aves, Anatidae), introduced in a forest area in the Central Amazon, Manaus, Brazil. **Rev Bras Entomol**, v.48, p.283-286, 2004.

FOIL, L. D.; HOGSETTE, J. A. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. **Revue scientifique et technique**, v.13, n.4, p.1125-1158, 1994.

FORNEL, Rodrigo.; CORDEIRO-ESTRELA, Pedro. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. In: MARINHO, Jorge R.; HEPP, Luiz U.; FORNEL, Rodrigo (Orgs.). **Temas em Biologia**: Edição comemorativa aos 20 anos do Curso de Ciências Biológicas e aos 5 anos do PPG-Ecologia da URI Campus de Erechim. Erechim: EDIFAPES, 2012. p.101-120.

FROST, S. W. Tabanidae attracted to light. **Journal Series of the Pennsylvania Agricultural Experiment Station**, v.1714, p.124-125, 1951.

GASPE M. S.; SCHACHTER-BROIDE J.; GUREVITZ J. M.; KITRON U.; GÜRTLER R.E.; DUJARDIN J.P. Microgeographic Spatial Structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Populations Using Wing Geometric Morphometry in the Argentine Chaco. **J. Med. Entomol.**, v.49, n.3, p.504-514, 2012.

GETAHUN, M. N.; CECCHI, G.; SEYOUM, E. Population studies of *Glossina pallidipes* in Ethiopia: emphasis on cuticular hydrocarbons and wing morphometric analysis. **Acta Trop**, v.138, S12-S21, 2014.

GILLOTT, C. **Entomology**. Vol.3. Canadá: Springer, 2005.

GORAYEB, I. S. **Tabanidae (Diptera) da Amazônia Oriental: sazonalidade ataque e estratificação arbórea**. 1985. 205f. Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, 1985.

GORAYEB, I. S. Tabanidae (Diptera) of the Amazon. XIV. Vertical stratification in Eastern Amazonian Forest. In: BURGER, J. F. (ed.) **A collection of Diptera commemorating the life and work of Graham B. Fairchild**. Contributions to the knowledge of Diptera. Vol.14. Florida: Memoirs on Entomology, International, Associated Publishers, 1999. p.367-386.

GORAYEB, I. S. Tabanidae (Diptera) da Amazônia. XVI – Atividade diurna de hematofagia de espécies da Amazônia Oriental, em áreas de mata e pastagens, correlacionada com fatores climáticos. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.**, v.16, n.1, p.23-63, 2000.

GORAYEB I. S.; RIBEIRO J. M. F. Tabanidae (Diptera) da Amazônia XVII. Deslocamentos a hospedeiros determinados por marcação e recaptura. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.**, v.17, n.1, p.69-100, 2001.

GOULD, S. J. Allometry and size in ontogeny and philogeny. **Biol. Rev.**, v.41, p.587-640, 1966.

GOULD, S. J. Evolutionary patterns in pelicosaurian reptiles: a factor analytic study. **Evolution**, v.21, p.385-401, 1967.

Harper, D.A.T. (ed.). 1999. **Numerical Palaeobiology**. John Wiley & Sons, New York.

HENRIQUES A. L. Tabanidae (Insecta: Diptera) do Parque Nacional do Jaú, II. p.143-151. In: BORGES, S. H.; IWANAGA, S.; DURIGAN, C. C.; PINHEIRO, M. R. (eds.). **Janelas para a biodiversidade no Parque Nacional do Jaú. Uma estratégia para o estudo da biodiversidade na Amazônia**. Manaus: Fundação Vitória Amazônica, 2004.

HENRIQUES A. L.; FERREIRA R. L. M.; VIDAL J. F.; RAFAEL J. A. *Betrequia ocellata* Oldroyd (Diptera, Tabanidae, Rhinomyzini) blood feeding on Caiman crocodilus (Linnaeus) (Crocodylia, Alligatoridae) in Manaus, Brazil. **Revta bras Zool.**, v.17, n.3, p.609-613, 2000.

