

RELAÇÕES GENÉTICO-AMBIENTAIS EM *Drosophila incompta* -
UMA ESPÉCIE DE ECOLOGIA RESTRITA

Paulo Roberto Petersen Hofmann

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Genética da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul,
para obtenção do grau de Mestre em
Genética

Porto Alegre

- 1982 -

A Seldon e Lourdes

meus pais

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marly Napp, pela amizade e confiança, além da o rientação segura.

À mestre Vera L.S.V. Gaiesty a quem devo minha iniciação na pesquisa, e a quem admiro como excelente profissional e amiga.

Aos amigos Vivian, Laura e Saint-Hilaire, que me apoiaram e souberam me compreender nas horas mais difíceis.

À licenciada Claudete M.B. de Borba, à mestre Maria Luiza Reguly e à Dra. Alice K. Oliveira pela amizade e atuação ao longo de todo este período.

Às Sras., Claudete Lima, Juracy Xavier, Vera Rodrigues e Nena Morales, pela ajuda nas técnicas laboratoriais e, principalmente, pelo carinho e amizade.

Ao Sr. Danúbio Ramila pelas coletas de flores de *Cestrum*.

Ao Dr. Aldo Mellender de Araújo e Dra. Helga Winge pelas sugestões ao longo do trabalho.

À mestre Maria Teresa Schiffino pela tradução para o inglês do Resumo e Conclusões.

Aos professores do Departamento de Biologia da UFSC, em especial aos da Divisão de Genética que assumiram parte de minha carga didática, me possibilitando a conclusão deste traba-

lho.

A meus amigos, colegas e mestres.

Às instituições que permitiram a realização desse trabalho: ao CNPq pela bolsa e pelo auxílio através do Plano Integrado de Genética (PIG II e III) e CEPP-UFRGS.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. Escolha do material	14
2.2. Época e Locais de Coleta	16
2.3. Método de Coleta	20
2.4. Preparo das Amostras	20
2.5. Técnica de Eletroforese	22
2.6. Análise dos Zimogramas	24
2.7. Análise Estatística	24
3. RESULTADOS	25
3.1. Leucina Aminopeptidase (LAP)	25
3.1.1. Amostras de verão de 1981	29
3.1.2. Amostras de inverno de 1981	30
3.1.3. Comparação entre os locais nas diferen- tes épocas	30
3.2. Esterase 1 (EST-1)	31
3.2.1. Amostras de verão de 1981.....	35
3.2.2. Amostras de inverno de 1981	35
3.2.3. Comparação dos locais em diferentes épo- cas	36
3.3. Esterase 2 (EST-2)	37
3.3.1. Amostras de verão de 1981	37
3.3.2. Amostras de inverno de 1981	41
3.3.3. Comparação dos locais em diferentes épo- cas	41
4. DISCUSSÃO	43
5. RESUMO E CONCLUSÕES	56
6. SUMMARY AND CONCLUSIONS	58
7. BIBLIOGRAFIA	60

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A partir do momento em que a eletroforese em gel começou a ser usada como instrumento para detectar variabilidade genética existente em populações naturais (HUBBY e LEWONTIN, 1966; LEWONTIN e HUBBY, 1966; HARRIS, 1966), muitos trabalhos têm sido realizados com vários objetivos. Esta técnica tem possibilitado, dentre outras coisas, estudos de filogenia quando os autores comparam o grau de distância e/ou similaridade genética entre espécies relacionadas (HUBBY e THROCKMORTON, 1968; AYALA e col., 1970 e 1974; NAIR e BRNCIC, 1971; JOHNSON, 1973; TURNER, 1974; JOHNSON e col., 1975; CARSON e JOHNSON, 1975; COYNE, 1976; SENE e CARSON, 1977; NAPP e CORDEIRO, 1981). Estes estudos têm permitido avaliar o nível de modificação genética que ocorre durante o processo de especiação.

Porém, o motivo de maior polêmica em relação à abundância de variabilidade revelada através desta técnica tem sido a sua origem e contribuição para o valor adaptativo das populações.

Existe um grupo de autores que defende ser esta variabilidade devida a uma seleção balanceadora (Teoria Seleccionista), enquanto um outro grupo considera que a maior parte da variabilidade contribui igualmente para o valor adaptativo das populações e, portanto, seja neutra seletivamente (Teoria Neutra

lista).

Adeptos da Teoria Neutralista argumentam que a variabilidade existente nas populações naturais surge por mutações neutras que são mantidas pelo acaso (SHAW, 1965; KIMURA, 1968 e 1969, KING e JUKES, 1969). Estes autores propuseram alguns modelos matemáticos que mostram ser possível a manutenção de um polimorfismo apenas através de um equilíbrio entre a taxa de mutação e a eliminação da mesma por problemas de amostragem, salientando o papel importante do acaso na determinação da estrutura genética das populações.

KIMURA e OHTA (1971), KIMURA e MARUYAMA (1971) realizaram estudos teóricos onde sugeriram que a maioria dos polimorfismos de proteínas são fases transitórias de uma evolução molecular.

KIMURA (1962) propôs um modelo, sugerindo que a possibilidade de fixação de um gene mutante depende não só do tamanho efetivo da população e do coeficiente médio de seleção, como também da proporção entre a média e a variância do coeficiente de seleção. Este modelo foi rediscutido por OHTA (1972) que concluiu que quando esta proporção é pequena, mesmo a seleção estando presente contra o gene mutante, ele é fixado como se fosse um mutante seletivamente neutro.

YAMAZAKI e MARUYAMA (1972 e 1975) utilizaram um modelo estatístico que não dependia da taxa de mutação, estrutura populacional ou fatores ecológicos. Os resultados indicaram que grande parte do polimorfismo é mantido por mutação e deriva genética, apesar de outros autores acharem que a análise realizada não seja suficiente para provar que o polimorfismo detectado é neutro seletivamente.

Mais recentemente, WATANABE e WATANABE (1975), GAINES e WHITTAM (1980), DYKHUIZEN e HARTL (1980) obtiveram, em seus estudos experimentais, evidências de que o polimorfismo alozímico é mantido por forças não seletivas.

O principal argumento dos selecionistas em favor de sua teoria tem sido baseado na observação de uma grande similaridade de frequências alélicas, quando se comparam diferentes localidades onde uma espécie de ampla distribuição vive. Eventos casuais não poderiam levar a tais níveis de similaridade como foi encontrado por PRAKASH e col. (1969), AYALA e col. (1971), RICHMOND (1972) entre outros. Entretanto, KIMURA e OHTA (1971) defendem que a migração juntamente com eventos casuais poderiam também ser responsáveis por estes padrões.

Outro aspecto, além da similaridade alélica entre populações, que tem chamado a atenção dos selecionistas é a diferença entre populações centrais e marginais. Alguns autores têm verificado que populações centrais são mais polimórficas do que as marginais, apesar de que esta observação se relaciona muito mais com o polimorfismo cromossômico do que com o alozímico (para maiores esclarecimentos consultar SOULÉ, 1973).

Um terceiro ponto de observação é o comportamento diferencial das frequências gênicas de populações de uma mesma espécie no tempo e no espaço, muitas vezes, inclusive, apresentando um padrão clinal. SELANDER e col. (1970) observaram que, apesar da estabilidade morfológica apresentada por *Limulus polyphemus* desde o Triássico (200 milhões de anos atrás) provavelmente devida a uma uniformidade temporal das relações ambiente-organismo e/ou homeostase genética, sete dos nove locos estudados mostraram diferenças nas frequências alélicas entre populações

da Costa Atlântica e do Golfo do México. Estes dados sugerem que a variação genética neste organismo é adaptativa.

Inúmeros outros trabalhos indicam, em suas conclusões, que o polimorfismo alozímico se mantém graças a alguma forma de seleção balanceadora.

PRAKASH e col. (1969) AYALA e col. (1972) entre outros, interpretaram que esta seleção balanceadora poderia ser um tipo de seleção em favor do heterozigoto (heterótica), apesar de que, já em 1966, LEWONTIN e HUBBY argumentaram que este tipo de seleção heterótica traria à população uma carga genética muito elevada, não havendo portanto uma explicação simples para a manutenção deste polimorfismo.

Entretanto, SVED e col. (1967) MILKMAN (1967) e outros propõem modelos matemáticos que explicariam a existência de valores altos de polimorfismo sem que isto implicasse em uma carga demasiadamente pesada para a população.

KOJIMA e YARBROUGH (1967), YARBROUGH e KOJIMA (1967) e KOJIMA e TOBARI (1969) sugeriram a existência de uma seleção dependente de frequência; SEMEONOFF e ROBERTSON (1968) supõem uma seleção dependente de densidade.

No entanto POWELL (1975), baseando-se no fato de que apenas uma parte de toda a variabilidade genética foi até o momento estudada e que nem os selecionistas afirmam que toda variabilidade é adaptativa, nem os neutralistas que é seletivamente neutra, concluiu que a evolução não é controlada apenas por fatores estocásticos ou por fatores determinísticos, mas por uma combinação de ambos.

Segundo VAN VALEN (1965) uma das formas através das quais uma espécie mantém sua variabilidade genética sem implicar

em uma carga genética muito grande seria através da adaptação diferencial de indivíduos de uma população a ambientes variados.

Assim, uma abordagem para tentar explicar a manutenção do polimorfismo cromossômico e alozímico em populações naturais é a sua associação com variáveis presentes no ambiente em que elas vivem ou com variáveis controladas em experimentos de laboratório.

Dentre os trabalhos realizados com populações artificiais, *Drosophila* tem se constituído no organismo mais utilizado. DA CUNHA (1957), POWELL (1971 e 1973) analisaram populações de *D. willistoni*; WILLS e col. (1975), MARINKOVIC e AYALA (1975), POWELL e WISTRAND (1978), populações de *D. pseudoobscura*; JOHNSON e POWELL (1974), VAN DELDEN, BOEREMA, KAMPING (1978), BIRLEY e MARSON (1981), populações de *D. melanogaster*; LANKINEM e PINSKER (1977), PINSKER (1981), populações de *D. subobscura*; BUDNIK e BRNCIC (1972), populações de *D. pavani* e *D. gaucha*; BRNCIC (1968), populações de *D. flavopilosa*. Em todos estes trabalhos foram encontradas correlações positivas entre a variabilidade genética (cromossômica e alozímica) e variáveis ambientais controladas, portanto, apoiando a teoria seccionista.

Por outro lado, uma série de trabalhos com populações naturais também têm sido realizados, tanto com espécies ecologicamente versáteis como com espécies ecologicamente restritas.

As espécies do gênero *Drosophila* apresentam grandes diferenças em termos de exploração do ambiente. Temos espécies cosmopolitas, como por exemplo, *D. melanogaster*, que vive principalmente associada a atividades humanas. Outras espécies habitam ambientes silvestres, como é o caso de *D. willistoni* e

D. simulans, ecologicamente muito versáteis, que apresentam uma distribuição muito ampla e exploram vários recursos como fonte de alimento e oviposição (WINGE, 1971; BRNCIC e VALENTE, 1978).

Existem ainda espécies que são geograficamente muito localizadas e do ponto de vista ecológico são altamente especializadas. Sua distribuição e abundância depende da abundância e distribuição do nicho ecológico que elas exploram (BRNCIC, 1970). De acordo com este autor, o estudo da genética destas espécies ecológica e geograficamente restritas é importante para o conhecimento das complexidades do processo evolutivo, pois elas representam o tipo mais comum de espécies no gênero *Drosophila*. Um exemplo típico é o de *D. carcinophila*, segundo CARSON - 1971 (citado por DOBZHANSKY, 1977), que se desenvolve nos sulcos néfricos exteriores do terceiro maxilípede do caranguejo da terra *Geocarcinus ruricola*, em ilhas do Caribe e de outras espécies de *Drosophila* que vivem associadas a uma única planta hospedeira como as espécies cactofílicas (BARKER e MULLEY, 1976) e as do grupo *flavopilosa* (BRNCIC, 1966).

Em espécies versáteis, DOBZHANSKY e PAVAN (1950) relacionaram inversões cromossômicas com variação espacial e sazonal para uma série de populações de *Drosophila* no Brasil; DA CUNHA e col. (1950) e DA CUNHA e DOBZHANSKY (1954) em *D. willis toni* observaram a adaptação conferida por certos polimorfismos cromossômicos ao ambiente explorado pelas populações estudadas; DA CUNHA (1951) analisou a influência do hábito nutricional na modificação do valor adaptativo de combinações cromossômicas; DA CUNHA, BRNCIC e SALZANO (1953) relacionaram a quantidade de polimorfismo cromossômico com a variabilidade de nichos ecológicos existentes para sete espécies de *Drosophila* sul ame

ricanas; SALZANO (1955) confirmou estes resultados para *D. guaramunu* e *D. griseolineata*; PIPKIN e col. (1973) observaram a influência da temperatura no polimorfismo do loco de Álcool Desidrogenase (ADH) no gênero *Drosophila*; RICHARDSON e col. (1977) correlacionaram 3 espécies do complexo *mulleri* - *D. mojaviensis*, *D. arizonensis* e *D. longicornis* (esta ecologicamente restrita) com o substrato larval por elas explorado; TSUNO (1975) em *D. virilis* e PRAKASH (1976) em *D. pseudoobscura* descreveram associações de arranjos cromossômicos e locos enzimáticos com condições ambientais.

Utilizando *D. melanogaster*, JOHNSON e SCHAFER (1973) obtiveram correlações positivas entre padrões genéticos (associação entre locos devido ao fenômeno de ligação) e entre relações genético-ambientais; VOELKER e col. (1978) encontraram um padrão clinal tanto para inversões como para alozimas; STALKER (1980) estudou a associação entre a frequência de inversões com variáveis ecológicas (latitude e estações do ano).

PINSKER e SPERLICH (1979 e 1981), SPERLICH e col. (1980) estudaram o polimorfismo cromossômico e alozímico de sete populações de *D. subobscura*, desde a Escandinávia até o norte da África, encontrando uma variação clinal ao longo do gradiente norte-sul, tanto nas frequências de arranjos gênicos como nas frequências alélicas; SPERLICH e col. (1981) compararam estas mesmas populações com uma população russa (Caucasus) tendo encontrado também um alto polimorfismo cromossômico, porém, uma baixa heterozigotidade média para os diferentes locos estudados.

Analisando *D. persimilis*, TAYLOR e POWELL (1977) estudaram o polimorfismo enzimático e cromossômico associando-os com a variabilidade microgeográfica e temporal; RICHMOND (1978) tra

balhou com populações de *Drosophila affinis* e mostrou que existem diferenças significantes nas frequências de polimorfismo cromossômico e alozímico sugerindo, assim, que a seleção de habitat pode ser importante na manutenção de diferenças microespaciais de algumas espécies.

No sul do Brasil, ALBUQUERQUE e NAPP (1981) relacionaram o loco da Esterase - 6 (Est-6) de *D. simulans* com a diversidade de nichos alimentares explorados por esta espécie, enquanto, VALENTE e ARAÚJO (1981) e BORBA e NAPP (1981) analisaram, respectivamente, o polimorfismo cromossômico e o polimorfismo enzimático nas mesmas populações de *D. willistoni* considerando época, local, nichos de oviposição e/ou alimentação, como variáveis ambientais. Ainda em *D. willistoni*, RIOS e CORDEIRO (1980) mostraram a existência de uma correlação entre a altitude e a frequência alélica de um loco de Leucina Aminopeptidase (Lap-5).

Outros organismos também foram utilizados na tentativa de relacionar a variabilidade cromossômica e alozímica com o ambiente por eles explorado. SELL e col. (1978) encontraram diferenças significativas nas frequências gênicas de populações de *Hypera postica* (gorgulho da alfafa) do leste e do oeste dos Estados Unidos, tendo algumas destas diferenças sido correlacionadas com variáveis geográficas como altitude, latitude e longitude. JOHNSON e col. (1969) observaram a variação de 3 locos enzimáticos em relação ao gradiente longitudinal (condições climáticas gerais) da formiga *Pogonomyrmex barbatus*, enquanto TOMASZEWSKI e col. (1973) analisaram 2 locos (Amilase e Naftilamidase) de populações de *Pogonomyrmex badius* do sudeste dos Estados Unidos, relacionando a variação encontrada com dados climatológicos; SAUL e col. (1978) correlacionaram o loco da Esterase 6

(Est-6) com as diferenças no habitat larval do mosquito *Aedes triseriatus*; GAINES e col. (1978) trabalharam com o rato de pradaria *Microtus ochrogaster* - associando o padrão temporal da variação alozímica para os 5 locos estudados com a densidade populacional e outros componentes do valor adaptativo; GYLLENSTEN e col. (1980) e RYMAN e col. (1980) obtiveram correlação positiva entre a variabilidade genética e a heterogeneidade espacial, os primeiros em relação ao loco da Transferrina, enquanto o segundo grupo analisando 5 locos enzimáticos de *Alces alces*; KOHEN (1978) observou o comportamento do loco da Leucina Aminopeptidase (Lap) em relação ao ambiente salino explorado pelo mexilhão *Mytilus edulis*; CHRISTIANSEN e FRYDENBERG (1974) analisaram o padrão de clinas paralelas de dois locos - esterase e hemoglobina - em *Zoarces viviparus* (teleosteo marinho).

Em vegetais, HAMRICK e ALLARD (1972) e HAMRICK e HOLDEN (1979) estudaram a influência de heterogeneidade de microhabitat e microgeográfica sobre a distribuição alélica em populações de *Avena barbata*, tendo sido encontrada uma forte correlação entre as variáveis citadas.

Novamente a teoria selecionista é fortalecida, uma vez que todos estes trabalhos mostram forte associação entre a variabilidade genética e a heterogeneidade ambiental.

Quanto a espécies ecologicamente restritas, a quantidade de trabalhos realizados é consideravelmente menor do que com espécies versáteis. No entanto, alguns trabalhos serão referidos.

Estudando *D. buzzatti* - espécie cactofílica do complexo *mulleri* que utiliza somente espécies de cactus do gênero *Opuntia* como sítio de oviposição - BARKER e MULLEY (1976) encon-

traram baixos níveis de heterozigosidade para uma população australiana, porém sugerem que alguma forma de seleção balanceadora poderia estar atuando para manter a variabilidade existente. Os mesmos autores (1977) observaram a distribuição de uma outra espécie do mesmo complexo - *D. aldrichi* - e consideraram-na um excelente objeto de estudo devido a sua condição de população que habita locais ecologicamente marginais; MULLEY e col. (1979) analisando *D. buzzatti* encontraram significativa associação entre condições ambientais - dados climatológicos gerais associados com a latitude, distância do local de coleta em relação a costa e diferentes épocas do ano - em cinco dos seis locos estudados.

ROCKWOOD-SLUSS e col. (1973) estudando *D. pachea* - outra espécie cactofílica que tem como sítio de oviposição o cactus *Lophocereus schottii* - evidenciaram uma grande uniformidade sazonal e geográfica nas frequências gênicas e genotípicas. Os autores sugerem que uma interação entre seleção e migração é que mantém esta uniformidade.

PRAKASH (1973) observou a baixa frequência de variação alélica em *D. busckii* e comparou com outras espécies que se associam a habitats domésticos sugerindo que esta baixa variabilidade seja devido a adaptação ao seu nicho restrito, uma vez que esta espécie apresenta uma restrição sazonal de nicho de cruzamento (PATTERSON 1943 - citado por PRAKASH 1973) e, mesmo explorando vários frutos como recurso trófico, é encontrada em muito menor frequência em relação a outras espécies domésticas como, por exemplo, *D. melanogaster*.

BRNCIC (1972 e 1976) evidenciou que existia flutuação sazonal e variação geográfica quanto ao polimorfismo cromossô-

mico em populações chilenas de *D. flavopilosa*. Esta variação ocorria tanto em relação a gradientes de altitude como também no gradiente Norte-Sul, provavelmente devido às condições climáticas a elas relacionadas (especialmente a temperatura).

Entretanto, BRNCIC e NAPP (1980) estudando a variação alozímica dos locos de Leucina Aminopeptidase (Lap), e Esterases (Est-1 e Est-2) também em populações chilenas desta mesma espécie, somente encontram diferenças geográficas em relação a alguns alelos do loco Esterase 2 (Est-2), e estas diferenças não seguem um gradiente de altitude.

Espécies do grupo *flavopilosa* vivem na região Neotropical e são consideradas ecologicamente restritas por explorarem como sítio de oviposição, desenvolvimento larval e alimentação, flores do gênero *Cestrum*, Solanaceae (BRNCIC, 1966). *Drosophila incompta* (WHEELER e col., 1962), oviposita nas pétalas das flores abertas, ao contrário de outras espécies do mesmo grupo que ovipositam em flores fechadas, como é o caso de *D. flavopilosa* (BRNCIC, 1966) e *D. cestri* (BRNCIC, 1978). Estas duas espécies colocam o ovo no tubo da corola através de uma pequena perfuração, provavelmente feita pela própria fêmea, com o auxílio de espinhos que elas apresentam no seu ovipositor.

Posteriormente, as larvas migram em direção à base da flor, onde se nutrem e finalmente empupam.

No Rio Grande do Sul, quatro espécies deste grupo foram encontradas: *D. incompta*, *D. cestri*, *D. cordeiroi* (BRNCIC, 1978) e *D. flavopilosa*. As duas últimas ocorreram numa frequência bastante baixa em coletas realizadas durante os anos de 1976 e 1977 (BRNCIC, 1978), porém as primeiras apresentaram um grande número de indivíduos nas mesmas coletas, tendo sido inclusive

encontradas juntas em amostras de uma mesma planta.

Drosophila incompta foi encontrada em flores de diferentes espécies do gênero *Cestrum* desde o Panamá e República Dominicana (WHEELER e col., 1962), até o sul do Brasil (BRNCIC, 1978), numa frequência bastante acentuada durante todas as épocas de floração do referido gênero.

Especificamente no sul do Brasil, NAPP e BRNCIC, (1978) realizaram coletas durante a primavera de 1977 no parque Zoológico (município de Sapucaia do Sul). Nesta ocasião, foi determinado o padrão eletroforético para seis sistemas enzimáticos e ainda o de proteínas totais de *D. cestri* e *D. incompta*. Os sistemas analisados foram: Esterases (EST), Leucina Aminopeptidase (LAP), Glutamato-oxalacetado Transaminase (GOT), Aldeído Oxidase (AO), Xantina Desidrogenase (XDH) e Malato Desidrogenase (MDH). Além disso, para os locos da Lap, Est-1 e Est-2, que são polimórficos, os autores fizeram um levantamento das frequências alélicas.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Estudar, por análise eletroforética, a variação sazonal e espacial de cinco populações de *Drosophila incompta* coletadas em três diferentes locais do Rio Grande do Sul.

- Avaliar as diferenças nas frequências alélicas de três locos (Esterases 1 e 2; Leucina Aminopeptidase) entre as diferentes populações e tentar relacioná-las com alguns fatores ecológicos que possam estar interagindo nas mesmas.

- Obter informações adicionais sobre a quantidade de variação genética que existe em populações naturais de espécies ecologicamente restritas e contribuir para o conhecimento do significado biológico desta variação.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. - Escolha do material

O estudo de espécies ecologicamente restritas tem sido muito importante quando se pretende relacionar a variabilidade genética com a diversidade ambiental. O fato destas espécies utilizarem apenas um meio como sítio de oviposição, desenvolvimento larval e/ou recurso trófico para o adulto, reduz o número de variáveis ambientais que provavelmente estejam envolvidas com o polimorfismo genético nelas encontrado.