HENRIQUES, A. L.; RAFAEL, J. A. Tabanidae (Diptera) from Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brazil, with description of two new species of *Diachlorus* Osten Sacken. **Memoirs on Entomology International**, v.14, p.194-222, 1999.

HOLLANDER, A. L.; WRIGHT, R. E. Daily activity cycles of eight species of Oklahoma Tabanidae. **Environ. Entomol.**, v.9, p.600-604, 1980.

HUXLEY, Julian. **Principles of relative growth**. London: Mathuen, 1932.

JARAMILLO, O. N.; DUJARDIN, J. P.; CALLE-LONDOÑO, D.; FONSECA-GONZÁLEZ, I. Geometric morphometrics for the taxonomy of 11 species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* mosquitoes. **Medical and Veterinary Entomology**, v.29, p.26-36, 2015.

KANDEMIR, Í.; ÖZKAN, A.; FUCHS, S. Reevaluation of honeybee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach. **Apidologie**, v.42, p.618-627, 2011.

KENDALL, D. The diffusion of shape. **Advances in Applied Probability**, v.9, p.428-430, 1977.

KENDALL, D. G. Shape manifolds, procrustean metrics, and complex projective spaces. **Bulletin of the London Mathematical Society**, v.16, p.81-121, 1984.

KENDALL, D. G.; KENDALL, W. S. Alignments in two-dimensional random sets of points. **Advances in Applied Probability**, v.12, p.380-424, 1980.

KHATTREE, Ravindra.; NAIK, Dayanand. N. **Multivariate data reduction and discrimination with SAS Software**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2000. 574p

KITTHAWEE, S.; DUJARDIN, J. P. The Diachasmimorpha longicaudata complex: reproductive isolation and geometric patterns of the wing. **BioControl**, v.51, p.191-197, 2009.

KLINGENBERG, C. P. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. **Nature Reviews Genetics**, v.11, p.623-635, 2010.

KLINGENBERG, C. P.; MCINTYRE, G. S. (1998), Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with procrustes methods. **Evolution**, 52: 1363–1375.

KRINSKY, W. L. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). **J. Med. Entomol.**, v.13, n.3, p.225-275, 1976.

KRÜGER, R. F.; KROLOW, T. K. Seasonal patterns of horse fly richness and abundance in the Pampa biome of southern Brazil. **J Vector Ecol.**, v.40, n.2, p.364-372, 2015.

LECLERCQ, M. Tabanidae de la region neotropical. **Bull. Inst. Agron. De Gembloux**, v.33, n.3, p.377-380, 1965.

LIMA, H. I. L.; T.K. KROLOW, A. L. HENRIQUES. Checklist of horse flies (Diptera: Tabanidae) from Taquaraçu, Tocantins, Brazil, with new records for the state. **Check List**, v.11, p.1596, 2015.

LIMA, H. I. L. **Tabanidae (Diptera) da Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. 2016. 124f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

LIMEIRA-DE-OLIVEIRA, F.; RAFAEL, J. A.; HENRIQUES, A. L. *Phorcotabanus cinereus* (Wiedemann, 1821) (Diptera, Tabanidae) na ornithophilic species of Tabanidae in Central Amazon, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, c839-842, 2002.

LINNAEUS, C. 1758. **Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis**. Tomus I. Editio decima, reformata. – pp. [1–4], 1–824. Holmiæ. (Salvius)

LOHMAN, G. P. Eigenshape analysis of microfossils: a general morphometric procedure for describing changes in shape. **Mathe. Geol.**, v.15, p.659-672, 1983.

LOPES, G. N.; ARIAS, O. R.; CÔNSOLI, F. L. *et al.* The Identity of Specimens of the *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera, Tephritidae) with Atypical Aculeus Tip. **Neotrop Entomol**, v.42, n.6, p.618-627, 2013.

LORENZ, C.; MARQUES, T. C.; SALLUM, M. A. M.; SUESDEK, L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. **Parasites & Vectors**, v.5, p.257, 2012.