Uma série de razões levaram à escolha de *Drosophila in*
compta como objeto de estudo deste trabalho:

- O fato de ser ecologicamente restrita (oviposita e tem seu desenvolvimento larval limitado a flores do gênero *Cestrum*);

- ser abundante em todos os locais e épocas de florescimento da planta hospedeira, que apresenta ampla distribuição no estado do Rio Grande do Sul;

- ser facilmente distinguida, através da genitália externa, de outras espécies do mesmo grupo;

- apresentar um polimorfismo para Esterases (dois locos) e Leucina Aminopeptidase (um loco), já determinados (NAPP e BRNCIC, 1978) e de detecção relativamente fácil nas condições

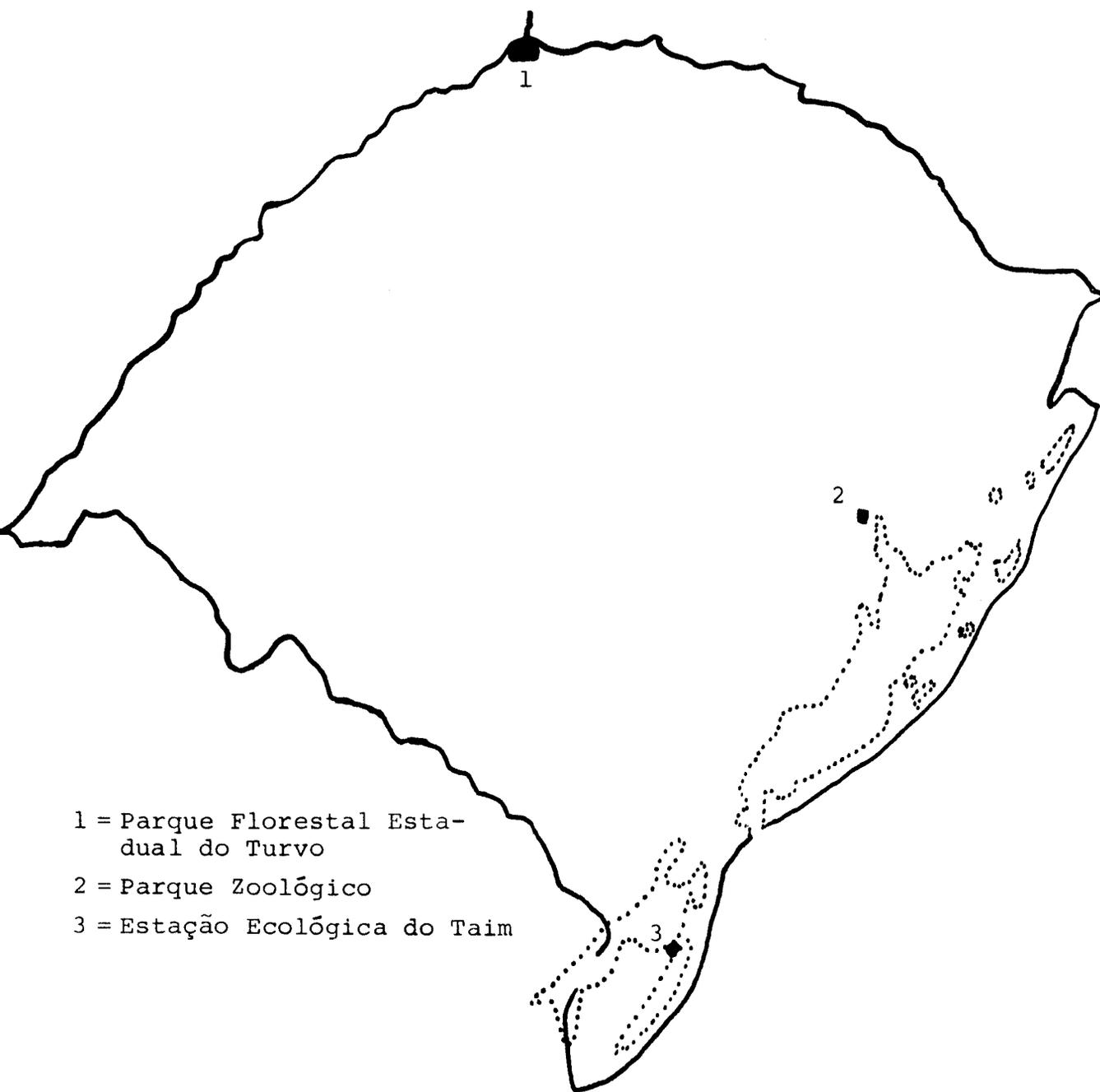


FIGURA 1. Mapa do estado do Rio Grande do Sul, indicando os locais de coletas.

técnicas utilizadas;

- haver possibilidade de congelamento dos indivíduos adultos antes de serem utilizados na técnica eletroforética, sem causar alterações na atividade dos locos analisados. Este fato torna-se especialmente importante porque *D. incompta* não se mantém em meio de cultura comumente usado no laboratório morrendo poucas horas após a emergência do imago. Várias tentativas de feitura de um meio especial, empregando, inclusive, um macerado das flores de *Cestrum* foram infrutíferas (BRNCIC, comunicação pessoal).

2.2. Época e Locais de Coleta

Três locais foram utilizados para coletas, representando três unidades geomórficas e ambientes ecológicos distintos do estado do Rio Grande do Sul; as coletas foram feitas durante os meses de fevereiro e agosto de 1981, caracterizando o verão e o inverno do estado, respectivamente.

I) Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul - Parque Zoológico, município de Sapucaia do Sul - 25 km de Porto Alegre (Figura 1).

- Altitude: nível do mar
- Coordenadas: aproximadamente, 29°50' latitude Sul e 51°10' longitude oeste.
- Região Geomórfica: Depressão Periférica (MÜLLER FILHO, 1970).
- Caracterização do Ambiente: árvores de grande porte, bem ensolarado, presença de moradia humana perto dos arbustos usados nas co-

letas, à beira de uma estrada interna do parque (Figura 2).

II) Estação Ecológica do Taim - município de Santa Vitória do Palmar - cerca de 400 km de Porto Alegre (Figura 1).

- Altitude: nível do mar
- Coordenadas: aproximadamente, $32^{\circ}30'$ de latitude Sul e $52^{\circ}40'$ de longitude oeste.
- Região Geomórfica: Planície Litorânea (MÜLLER FILHO, 1970).
- Caracterização do Ambiente: região de banhado, com pequenos capões, presença de moradia humana perto dos sub-locais de coletas, à margem da BR 471 (Sublocal 1 - (Figura 3) e próxima a margem da Lagoa Mirim (Sub-local 2). Região ventosa.

III) Parque Florestal e Estadual do Turvo - município de Tenente Portela - Cerca de 500 km de de Porto Alegre (Figura 1).

- Altitude: 600 m
- Coordenadas: aproximadamente, 27° de latitude Sul e $54^{\circ}10'$ de longitude oeste.
- Região geomórfica: Planalto Basáltico (MÜLLER FILHO, 1970).
- Caracterização do Ambiente: às margens do Rio Uruguai, mata subtropical quente e úmida, ao longo de duas estradas internas do parque, ambiente mais úmido e sombrio (Estrada do Porto - Figura 4) e mais seco e ensolarado (estrada do Salto -

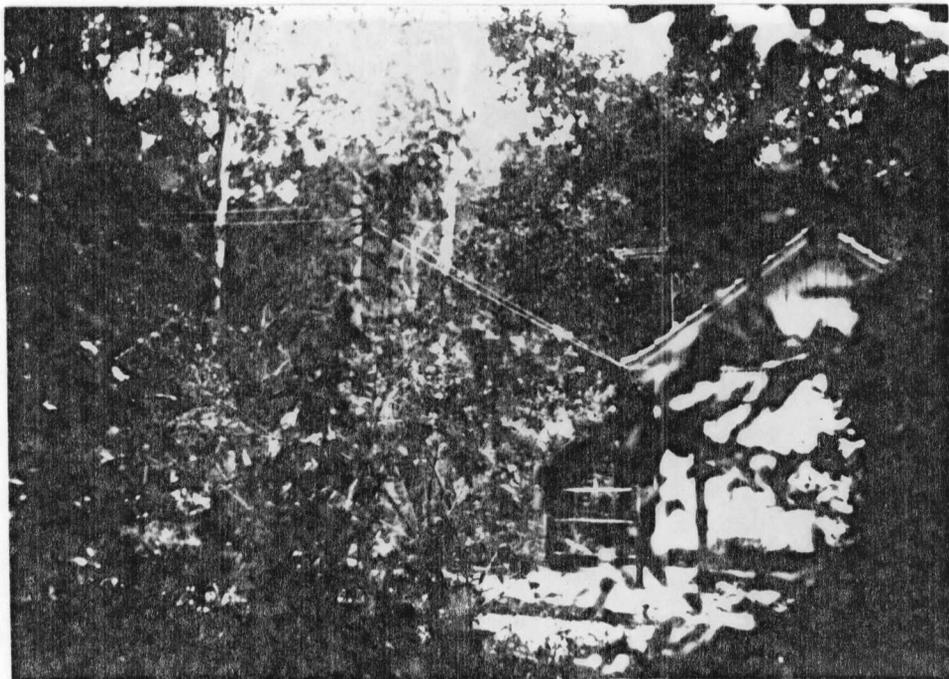


FIGURA 2. Fotografia do local de coleta no Parque Zoológico.



FIGURA 3. Fotografia do sub local 1 da Estação Ecológica do Taim.



FIGURA 4. Fotografia da estrada do Porto, sub-local do Parque Florestal Estadual do Turvo.



FIGURA 5. Fotografia da estrada do Salto, sub-local do Parque Florestal Estadual do Turvo.

Figura 5).

2.3. Método de Coleta

Inflorescências de *Cestrum calycinum* Willd (nome popular: Coerana), (Figura 6), em diversos estágios de florescimento, foram coletadas nos três locais (cinco sub-locais) referidos, colocados em potes plásticos com tampas perfuradas, acondicionados em isopor e levados aos laboratório do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

No laboratório, o material foi distribuído em vidros de 1/4 l, forrados com Plumatex umedecido, tampados com rolhas de espuma e mantido em câmara de temperatura constante ($25^{\circ}\text{C}\pm 1$) e umidade relativa variando em torno de 60%.

Durante os dias que se seguiam, o material era mantido umedecido. Na medida em que os adultos emergiam, iam sendo separados segundo a determinação das espécies e distinção do sexo, sendo, posteriormente, congelados e mantidos a uma temperatura de -9°C até o momento da aplicação eletroforética.

As determinações do material vegetal foram realizadas pelo professor Bruno Irgang do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2.4. Preparo das Amostras

O material foi homogeneizado em placas de acrílico com 26 escavações de 7 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade. Durante esta operação, o material foi mantido em caixas de gelo.

Os indivíduos (machos ou fêmeas) foram colocados, indi

vidualmente, em 23 escavações juntamente com dois microlitros do tampão de gel. O material, após macerado com bastões de vidro com ponta esmerilhada, foi absorvido por dois retângulos de papel Whatmann nº 3 (4 mm x 1 cm).

Estes papéis embebidos de homogenizados foram aplicados sobre o gel em 23 fendas abertas com o auxílio de pentas de aço inoxidável. Os homogenizados foram aplicados em dois pontos (marcados com uma caneta esferográfica) e controlados com os pontos de aplicação.



FIGURA 6. Fotografia de uma inflorescência de *Cestrum calycinum*, em vários estágios de florescimento, na Aminopeptidase, de *Cyanogum 41R*.

Uma vez aplicado o material nos géis, estes eram colocados a migrar em cubas eletroforéticas mantidas a 4°C sob uma diferença de potencial em torno de 10 volts/cm. Os panos ou papéis filtro, em contato com a solução tampão por onde a passagem da eletricidade ocorria, foram sempre colocados a 1 cm do ponto de aplicação dos homogenizados nos géis e a 12 cm dos panos ou papéis da extremidade oposta aos mesmos.

Após cerca de 10 minutos de migração, os papéis embebidos em homogenizados eram retirados, sem que a fonte fosse desligada, para tentar evitar a formação de "rastros" de corante quan

vidualmente, em 23 escavações juntamente com dois microlitros do tampão do gel. O material, após macerado com bastões de vidro com ponta esmerilhada, foi absorvido por dois retângulos de papel Whatmann nº 3 (4 mm x 1 mm).

Estes papéis embebidos de homogenados foram aplicados sobre o gel em 23 fendas abertas com o auxílio de pentes de aço inoxidável. Nas três escavações restantes, foram colocados homogenados de machos homozigotos para uma banda controle dos dois sistemas analisados (Leucina Aminopeptidase e Esterases), marcados com azul de Bromofenol para possibilitar o posterior controle da distância de migração. Após, os géis foram cobertos com papel "Zapp" e colocados para migração eletroforética.

2.5. Técnica de Eletroforese

A técnica utilizada neste trabalho foi a mesma proposta por POULIK (1957) usando como suporte de migração géis de acrilamida em concentração 8%, para Esterases, e 6%, para Leucina Aminopeptidase, de Cyanogum 41R.

Uma vez aplicado o material nos géis, estes eram colocados a migrar em cubas eletroforéticas mantidas a 4°C sob uma diferença de potencial em torno de 10 volts/cm. Os panos ou papéis filtro, em contato com a solução tampão por onde a passagem de eletricidade ocorria, foram sempre colocados a 1 cm do ponto de aplicação dos homogenados nos géis e a 12 cm dos panos ou papéis da extremidade oposta aos mesmos.

Após cerca de 10 minutos de migração, os papéis embebidos em homogenados eram retirados, sem que a fonte fosse desligada, para tentar evitar a formação de "rastros" de corante quan

do da revelação.

Quando o frente, marcado com azul de bromofenol, atingia 9 cm do ponto de aplicação a corrente era interrompida e o gel retirado da cuba para ser revelado.

As revelações foram feitas segundo POULIK, nas seguintes soluções reveladoras:

a) Leucina Aminopeptidase

100 ml de tampão Tris Maleato 0,2M pH 5,2

0,04 g de L-Leucyl-B-Naphtylamide (dissolvido em 10 ml de solução metanol 10%, 5 minutos antes do uso)

0,05 g Fast Black - K - salt

Os géis foram incubados a 37^oC por aproximadamente 1 hora.

b) Esterases

100 ml tampão Fosfato pH 6,0

0,1 g Fast Blue BB-salt

1,5 ml Alfa Naphtil Acetato

2 ml Beta Naphtil Acetato

Os géis foram colocados durante 15 minutos, antes de ir ao corante, em tampão fosfato pH 6,0. Após, foram incubados na solução reveladora durante aproximadamente 4 horas.

Quando foram retirados da solução reveladora, os géis foram lavados em água destilada e colocados no fixador. A fixação foi feita em solução 5:5:1 de água destilada, álcool metílico e ácido acético durante aproximadamente 15 minutos para os géis revelados para Esterases e 10 minutos para os de Leucina Aminopeptidase.

Após foi feita nova lavagem em água destilada e o acondicionamento dos géis em papel "Zapp" para serem analisados.

2.6. Análise dos Zimogramas

Foi medida a distância de migração de cada banda do ponto de aplicação até o centro da mesma.

A mobilidade relativa foi calculada tomando-se como referência a distância de migração de uma banda controle de machos homozigotos de uma linhagem endocruzada de *D. willistoní* S. Pedro.

As nomenclaturas utilizadas foram as mesmas sugeridas por NAPP e BRNCIC (1978) afim de possibilitar a comparação daqueles dados com os atuais.

2.7. Análise Estatística

Dois testes estatísticos foram utilizados na análise dos dados no presente trabalho.

O teste do qui-quadrado foi usado com o objetivo de testar o equilíbrio das amostras no tempo (o mesmo local em diferentes épocas) e no espaço (diferentes locais nas mesmas épocas).

Para avaliar as diferenças entre as heterozigosidades obtidas e esperadas foi utilizado o teste d (citado em BAILEY, 1974), que compara duas amostras grandes (n maior do que 30) com um padrão conhecido. A expressão algébrica deste teste é a seguinte:

$$d = \frac{(a/n) - p}{\sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}},$$

onde:

a/n = heterozigosidade obtida

p = heterozigosidade esperada

n = número de indivíduos da amostra

RESULTADOS

3. RESULTADOS

Os três locos analisados apresentaram-se polimórficos. As amostras de verão do Taim-local 2 não foram utilizadas para qualquer cálculo estatístico nem referidas no texto por apresentar um número de indivíduos menor do que 30.

3.1. Leucina Aminopeptidase (LAP)

Este loco apresentou 5 alelos que foram denominados de $Lap^{0,91}$; $Lap^{0,93}$; $Lap^{0,95}$; $Lap^{1,00}$; e $Lap^{1,03}$, segundo suas respectivas mobilidades relativas (Figura 7).

Com exceção do alelo $Lap^{0,91}$ que não apareceu na amostra do Taim-local 2, inverno de 1981 (Tabela 3), todos os outros se fizeram representar mesmo que em baixas frequências (Tabela 1 e 3).

O alelo $Lap^{0,95}$ foi o mais freqüente em todas as amostras oscilando entre as frequências de 0,7826 (Zoológico, verão de 1981) até 0,8867 (Taim-local 1, inverno de 1981). Quando se comparou as frequências deste alelo no mesmo local mas em diferentes épocas, observou-se que as frequências foram sempre menores nas amostras de verão (Tabela 1) do que nas de inverno (Tabela 3).

O segundo alelo em frequência, com exceção da amostra

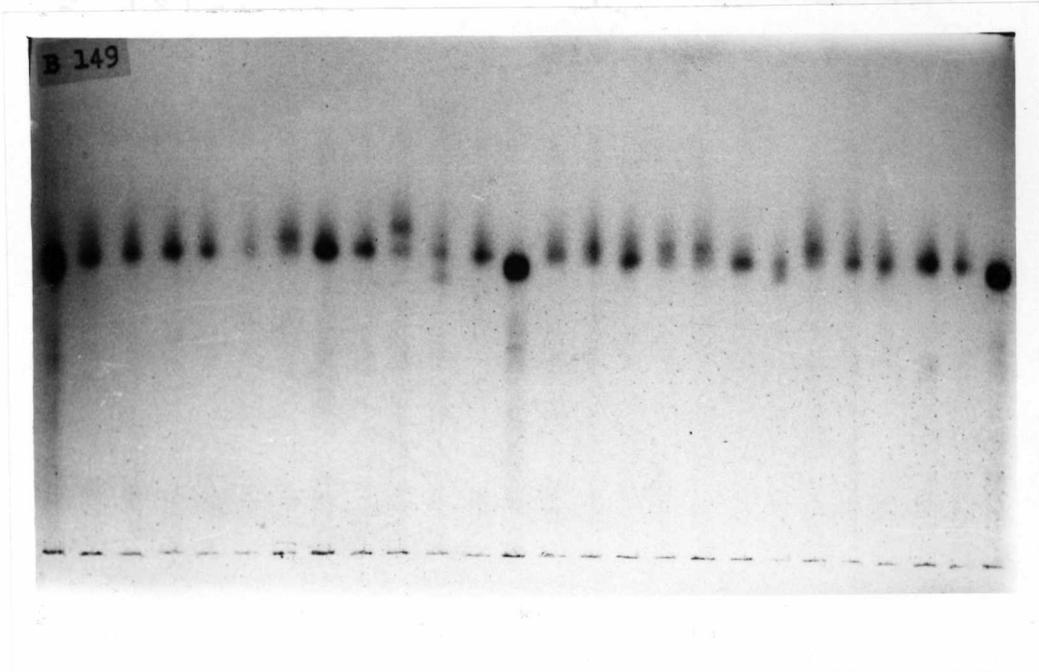


FIGURA 7. Fotografia de um zimograma mostrando diferentes fenótipos do loco da LAP em *Drosophila incompta*. Da esquerda para direita temos:

Controle; Lap^{0,95/0,95}; Lap^{0,95/0,95}; Lap^{0,95/0,95}; Lap^{0,95/0,95}; Lap^{0,95/0,95};
 Lap^{0,95/0,95}; Lap^{0,95/1,00}; Lap^{0,95/0,95}; Lap^{0,95/0,95}; Lap^{0,95/1,03};
 Lap^{0,91/0,95}; Lap^{0,95/0,95}; Controle; Lap^{0,95/0,95}; Lap^{0,95/1,00};
 Lap^{0,95/0,95}; Lap^{0,95/1,00}; Lap^{0,95/1,00}; Lap^{0,95/0,95}; Lap^{0,93/0,95};
 Lap^{0,95/1,00}; Lap^{0,95/0,95}; Lap^{0,95/0,95}; Lap^{0,95/0,95}; Lap^{0,95/0,95};
 Controle.

Obs.: os controles são indivíduos machos de *Drosophila willistonida* localidade de São Pedro.

TABELA 1. Frequências alélicas do loco da Leucina Aminopeptidase (LAP) em *Drosophila incompita* (Verão de 1981).

Local	Sublocal	Alelos					Genes amostrados	Heterozigosidade		d
		0,91	0,93	0,95	1,00	1,03		Obtida	Esperada	
TURVO	Salto	0,0114	0,0614	0,8295	0,0636	0,0341	440	0,2091	0,3028	**
	Porto	0,0127	0,0297	0,8051	0,1313	0,0212	236	0,2627	0,3331	n.s.
ZOOLOGICO	77§ -	0,0090	0,0650	0,8530	0,0710	0,0020	448	0,2100	0,2630 ^{§§}	n.s.
ZOOLOGICO	-	0,0435	0,0797	0,7826	0,0725	0,0217	138	0,2754	0,3734	n.s.
TAIM	Local 1	0,0096	0,0192	0,8462	0,1154	0,0096	104	0,2115	0,2701	n.s.
	Local 2	-	-	0,8333	0,1667	-	24	0,3333	0,1389	'

§ - dados de NAPP & BPNCIC (1978).

§§ - este dados foi recalculado segundo os critérios do presente trabalho.

n.s. - não significante ao nível de 5%.

** - significante ao nível de 1%.

' - não foi calculado $n < 30$.

TABELA 2. Comparação entre as frequências alélicas do loco da Leucina Aminopeptidase (LAP) em *Drosophila incompita* (Verão de 1981) - Teste de χ^2 .

Locais comparados	χ^2 calculado	Probabilidade	GL
a) Porto x Taim Local 1	1,198	0,80 < P < 0,90	4
b) Salto x Zoológico	7,153	0,10 < P < 0,20	4
c) Salto x Taim Local 1	7,629	0,10 < P < 0,20	4
d) Zoológico x Taim Local 1	8,414	0,05 < P < 0,10	4
e) Salto x Porto	10,143	P < 0,05	4
f) Porto x Zoológico	10,729	P < 0,05	4

TABELA 3. Frequências alélicas do loco da Leucina Aminopeptidase (LAP) em *Drosophila incompta* (Inverno de 1981).

Local	Sublocal	Alelos					Genes amostrados	Heterozigosidade		d
		0,91	0,93	0,95	1,00	1,03		Obtida	Esperada	
TURVO	Salto	0,0029	0,0174	0,8606	0,1017	0,0174	344	0,2326	0,2484	n.s.
	Porto	0,0096	0,0288	0,8703	0,0817	0,0096	208	0,1923	0,2349	n.s.
ZOOLÓGICO	-	0,0133	0,0233	0,8734	0,0600	0,0300	300	0,2067	0,2320	n.s.
TAIM	Local 1	0,0133	0,0089	0,8867	0,0844	0,0067	450	0,2089	0,2063	n.s.
	Local 2	-	0,0263	0,8421	0,0855	0,0461	152	0,2368	0,2807	n.s.

n.s. - não significante ao nível de 5%.

TABELA 4. Comparação entre as frequências alélicas do loco da Leucina Aminopeptidase (LAP) em *Drosophila incompta* (Inverno de 1981) - Teste do χ^2 .

Locais comparados	χ^2 calculado	Probabilidade	GL
a) Porto x Salto	2,962	0,50 < P < 0,70	4
b) Porto x Zoológico	3,490	0,30 < P < 0,50	4
c) Zoológico x Taim Local 1	3,870	0,30 < P < 0,50	4
d) Porto x Taim Local 1	4,058	0,30 < P < 0,50	4
e) Salto x Taim Local 2	4,474	0,30 < P < 0,50	4
f) Porto x Taim Local 2	6,242	0,10 < P < 0,20	4
g) Salto x Taim Local 1	6,324	0,10 < P < 0,20	4
h) Salto x Zoológico	7,028	0,10 < P < 0,20	4
i) Zoológico x Taim Local 1	8,111	0,05 < P < 0,10	4
j) Taim Local 1 x Taim Local 2	15,494	P < 0,01	4

do Zoológico, verão de 1981, foi o $Lap^{1,00}$ oscilando entre 0,0600 (Zoológico, inverno de 1981) até 0,1313 (Porto - verão de 1981).