LUTZ, A.; SOUZA ARAÚJO, H. C.; FONSECA FILHO, O. Viagem científica no rio Paraná e a Asuncion, com volta por Buenos Aires, Montevideo e Rio Grande. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.10, n.2, p.104-173, 1918.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; THORNE, J. H. Diurnal nectar-feeding of Salt Marsh Tabanidae (Diptera). **Environ. Entomol.**, v.8, n.3, p.544-548, 1979.

MAHALANOBIS, P. C. On the generalised distância in statistics. **Proceedings of the National Institute of Sciences of India**, v.2, n.1, p.49-55, 1936.

MANLY, Byran F. J. **Multivariate Statistical Methods: A Primer**. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC Press, Statistics Texts, 2004.

MANTING, M. M. E.; TORRES, M. A. J.; DEMAYO, C. G. Mandibular Shape Variation in the Three Species Of *Odontomachus* Latreille 1804 (Hymenoptera: Formicidae). **Adv. Environ. Biol.**, v.9, n.19, p.104-113, 2015.

MATIAS, A.; DE LA RIVA, J. X.; TORREZ, M.; DUJARDIN, J. P. *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by its wings. **Mem. Inst. O Cruz.**, v.96, p.947-950, 2001.

MOHAMED-AHMED, M. M.; ABDULLA, M. A.; MOHAMED, Y. O.; EI RAYAH, I. E. *et al.* Trapability of periurban populations of horse flies (Diptera: Tabanidae) in Khartoum State, Sudan. **J. Sci. Technol.**, v.8, p.46-63, 2007.

MONTEIRO, Leandro Rabello; REIS, Sergio Furtado. **Princípios de Morfometria Geométrica**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 1999.

MOTOKI, M. T.; SUESDEK, L.; BERGO, E. S.; SALLUM, M. A. M. Wing geometry of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in five major Brazilian ecoregions. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, n.6, p.1246-1252, 2012.

MULLENS, B. A. Horse flies and Deer flies (Tabanidae). In: MULLEN, G. R.; DURGEN, L. A. (eds.). **Medical and Veterinary Entomology**. USA: Elsevier, 2002. p.263-277.

PECHUMAN, L. L.; TESKEY, H.J. Tabanidae. In: Manual of Nearctic Diptera (J. F. McAlpine *et al.* ed.). **Research Branch Agriculture Canada**, v.1, p.464-478, 1981.

PERES-NETO, P. R.; JACKSON D. A.; SOMERS K. M. Giving meaningful interpretation to ordination axes: assessing loading significance in principal component analysis. **Ecology**, v.84, p.2347-2363, 2003.

Perich M.; Wright E.; Lusby K. (1986). Impact of Horse Flies (Diptera: Tabanidae) on Beef Cattle. **Journal of economic entomology**. 79. 128-31.

PERRE, P.; JORGE, L. R.; LEWINSOHN, T. M.; ZUCCHI, R. A.; Morphometric Differentiation of Fruit Fly Pest Species of the *Anastrepha fraterculus* Group (Diptera: Tephritidae). **Ann Entomol Soc Am**, v.107, n.2, p.490-495, 2014.

PHILIP, C. B. Tabanidae (Diptera) attracted to artificial lights in California. **Pan-Pacific Entomologist**, v.58, p.365-366, 1982.

RAFAEL, J. A.; CHARLWOOD, J. D. Idade fisiológica, variação sazonal e periodicidade diurna de quatro localidades de Tabanidae (Diptera) no Campus Universitário, Manaus, Brasil. **Act. Amaz.**, v.10, n.4, p.907-927, 1980.

RAFAEL, J. A.; GORAYEB, I. S. Tabanidae (Diptera) da Amazônia I. Uma nova armadilha suspensa e primeiros registros de mutucas de copas de árvores. **Acta Amazon**, v.12, p.232-236, 1982.