O alelo $Lap^{1,00}$ apresentou um inversão nas frequências entre os 2 sublocais do Turvo: na amostra de verão do Salto a sua frequência foi de 0,0636 enquanto no Porto foi de 0,1313; já no inverno, a frequência no Salto subiu para 0,1017 e no Porto baixou para 0,0817.

Quanto a heterozigosidade com exceção da amostra do Salto - verão de 1981, que apresentou uma diferença significativa ao nível de 1%, todas as demais foram não significantes (Tabela 1 e 3). Apesar da não significância em todos os casos houve um excesso de homozigotos, menos no Taim-local 1, inverno de 1981.

3.1.1 Amostras de verão de 1981

A frequência do alelo mais comum ($Lap^{0,95}$) variou nestas amostras de 0,7826 (Zoológico) até 0,8462 (Taim - local 1) (Tabela 1).

O segundo alelo mais frequente ($Lap^{1,00}$), com exceção da amostra do Zoológico em ele foi o terceiro em frequência, oscilou entre 0,0636 (Salto) e 0,1313 (Porto).

O terceiro alelo mais frequente foi o $Lap^{0,93}$ tendo apresentado uma oscilação bastante grande variando de 0,0192 Taim - local 1 - até 0,0614 no Salto. Não foram consideradas as amostras do Zoológico 1977 por não se tratar da mesma época e do Zoológico 1981 porque nesta amostra este alelo foi o segundo mais frequente.

Quanto aos alelos $Lap^{1,03}$ e $Lap^{0,91}$ mostraram muita va

riação e apresentaram frequências geralmente muito baixas.

A Tabela 2 mostra as comparações estatísticas entre as amostras dos diferentes locais nesta estação.

3.1.2. Amostras de inverno de 1981

Os alelos $Lap^{0,95}$ e $Lap^{1,00}$ foram, respectivamente, o primeiro e o segundo mais comuns com suas frequências variando entre 0,8421 (Taim - Local 2) e 0,8867 (Taim - Local 1) e entre 0,0600 (Zoológico) e 0,1017 (Salto) (Tabela 3).

Os alelos $Lap^{0,91}$; $Lap^{0,93}$ e $Lap^{1,03}$ mostraram grandes oscilações nas diferentes amostras neste período, em geral com frequências bastante pequenas.

Comparações estatísticas entre as amostras duas a duas, nesta época são mostradas na Tabela 4.

3.1.3. Comparação entre os locais nas diferentes épocas

Com o objetivo de comparar as amostras de um mesmo local no tempo, foram realizados testes de χ^2 e obtidos os seguintes resultados:

- a) Taim - Local 1(verão) x Taim - Local 1(inverno) - $\chi^2 = 2,082$; $0,70 < P < 0,80$
- b) Porto(verão) x Porto(inverno) - $\chi^2 = 4,115$; $0,30 < P < 0,50$
- c) Zoológico(verão) x Zoológico(inverno) - $\chi^2 = 12,459$; $P < 0,02$
- d) Zoológico(verão) x Zoológico(1977) - $\chi^2 = 14,229$; $P < 0,01$

e) Salto(verão) x Salto(inverno) - $\chi^2 = 16,360$; $P < 0,01$

f) Zoológico (inverno) x Zoológico(1977) - $\chi^2 = 17,527$;

$P < 0,01$

gl - 4 para todos os testes

3.2. Esterase 1 (Est-1)

Este loco apresentou 6 alelos denominados de Est-1^{0,91}; Est-1^{0,95}; Est-1^{0,97}; Est-1^{1,00}; Est-1^{1,01} e Est-1^{1,03}, a partir de suas mobilidades relativas (Figura 8).

Enquanto nas amostras de verão o alelo Est-1^{1,01} não foi representado em coletas do Zoológico e o alelo Est-1^{1,03} não apareceu no Taim - Local 1 (Tabela 5), todos os alelos se fizeram representar nas amostras de inverno nos 5 diferentes locais (Tabela 7).

O alelo mais freqüente nas amostras do Zoológico nas três épocas analisadas foi o Est-1^{1,00}, variando em suas freqüências de 0,3430 em 1977 até 0,4500 no verão de 1981 (Tabelas 5 e 7). Já para as demais amostras o alelo Est-1^{0,97} foi o mais freqüente oscilando entre 0,3355 (Taim - Local 1, inverno) até 0,5395 (Salto, verão) - (Tabelas 5 e 7).

Quanto ao menos freqüente, as três amostras do Zoológico mostraram o alelo Est-1^{0,91}, oscilando entre 0,0125 (Zoológico, verão) e 0,0300 (Zoológico, 1977), enquanto as outras amostras mostraram o alelo Est-1^{1,03} oscilando entre 0,0079 (Salto, verão) até 0,0395 (Taim - Local 1, inverno), embora tenha sido o segundo mais freqüente nas amostras do Zoológico. Os demais alelos apresentaram uma distribuição muito variável como mostram as Tabelas 5 e 7.

As heterozigosidades obtidas e esperadas mostraram di-

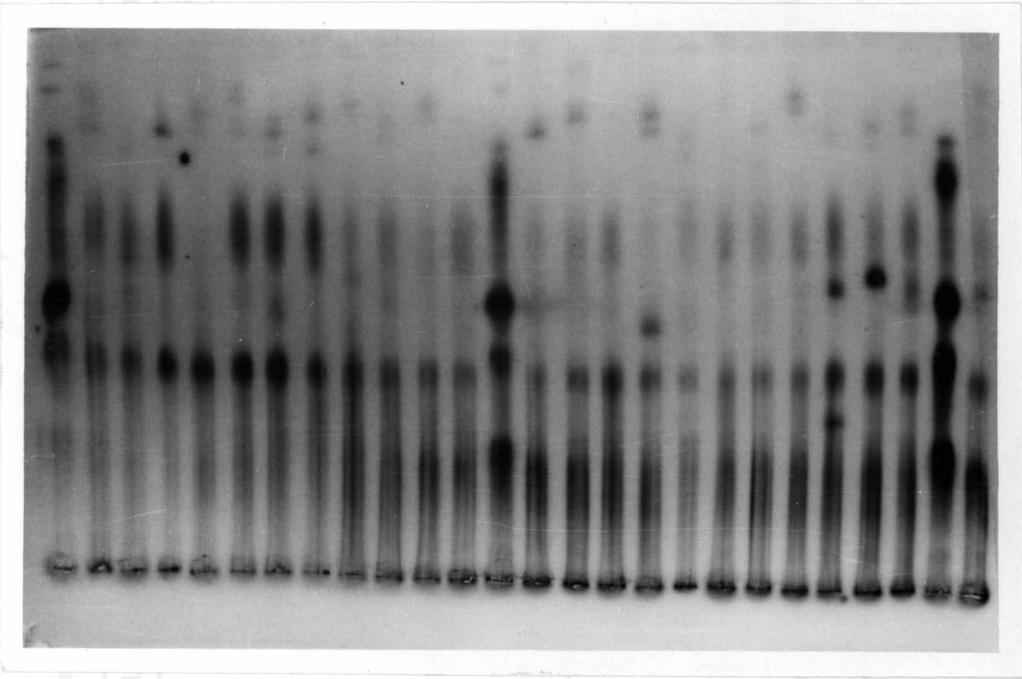


FIGURA 8. Fotografia de um zimograma mostrando diferentes fenótipos do loco da EST-1. Da esquerda para direita temos:

Controle; Est^{0,97/1,01}; não computado; Est-1^{0,97/0,97}; Est-1^{1,00/1,00};
 Est-1^{0,97/1,01}; Est-1^{0,97/0,97}; Est-1^{0,95/1,00}; Est-1^{1,01/1,01};
 Est-1^{0,97/1,00}; Est-1^{1,01/1,01}; não computado; Controle; Est-1^{0,97/0,97};
 não computado; Est-1^{1,00/1,01}; Est-1^{0,97/1,01}; Est-1^{0,97/1,01};
 Est-1^{1,01/1,01}; Est-1^{1,00/1,00}; Est-1^{1,01/1,03}; não computado;
 Est-1^{0,95/0,97}; não computado; Est-1^{0,97/1,00}; Controle.

Obs.: Os controles são indivíduos machos de *Drosophila willistoni* da localidade de São Pedro.

TABELA 5. Frequências alélicas do loco Esterase 1 (EST-1) em *Drosophila incompta* (Verão, 1981).

Local	Sublocal	Alelos						Genes amostrados	Heterozigosidade		d
		0,91	0,95	0,97	1,00	1,01	1,03		Obtida	Esperada	
TURVO	Salto	0,0737	0,1342	0,5395	0,1868	0,0579	0,0079	380	0,4529	0,6472	***
	Porto	0,1250	0,1944	0,4213	0,1620	0,0880	0,0093	216	0,5370	0,7350	***
ZOOLÓGICO	77§ -	0,0300	0,1610	0,2080	0,3430	-	0,2580	236	0,3333	0,7451 ^{§§}	***
ZOOLÓGICO	-	0,0125	0,0625	0,2250	0,4500	-	0,2500	80	0,3000	0,6990	***
TAIM	Local 1	0,0213	0,1596	0,4362	0,2872	0,0957	-	94	0,4043	0,6922	***
	Local 2	-	0,1500	0,5000	0,3500	-	-	20	0,6000	0,6350	'

§ - dados de NAPP & BRNCIC (1978).

§§ - este dado foi recalculado segundo os critérios do presente trabalho.

*** - significante ao nível de 0,1%.

' - não foi calculado n < 30.

TABELA 6. Comparação entre as frequências do loco da Esterase 1 (EST-1) em *Drosophila incompta* (Verão de 1981) - Teste do χ^2 .

Locais comparados	χ^2 calculado	Probabilidade	GL
a) Salto x Taim Local 1	11,234	P < 0,05	5
b) Salto x Porto	13,322	P < 0,05	5
c) Porto x Taim Local 1	14,047	P < 0,02	5
d) Zoológico x Taim Local 1	43,742	P < 0,001	5
e) Porto x Zoológico	93,061	P < 0,001	5
f) Salto x Zoológico	121,978	P < 0,001	5

TABELA 7. Freqüências alélicas do loco da Esterase 1 (EST-1) em *Drosophila incompta* (Inverno de 1981).

Local	Sublocal	Alelos						Genes amostrados	Heterozigosidade		d
		0,91	0,95	0,97	1,00	1,01	1,03		Obtida	Esperada	
TURVO	Salto	0,0485	0,0879	0,4394	0,3030	0,0897	0,0333	330	0,4788	0,6962	***
	Porto	0,0657	0,1970	0,4141	0,2273	0,0707	0,0252	198	0,5506	0,7281	***
ZOOLÓGICO	-	0,0280	0,1049	0,3182	0,3566	0,1608	0,0315	286	0,4196	0,7329	***
TAIM	Local 1	0,0658	0,0987	0,3355	0,1283	0,3322	0,0395	304	0,4210	0,7450	***
	Local 2	0,0769	0,0962	0,4615	0,2500	0,1058	0,0096	104	0,6154	0,6981	n.s.

n.s. - não significante ao nível de 5%.

*** - significante ao nível de 0,1%.

TABELA 8. Comparação entre as freqüências alélicas do loco da Esterase 1 (EST-1) em *Drosophila incompta* (Inverno de 1981) - Teste de χ^2 .

Locais comparados	χ^2 calculado	Probabilidade	GL
a) Salto x Taim Local 2	3,953	0,50 < P < 0,70	5
b) Porto x Taim Local 2	6,753	0,20 < P < 0,30	5
c) Zoológico x Taim Local 2	14,555	P < 0,02	5
d) Salto x Porto	15,584	P < 0,01	5
e) Salto x Zoológico	18,172	P < 0,01	5
f) Taim Local 1 x Taim Local 2	27,343	P < 0,001	5
g) Porto x Zoológico	28,172	P < 0,001	5
h) Porto x Taim Local 1	51,216	P < 0,001	5
i) Zoológico x Taim Local 1	54,427	P < 0,001	5
j) Salto x Taim Local 1	73,695	P < 0,001	5

ferências altamente significativas com exceção do Taim - Local 2, inverno - mostrando sempre um excesso de homozigotos (Tabela 5 e 7).

3.2.1. Amostras de verão de 1981

A frequência do alelo mais comum para o Zoológico nesta época ($Est-1^{1,00}$) foi 0,4500. Já nas demais amostras o alelo mais frequente foi o $Est-1^{0,97}$ que oscilou entre 0,4213 (Porto) e 0,5395 (Salto) (Tabela 5).

Na amostra do Zoológico o segundo alelo mais frequente foi o $Est-1^{1,03}$ (0,2500), no Porto foi o alelo $Est-1^{0,95}$ (0,1944) e nas amostras do Salto e Taim - local 1 - foi o alelo $Est-1^{1,00}$ - oscilando entre 0,1868 (Salto) e 0,2872 (Taim - local 1).

Para o terceiro alelo as posições entre as amostras do Turvo (Salto e Porto) e Taim - local 1 - se inverteram. O alelo $Est-1^{0,95}$ oscilou entre 0,1342 (Salto) e 0,1596 (Taim - local 1) enquanto $Est-1^{1,00}$ apresentou uma frequência de 0,0880 (Porto). No Zoológico, o terceiro alelo mais comum ($Est-1^{0,97}$) apareceu com uma frequência de 0,2250.

As frequências dos demais alelos foram bastantes variáveis nas diferentes amostras.

Comparações entre as quatro amostras, duas a duas, foram feitas através do teste do X^2 (Tabela 6).

3.2.2. Amostras de inverno de 1981

O alelo mais comum para o Zoológico foi o $Est-1^{1,00}$ com uma frequência de 0,3566. Para as demais amostras foi o $Est-1^{0,97}$

oscilando entre 0,3355 (Taim - local 1) e 0,4615 (Taim-local 2) - (Tabela 7).

O segundo mais freqüente para o Zoológico foi o alelo Est-1^{0,97}, (0,3182), para o Taim - local 2 - foi o Est-1^{1,01}, (0,3322) e para as demais amostras foi o Est-1^{1,00}, oscilando entre 0,2273 (Porto) e 0,3030 (Salto).

Enquanto as amostras do Turvo (Salto e Porto) apresentaram a mesma ordem decrescente de distribuição de freqüências alélicas, as amostras do Taim (Local 1 e 2) mostraram uma inversão na freqüência dos alelos Est-1^{1,01} e Est-1^{1,00}; a amostra do Zoológico mostrou-se muito diferente das demais (Tabela 7).

Quando as amostras foram testadas, duas a duas, através do teste do χ^2 , foram obtidos os resultados mostrados na Tabela 8.

3.2.3. Comparação dos locais em diferentes épocas

Comparações estatísticas através do χ^2 apresentaram os seguintes resultados quando testados os mesmos locais em diferentes períodos.

- a) Porto (inverno) x Porto (verão) - $\chi^2 = 8,005$; $0,10 < P < 0,20$; $g1 = 5$
- b) Zoológico (verão) x Zoológico (1977) - $\chi^2 = 6,894$; $0,10 < P < 0,20$; $g1 = 4$
- c) Salto (inverno) x Salto (verão) - $\chi^2 = 26,670$; $P < 0,001$; $g1 = 5$
- d) Taim - Local 1 (inverno) x Taim - Local 1 (verão) - $\chi^2 = 36,130$; $P < 0,001$; $g1 = 5$
- e) Zoológico (inverno) x Zoológico (verão) - $\chi^2 = 55,596$; $P < 0,001$; $g1 = 5$

f) Zoológico (inverno) x Zoológico (1977) - $\chi^2 =$
 96,745; $P < 0,001$; $gl = 5$

3.3. Esterase 2 (Est-2)

Este loco foi o mais polimórfico, dentre os analisados no presente trabalho, apresentando 10 alelos denominados de Est-2^{0,84}; Est-2^{0,89}; Est-2^{0,94}; Est-2^{0,96}; Est-2^{1,00}; Est-2^{1,04}; Est-2^{1,07}; Est-2^{1,09}; Est-2^{1,13}, Est-2^{1,16} a partir de suas mobilidades relativas (Figura 9).

O alelo Est-2^{1,00} foi o mais freqüente em todas as amostras tendo oscilado entre 0,2500 (Taim - Local 2 - inverno) e 0,3899 (Salto - verão) (Tabela 9 e 11).

Os demais alelos apresentaram uma variação muito grande no tempo e no espaço (Tabela 9 e 11).

As heterozigosidades obtidas foram todas muito abaixo das esperadas caracterizando um excesso de homozigotos nas amostras. Cálculos comparativos entre elas foram realizados tendo sido as diferenças estatisticamente significantes ao nível de 0,1% (Tabela 9 e 11).

3.3.1. Amostras de verão de 1981

O alelo mais freqüente foi o alelo Est-2^{1,00} oscilando entre 0,2708 (Taim - Local 1) e 0,3899 (Salto) (Tabela 9).

O alelo Est-2^{1,16} não se fez representar nas amostras do Porto e do Zoológico, enquanto os alelos Est-2^{1,07} e Est-2^{1,13} não apareceram na amostra do Taim - Local 1.

O segundo alelo mais freqüente foi o Est-2^{0,96}, com ex

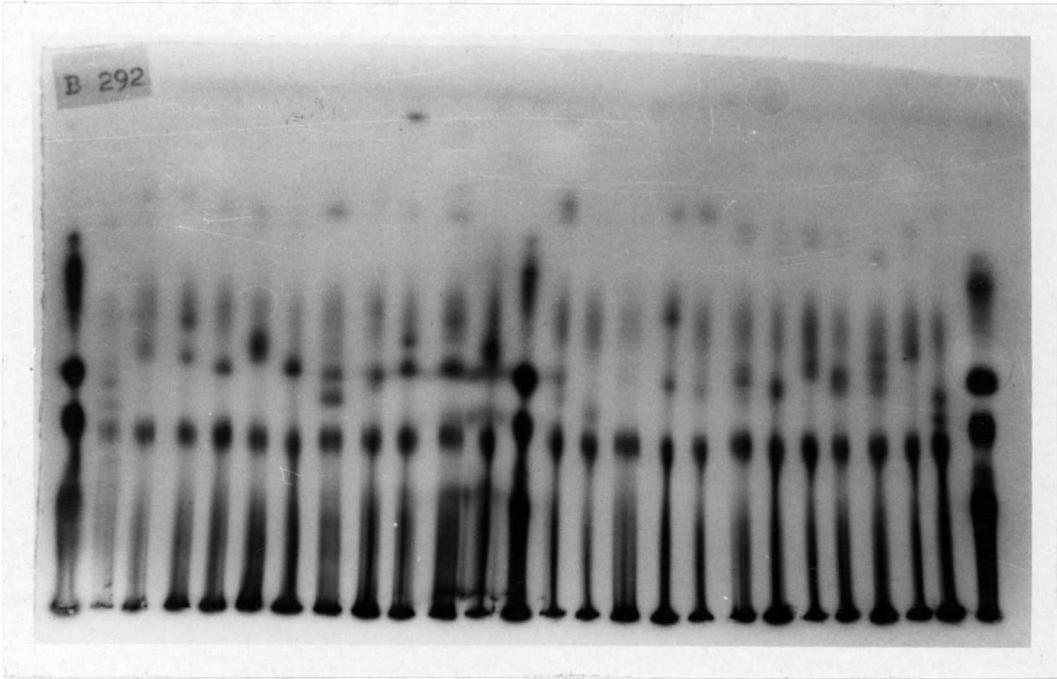


FIGURA 9. Fotografia de um zimograma mostrando diferentes fenótipos do loco da EST-2. Da esquerda para direita temos:

Controle; Est-2^{0,84/0,89}; Est-2^{1,00/1,04}; Est-P^{1,00/1,13}; Est-2^{1,00/1,00};
 Est-2^{1,04/1,07}; Est-2^{1,00/1,00}; Est-2^{0,84/0,96}; Est-2^{0,94/0,94};
 Est-2^{1,00/1,13}; Est-2^{1,00/1,00}; Est-2^{1,07/1,07}; Controle; Est-2^{0,89/0,96};
 Est-2^{0,84/0,84}; Est-2^{1,00/1,00}; Est-2^{0,94/0,94}; Est-2^{0,94/0,94}; não com-
 putado; Est-2^{0,94/0,94}; Est-2^{1,00/1,04}; Est-2^{0,96/0,96}; não computado;
 Est-2^{1,07/1,07}; Est-2^{0,84/0,89}; Controle.

Obs.: Os controles são indivíduos machos de *Drosophila willistoni* da localidade de São Pedro.

TABELA 9. Frequências alélicas do loco Esterase 2 (EST-2) em *Drosophila incompta* (Verão de 1981).

Local	Sublocal	Alelos										Genes amostrados	Heterozigosidade		d
		0,84	0,89	0,94	0,96	1,00	1,04	1,07	1,09	1,13	1,16		Obtida	Esperada	
TURVO	Salto	0,0229	0,0688	0,0642	0,1422	0,3899	0,1009	0,0596	0,0963	0,0276	0,0276	218	0,1560	0,7920	***
	Porto	0,0513	0,0769	0,0256	0,1538	0,3718	0,1283	0,0513	0,1154	0,0256	-	78	0,1538	0,7248	***
ZOOLÓGICO	77 [§]	0,0100	0,0890	0,1330	0,1830	0,2090	0,1430	0,0870	0,0750	0,0500	0,0210	518	0,3100 ^{§§}	0,8606	***
ZOOLÓGICO		0,0395	0,0921	0,2105	0,1447	0,3552	0,0395	0,0921	0,0132	0,0132	-	76	0,1842	0,7880	***
TAIM	Local 1	0,0417	0,1667	0,0833	0,1667	0,2708	0,1250	-	0,1041	-	0,0417	48	0,3333	0,8342	***
	Local 2	-	-	-	-	0,8000	0,2000	-	-	-	-	20	-	0,3200	'

§ - dados de NAPP & BRNCIC (1978).

§§ - este dado foi recalculado segundo os critérios do presente trabalho.

*** - significativa ao nível de 0,1%

' - não foi calculado n < 30.

TABELA 10. Comparação entre as frequências alélicas do loco de Esterase 2 (EST-2) em *Drosophila incompta* (Verão de 1981) - Teste de χ^2 .

Locais comparados	χ^2 calculado	Probabilidade	d
a) Salto x Porto	6,081	0,70 < P < 0,80	9
b) Salto x Taim Local 1	12,011	0,20 < P < 0,30	9
c) Porto x Taim Local 1	12,206	0,20 < P < 0,30	9
d) Zoológico x Taim Local 1	21,340	P < 0,02	9
e) Porto x Zoológico	22,522	P < 0,01	8
f) Salto x Zoológico	24,142	P < 0,01	9

TABELA 11. Frequências alélicas do loco Esterase 2 (EST-2) em *Drosophila incompta* (Inverno de 1981).

Local	Sublocal	Alelos										Genes amostrados	Heterozigosidade		d
		0,84	0,89	0,94	0,96	1,00	1,04	1,07	1,09	1,13	1,16		Obtida	Esperada	
TURVO	Salto	0,0461	0,0626	0,1020	0,0954	0,3618	0,1414	0,0724	0,0526	0,0493	0,0164	304	0,2105	0,8128	***
	Porto	0,0407	0,0930	0,1570	0,1512	0,3605	0,1453	-	0,0232	0,0291	-	172	0,2442	0,7898	***
ZOOLÓGICO	-	0,0440	0,1400	0,2000	0,0720	0,3360	0,0680	0,0280	0,0840	0,0280	-	250	0,1680	0,8071	***
TAIM	Local 1	0,0073	0,0474	0,0876	0,0949	0,2956	0,1423	0,1168	0,0876	0,0986	0,0219	274	0,1825	0,8419	***
	Local 2	-	0,0833	0,1250	0,0729	0,2500	0,1250	0,0833	0,1458	0,0209	0,0938	96	0,1875	0,8566	***

*** - significativo ao nível de 0,1%.

TABELA 12. Comparação entre as frequências alélicas do loco da Esterase 2 (EST-2) em *Drosophila incompta* (Inverno de 1981) - Teste do χ^2 .