RAFAEL, José Albertino; MELO, Gabriel Augusto R.; CARVALHO, Cláudio José Barros; CASARI, Sônia Aparecida; CONSTANTINO, Reginaldo. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2012. .

RICHARDS, O. W.; KAVANAGH, A. C. The analysis of relative growth-gradients and changing form of growing organisms: illustrated by the tobacco leaf. **Amer. Nat.**, v.77, p.385-399, 1943.

ROBERTS, R. H. Feeding of Horseflies (Tabanidae: Diptera) on Plant Juices. **Entomol. News**, v.78, n.9, p.250-251, 1967.

ROHLF, F. J. Relationships among eigenshape analysis, Fourier analysis and analysis of coordinates. **Math. Geol.**, v.18, p.845-854, 1986.

ROHLF, F. J. Rotational fit (Procrustes) methods. **Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop**. Special Publication No. 2 (ed. by F. Rohlf & F. Bookstein). Ann Arbor: University of Michigan Museum of Zoology, 1990. p.227-236.

ROHLF, F. J.; ARCHIE J. W. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Syst. Zool.**, v.33, n.3, p.302-317, 1984.

ROHLF, F. J.; SOKAL R. R. The description of taxonomic relationships by factor analysis. **Syst. Zool.**, v.11, p.1-16, 1962.

ROHLF, F. J.; MARCUS L. F. A revolution in morphometrics. **Trends Ecol. Evol.**, v.8, p. 129-132, 1993.

SCHACHTER-BROIDE, J.; DUJARDIN, J. P.; KITRON, U.; GÜRTLER, R. E. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. **J Med Entomol**, v.41, p.643-649, 2004.

SCHACHTER-BROIDE, J.; GÜRTLER, R. E.; KITRON, U.; DUJARDIN, J.P. Temporal Variations of Wing Size and Shape of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Populations From Northwestern Argentina Using Geometric Morphometry. **Journal of Medical Entomology**, v.46, n.5, p.994-1000, 2009.

SCOLES, G. A.; MILLER, J. A.; FOIL, L. D. Comparison of the Efficiency of Biological Transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae) with Mechanical Transmission by the Horse Fly, *Tabanus fuscicostatus* Hine (Diptera: Tabanidae). **J Med Entomol.**, v.45, n.1, p.109-14, Jan. 2008.

SILVA, R. A. M. S.; DAVILA, A. M. R.; IVERSSON, L. B.; ABREU, U. P. G. Equine viral diseases in the Pantanal, Brazil. Studies carried out from 1990 to 1995. **Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.52, n.1, p.9-12, 1999.

SNEATH, P. H. Trend-surface analysis of transformation grids. **J. Zool.**, v.151, p.65-122, 1967.

SOKAL, R.; SNEATH, P. H. **Principles of Numerical Taxonomy**. W.H. Freeman & Co., San Francisco and London. 1963.

STEELMAN, C. D. Effects of external and internal arthropod parasites on domestic livestock production. **Annu. Rev. Entomol.**, v.21, p.155-178, 1976.

TOWNES, H. A. A lightweight Malaise trap. **Entomological News**, v.83, p.239-247, 1972.



TURCATEL, M.; CARVALHO, C. J. B.; RAFAEL, J. A. Mutucas (Diptera: Tabanidae) do estado do Paraná, Brasil: chave de identificação pictórica para subfamílias, tribos e gêneros. **Biota Neotrop.**, v.7, n.2, p.265-278, 2007.

WALL, R.; SHEARER, David. Adult flies (Diptera). In: **Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control**. 2<sup>a</sup> ed. Iowa: State University Press; Blackwell science Ltd., 2001. p.83-112.

ZAFALON-SILVA, Â. **Padrões de Diversidade de Muscidae (Insecta, Diptera) na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2013. 156f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

ZELDITCH, Miriam Leah; SWIDERSKI, Donald L.; SHEETS, David H.; FINK, William L. **Geometric Morphometrics for Biologists A Primer**. New York; London: Elsevier Academic Press, 2004.