Locais comparados	χ^2 calculado	Probabilidade	GL
a) Salto x Taim Local 1	21,369	P < 0,02	9
b) Taim Local 1 x Taim Local 2	22,012	P < 0,01	9
c) Salto x Porto	25,766	P < 0,01	9
d) Porto x Zoológico	26,513	P < 0,001	8
e) Salto x Taim Local 2	30,947	P < 0,001	9
f) Salto x Zoológico	38,327	P < 0,001	9
g) Zoológico x Taim Local 2	43,622	P < 0,001	9
h) Porto x Taim Local 2	54,471	P < 0,001	9
i) Porto x Taim Local 1	55,856	P < 0,001	9
j) Zoológico x Taim Local 1	68,636	P < 0,001	9

ção da amostra do Zoológico que apresentou o alelo Est-2^{0,94} como o segundo mais comum.

Quando as 4 amostras foram testadas através de χ^2 , duas a duas, foram obtidos os resultados mostrados na Tabela 10.

3.3.2. Amostras de Inverno de 1981

O alelo Est-2^{1,00} permaneceu o mais freqüente oscilando entre 0,2500 (Taim - Local 2) e 0,3618 (Salto) (Tabela 11).

Os demais alelos apresentaram uma distribuição bastante heterogênea entre as amostras.

O alelo Est-2^{1,16} tornou a não aparecer nas amostras do Zoológico e Porto, enquanto o alelo Est-2^{1,07} foi ausente também no Porto e o alelo Est-2^{0,84} na amostra do Taim - Local 2.

Os χ^2 calculados entre as amostras nesta época foram todos altamente significantes como apresenta a Tabela 12.

3.3.3. Comparação dos locais em diferentes épocas

Comparando cada um dos locais em diferentes épocas, obteve-se os seguintes valores de χ^2 .

a) Salto (inverno) x Salto (verão) - $\chi^2 = 14,372$;
 $0,10 < P < 0,20$; gl = 9

b) Zoológico (inverno) x Zoológico (verão) - $\chi^2 = 15,900$;
 $P < 0,05$; gl = 8

c) Porto (inverno) x Porto (verão) - $\chi^2 = 26,011$
 $P < 0,01$; gl = 8

d) Taim Local 1 (inverno) x Taim Local 1(verão) - $\chi^2 = 26,063$;
 $P < 0,01$; gl = 9

e) Zoológico (verão) x Zoológico (77) - $\chi^2 = 26,889$;

$P < 0,01$; $gl = 9$

f) Zoológico (inverno) x Zoológico (77) - $\chi^2 = 67,793$;

$P < 0,001$; $gl = 9$

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Um dos modelos propostos pelos selecionistas para explicar a manutenção da variação genética nas populações naturais foi baseado na hipótese de variação de nicho de VAN VALEN (1965), a qual sugere que organismos que exploram uma variedade de nichos devem ser geneticamente mais variáveis do que organismos ecologicamente mais restritos.

Com base neste pressuposto, vários autores têm relacionado o baixo nível de polimorfismo alozímico encontrado em algumas espécies de *Drosophila* com o estreito nicho nutricional e de cruzamento apresentado pelas mesmas (PRAKASH, 1973; ZOUROS, 1973; BARKER e MULLEY, 1976).

Desta forma, espécies de ecologia restrita têm se constituído num excelente objeto de estudo porque, devido a sua especificidade a nichos de oviposição, desenvolvimento larval e/ou recurso trófico para o adulto, reduz o número de variáveis que possam estar atuando nas alterações das frequências gênicas das populações.

O amplo conhecimento já existente acerca da ecologia, sítio de cruzamento e requerimentos nutricionais das espécies do grupo *flavopilosa* de *Drosophila* (BRNCIC, 1966 e 1970) permite uma melhor avaliação da importância relativa de diferentes fatores que estejam atuando na manutenção da variabilidade genética

em populações de *D. incompta*, pertencente a este mesmo grupo. Como já foi dito anteriormente, as larvas de *D. incompta* desenvolvem-se em ambientes aparentemente uniformes - flores do gênero *Cestrum*. Ao contrário do observado por BRNCIC (1966) no Chile, este gênero no Rio Grande do Sul floresce em períodos mais ou menos regulares ao longo do ano, independente das variações climáticas - a menos que estas sejam muito rigorosas. Assim, em nosso estado, populações de espécies do grupo *flavopilosa* podem ser encontradas durante todo o ano, associadas com o florescimento da planta. Por outro lado, foram confirmadas as observações da aquele autor, no que se refere aos possíveis fatores limitantes do tamanho populacional: clima e outros animais (competidores, parasitas e predadores). BRNCIC observou que a mortalidade em estágios pré-adultos era maior nos meses de verão, sendo possível que este dado explique o tamanho mais reduzido de nossas amostras nesta estação.

Quando flores individuais foram analisadas para se ter idéia do quanto do nicho disponível é utilizado, foi possível constatar que:

- em muitas flores (cerca de 70%) não foi registrado nenhum indivíduo, seja em que estágio for;
- na grande maioria das flores ocupadas, apenas um indivíduo foi encontrado;
- raramente, dois indivíduos foram encontrados ocupando a mesma flor, sendo, neste caso, ambos da mesma espécie.

Estes dados concordam com os de BRNCIC (1966) para populações chilenas de *D. flavopilosa*, indicando que alimento e espaço para viver não são fatores limitantes para o aumento populacional durante os períodos de florescimento do gênero *Cestrum*.

Em *D. íncompta* o loco de Lap apresenta cinco alelos, o da Est-1 apresenta seis alelos e o da Est-2, dez alelos. Estes resultados são muito semelhantes aos obtidos por NAPP e BRNCIC (1978) nesta mesma espécie e em *D. cestrí* (com exceção do loco Est-2 que não mostra atividade nesta espécie) e por BRNCIC e NAPP (1980) para populações chilenas de *D. flavopilosa*.

A proporção de locos polimórficos e heterozigosidade média por indivíduo ou de cada loco separadamente, são duas medidas comumente adotadas para avaliar a variação genética das populações. No entanto, a heterozigosidade tem sido geralmente preferida pela maioria dos autores, porque reflete mais fielmente o nível de variabilidade das populações estudadas, enquanto o grau de polimorfismo não é uma medida muito boa porque depende de quantos indivíduos são analisados e também porque locos com 2 alelos, são considerados igualmente polimórficos a locos com cinco, dez ou mais alelos (AYALA e VALENTINE, 1979).

Os níveis de heterozigosidade encontrados no presente trabalho oscilaram, para cada loco, entre os seguintes valores:

Leucina Aminopeptidase: 0,1923 (Porto, inverno de 1981) a 0,2754 (Zoológico, verão de 1981).

Esterase 1: 0,3000 (Zoológico, verão de 1981) a 0,5506 (Porto, inverno de 1981).

Esterase 2: 0,1538 (Porto, verão de 1981) a 0,3333 (Taim Local 1, verão de 1981).

Não foi calculada a heterozigosidade média devido ao pequeno número de locos analisados; além disto, trata-se de uma amostra viciada, pois estes locos foram escolhidos justamente pelo fato de serem polimórficos. No entanto, nossos dados reforçam os obtidos por NAPP e BRNCIC (1978) quando analisaram o grau

de variabilidade existente em *D. incompta* e *D. cestri* baseados na proporção de locos polimórficos. Estes autores analisaram 19 locos gênicos e obtiveram níveis de variabilidade muito elevados, tendo *D. incompta* apresentado maior nível de variabilidade ainda do que *D. cestri*, coletada na mesma época e nos mesmos arbustos. Assim, tanto nossos resultados como os de NAPP e BRNCIC (1978) diferem dos encontrados para outras espécies restritas como *D. busckii* (PRAKASH, 1973), *D. mojavensis* (ZOUROS, 1973) e *D. buzzatti* (BARKER e MULLEY, 1976), assemelhando-se mais aos valores encontrados para espécies versáteis como por exemplo as do grupo *willistoni* de *Drosophila* (AYALA e POWELL, 1972; RICHMOND, 1972).

SOULÉ (1976) propõe um modelo segundo o qual três condições devem ser satisfeitas para que uma população possa atingir altos níveis de heterozigosidade: deve ter um tamanho efetivo grande, deve ser antiga, e, por fim, deve evoluir a taxas lentas porque a seleção direcional provavelmente causa uma diminuição na heterozigosidade. A não satisfação de alguma destas condições levaria a uma diminuição da heterozigosidade e consequente diminuição do polimorfismo.

Assim quando a população é pequena, fenômenos como deriva genética podem alterar as frequências gênicas no tempo e até mesmo eliminar parte do polimorfismo genético, levando a uma homogeneidade da população estudada como foi sugerido por VARVIO-AHO (1981) em *Gerris lacustris*.

Tanto no presente trabalho, como nos de NAPP e BRNCIC (1978) e BRNCIC e NAPP (1980) em espécies do grupo *flavopilosa*, as heterozigosidades, em geral, apresentaram-se abaixo das esperadas, evidenciando uma frequência de homozigotos na natureza maior

do que aquela que se esperaria encontrar se a população estivesse em equilíbrio.

Excesso de homozigotos na natureza tem sido observado por diversos autores e tentativas de explicar este fenômeno têm sido feitas em inúmeros trabalhos. NARANG e KITZMILLER (1971) sugerem que o excesso de homozigotos encontrados em populações naturais do mosquito *Anopheles punctipennis* se deva a um possível fator etológico ou ecológico desconhecido. GUEDES (1975) discute este mesmo fenômeno em espécies do grupo *guaraní* de *Drosophila*, sugerindo algumas hipóteses como a alta frequência de alelos nulos, maior taxa de mutação para este tipo de alelo do que para alelos detectáveis eletroforéticamente, ou ainda pelo princípio de Wahlund, explicação esta também sugerida por NAPP e CORDEIRO (1978) para 4 espécies do grupo *cardini* de *Drosophila*. Estes últimos autores sugerem, também, que uma possível vantagem de heterozigotos no estágio larval e um posterior melhor ajuste dos homozigotos adultos para diferentes nichos especializados devido a seleção diversificadora explicaria este fenômeno.

As condições dos ambientes estudados neste trabalho poderiam levar à suposição de que as populações dos dois locais do Taim, teriam um aumento de homozigotos, possivelmente, devido a dois fatores: uma grande extensão de banhados entre eles funcionaria como barreira geográfica, reduzindo o fluxo gênico entre as duas populações; além disto, o pequeno número de arbustos em cada local (4 no Local 1 e apenas 1 no Local 2) poderia restringir o tamanho das populações levando-as a um aumento de endocruzamento. Esta explicação, porém, nos parece plausível para as demais populações.

No Turvo, os dois sub-locais são ligados por mata densa, portanto, teoricamente as condições para um fluxo gênico entre elas estariam asseguradas. Neste caso, uma possível explicação para o excesso de homozigotos poderia ser a ocorrência do endocruzamento por qualquer causa etológica ou ecológica. Na população do Zoológico, a distribuição contínua de um grande número de arbustos, também nos leva a pensar que não deva haver problemas de fluxo gênico, sugerindo-se então a mesma hipótese referida para o Turvo.

No presente trabalho, quando foram realizadas comparações entre locais e sub-locais para cada loco estudado, algumas vezes foram obtidas diferenças significativas entre sub-locais de um mesmo local enquanto estas não ocorriam entre locais diferentes.

Importante observar que das três comparações que foram significativas com relação ao loco da Lap (verão e inverno juntos), duas delas foram microgeográficas, uma vez que ocorreram entre dois sub-locais de um mesmo local (Porto x Salto; Taim Local 1 x Taim Local 2). Já no loco da Est-1, nas amostras de inverno, Taim Local 2 não apresentou diferenças em relação aos dois sub-locais do Turvo (Salto e Porto), no entanto, em relação ao Local 1 as diferenças foram acentuadas, o mesmo ocorrendo entre o Salto e o Porto. Para Est-2, Salto e Porto não apresentaram diferenças estatísticas entre si e em relação ao Local 1, que por sua vez foi diferente do Local 2.

Os dois sub-locais do Turvo apresentam diferenças ecológicas bastante visíveis. A estrada do Porto se caracteriza por ser sombria e úmida ao contrário do que ocorre com a do Salto, ensolarada e mais seca. A intensidade de calor ao longo

de ambas também é diferente, se fazendo sentir muito mais na estrada do Porto do que na do Salto devido a maior umidade da primeira. Ainda é importante salientar que o inverno no Turvo se apresenta quente e úmido, ao contrário do que ocorre nos outros dois locais.

Enquanto isto, Taim-Local 1 e Local 2 (sub-locais do Taim), apesar de apresentarem características ecológicas semelhantes, ou seja, região de banhados, altamente expostas a ventos (principalmente no inverno), igualmente iluminadas, sugerem apresentar, como já foi referido anteriormente, populações bastante isoladas. Mesmo que não se conheça a capacidade de dispersão desta espécie, o fato de os dois locais distarem cerca de 25 km quase que totalmente separados por banhados, leva-nos a acreditar que dificilmente o fluxo gênico entre os dois locais possa ocorrer.

Já o Zoológico apresenta um ambiente mais doméstico, com luminosidade média, mais seco do que os demais 4 sub-locais.

Desta forma, não é de se estranhar que, em alguns casos, diferenças entre os sub-locais (do Turvo e Taim) sejam maiores do que as encontradas algumas vezes entre os diferentes locais, bem mais distantes.

Tentativas de demonstrar a vantagem seletiva do polimorfismo enzimático têm sido feitas por inúmeros autores, os quais têm investigado os padrões de variação alozímica, associando as diferenças encontradas com variáveis geográficas e/ou ambientais, tanto em espécies ecologicamente restritas (ROCKWOOD - SLUSS e col, 1973) como em espécies com maior versatilidade ecológica (Koehn, 1969 e 1978; JOHNSON e col, 1969; KOJIMA e col, 1972; JOHNSON e SCHAFFER, 1973; VIGUE e JOHNSON,

1973; PIPKIN e col, 1973; TOMASZEWSKI e col, 1973; SCHAFFER e JOHNSON, 1974).

Alguns autores têm sugerido que a seleção de habitat (RICHMOND, 1978) pode levar a uma variação microgeográfica conduzindo a diferenças nas frequências gênicas, mesmo quando são comparadas populações muito próximas geograficamente. TAYLOR e POWELL (1977) referem que populações de *D. persimilis* separadas por apenas algumas centenas de metros exibem diferenças significantes nas frequências alélicas; RICHMOND (1978) mostrou que coletas em uma pequena área (40 x 75 m) podem mostrar diferenças nas frequências gênicas em populações de *D. affinis*; ALBUQUERQUE e NAPP (1981), estudando a variação alozímica do loco da Est-6 em populações naturais de *D. simulans*, cujas amostras foram coletadas em diferentes recursos tróficos, sugeriram que a escolha do habitat juntamente com outros fatores ambientais, seriam responsáveis pelas diferenças encontradas.

Voltando aos nossos dados, parece importante registrar também que o loco da Lap mostrou-se mais homogêneo do que o das Esterases 1 e 2, quando comparações entre locais foram realizadas.

Com exceção do loco Est-1, que nas amostras do Zoológico apresentou o alelo Est-1^{1,00} como o mais frequente, em todos os outros locais sempre os alelos mais frequentes foram os mesmos para cada loco. O ambiente do Zoológico destaca-se dos demais por ser o que sofre maior interferência do homem, e pode-se supor que as diferenças para este loco estejam, pelo menos em parte, relacionadas com este fato.

Com relação aos outros alelos menos frequentes, o comportamento foi muito irregular para os três locos, nos diferen-

tes locais.

Isto tudo leva a supor que, se algum fator ambiental está atuando seletivamente sobre estes três locos, a forma de pressão é diferente em cada um deles.

Em geral, quando vários locos são analisados, o tipo de resposta encontrada varia de loco para loco. Por exemplo, PINSKER e SPERLICH (1979), SPERLICH e col (1980), analisando 17 locos enzimáticos em *D. subobscura* observaram que, dos 13 locos que eram polimórficos, 4 não mostraram diferenças entre as populações analisadas, 6 apresentaram diferenças nas frequências gênicas sem mostrar nenhuma associação clara com variáveis geográficas e/ou ambientais e os 3 restantes (dentre eles o da Lap⁴) exibiram um padrão clinal de variação no sentido Norte-Sul.

Não existe uma forma de determinar se as diferenças encontradas em *D. incompta* são devidas aos locos em estudo ou se os mesmos estão ligados a outros locos sobre os quais estejam atuando forças seletivas. No entanto, como salientou MULLEY e col (1978) diversos trabalhos têm evidenciado associações genótipo-ambientais significantes envolvendo vários sistemas enzimáticos, especialmente o de esterases (KOJIMA e col, 1972, em *D. pavani*; ROCKWOOD-SLUSS e col, 1973, em *D. pachea*; SCHAFFER e JOHNSON, 1974, em *D. melanogaster*; ALBUQUERQUE e NAPP, 1981, em *D. simulans*). Estes resultados tornam pouco provável que estas associações sejam casuais.

Enquanto inúmeros trabalhos têm concentrado seus enfoques na contribuição de diferenças ambientais e/ou geográficas sobre as variações genéticas, como foi possível evidenciar até o momento, relativamente poucos estudos têm sido feitos sobre o

comportamento dos sistemas alozímicos ao longo do tempo (STEINER, 1979). Segundo este autor, estudos sobre as mudanças genéticas dependentes de sazonalidades dentro de uma população podem oferecer vantagens uma vez que os efeitos da migração podem ser minimizados e parâmetros ambientais e ecológicos específicos, que potencialmente podem dirigir mudanças genéticas de uma forma cíclica, permitem boas observações. STEINER ainda caracteriza que estes tipos de estudos podem proporcionar evidências da natureza da microevolução dentro das populações.

Os locos analisados neste trabalho, quando observados nas diferentes estações, mostraram diferentes comportamentos.

No caso dos dois locos de Esterases, os alelos mais comuns tiveram maior frequência no verão do que no inverno, com exceção do loco Est-2 na amostra do Taim, Local 1. Já para Leucina Aminopeptidase, ocorreu exatamente o contrário, o alelo mais comum apresentou maior frequência nas amostras de inverno.

De um modo geral, as populações mostraram diferenças significativas para os três locos quando analisados em diferentes épocas. Não foi possível, no entanto, estabelecer qualquer tipo de flutuação cíclica nas frequências alélicas, porque apenas duas estações de um mesmo ano foram observadas. Mesmo assim, para o Zoológico, três diferentes momentos de coletas ocorreram, verão e inverno de 1981 (no presente trabalho) e primavera de 1977 (NAPP e BRNCIC, 1978). De qualquer forma, foi possível constatar que as diferenças entre as populações da primavera de 1977 e verão de 1981, foram sempre menores do que aquelas entre a primavera de 1977 e inverno de 1981. Uma possível explicação para este fato pode ser encontrada quando se constata que o inverno de 1981, nesta região, foi muito frio e os 2

meses que antecederam as coletas, bem como o próprio mês da coleta tiveram muito menor precipitação do que os meses que antecederam as coletas das outras épocas. Apesar de a primavera de 1977 ter apresentado valores intermediários no que se refere a temperaturas médias e índices pluviométricos, quando comparada com as outras duas amostras, nos parece que temperaturas mais baixas aliadas a períodos mais prolongados de seca que excepcionalmente caracterizaram o inverno de 1981 foram fatores determinantes nas diferenças observadas entre esta amostra e as demais (dados climatológicos obtidos no 8º Distrito de Meteorologia de Porto Alegre).

De todos os locais analisados, o Porto foi o que mostrou maior homogeneidade quando comparações temporais foram realizadas. As diferenças entre as amostras deste local não foram significativas para dois dos 3 locos estudados. Enquanto isto, comparações temporais do Salto, Taim Local 1 e Zoológico (verão de 1981 x inverno de 1977) não deram significância estatística para apenas um dos 3 locos analisados.

Uma possível explicação para estes resultados pode ser encontrada se levarmos em consideração que o Porto parece sofrer pouca variação climática ao longo do ano uma vez que, apesar da temperatura ser bastante alta no verão, o inverno no Turvo (Porto e Salto) é, também, quente e úmido.

Maiores oscilações climáticas ocorrem nos outros locais (Taim e Zoológico), bem como no Salto (neste caso principalmente no que se refere a umidade) sendo, portanto, esperada a heterogeneidade temporal que foi constatada em relação às frequências alélicas dos três locos analisados.

DOBZHANSKY e AYALA (1973) observaram variação temporal

nas frequências de dois locos enzimáticos em *D. pseudoobscura* e *D. persimilis*, caracterizando, pelo menos para estes dois locos, uma forte evidência de que pressões seletivas levam a estas alterações, mesmo que não se possa precisar exatamente, qual ou quais fatores ambientais são responsáveis diretos por este tipo de variação. STEINER (1979) realizou trabalho semelhante em *D. mimica* observando diferenças significativas ao longo do tempo nas frequências alélicas para vários locos. Seus resultados levam a conclusões semelhantes às do trabalho anteriormente citado.

Em *D. subobscura*, LAKOVAARA e SAURA (1971), SAURA e col (1973) e PINSKER e col (1978) obtiveram diferenças significantes em sucessivos períodos de tempo para alguns dos locos analisados. Observações semelhantes foram feitas por CABRERA e col (1980), neste mesmo organismo, os quais discutem em seu trabalho que em um dos locais estudados, o inverno apresenta condições de tal forma adversas que não é possível a captura de indivíduos durante este período e, portanto, sugerem o efeito do fundador como explicação para o fato de alguns locos, que são moderadamente polimórficos em outros locais, apresentarem-se monomórficos neste local.

Apesar de o inverno no sul do Brasil ser bastante frio e úmido, especialmente nas regiões de Taim e Sapucaia do Sul (Zoológico) os resultados por nós obtidos não sugerem o mesmo que os de CABRERA e col (1980), uma vez que o alto polimorfismo foi constante nas duas estações do ano analisadas.

Nossos dados, portanto, reforçam a idéia de que variáveis geográficas e ambientais, assim como alterações temporais são fatores importantes na manutenção da variabilidade genética

existente nestes populações; além disto, a variação microespacial do ambiente, considerando fatores como seleção de habitat, é também capaz de afetar o grau de variabilidade genéticas destas populações.

RESUMO E CONCLUSÕES

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Drosophila incompta é uma espécie do grupo *flavopilosa* que, como as demais espécies deste grupo, explora flores do gênero *Cestrum* como único sítio de oviposição e desenvolvimento larval. Com o objetivo de avaliar a variabilidade existente em três locos enzimáticos (Leucina Aminopeptidase, Esterases 1 e 2) desta espécie e tentar verificar possíveis associações genético-ambientais, cinco populações - de três locais do estado do Rio Grande do Sul - foram analisadas em duas épocas distintas (verão e inverno de 1981), pela técnica de eletroforese horizontal em gel de acrilamida.

O loco da Leucina Aminopeptidase apresentou cinco alelos; o da Esterase - 1, seis alelos e o da Esterase - 2, dez alelos.

Apesar de ser uma espécie ecologicamente restrita, *D. incompta* apresentou, para os três locos analisados, altos níveis de heterozigosidade, embora, em todas as amostras com exceção de uma, estes níveis tenham sido abaixo dos esperados teoricamente.

Cálculos das frequências alélicas para estes três locos foram realizados e comparações entre as frequências foram feitas, levando em conta a heterogeneidade do ambiente no espaço e no tempo.

Nas diferentes amostras, não importando a época, os alelos mais freqüentes sempre foram os mesmos para cada local. Para os locos da Leucina Aminopeptidase e Esterase - 2 os alelos Lap^{0,95} e Est-2^{1,00} foram, respectivamente, os mais freqüentes em todas as amostras. Já para o loco Esterase - 1, o alelo Est-1^{0,97} foi o mais freqüente em todos os locais e épocas, com exceção das amostras do Zoológico onde o alelo Est-1^{1,00} foi o mais freqüente. Quanto aos outros alelos menos freqüentes, sua distribuição foi muito irregular para os três locos nos diferentes locais.

Os ambientes nos locais de coletas mostram diferenças climáticas e ecológicas bastante acentuadas. De todos os locais estudados, o Porto parece ser o mais homogêneo sendo, talvez, esta a razão pela qual as amostras analisadas neste local tenham se mostrado, também, mais homogêneas quanto a suas freqüências alélicas em diferentes épocas.

Por outro lado, as comparações entre as freqüências alélicas de amostras de diferentes locais e sub-locais num mesmo período, algumas vezes mostraram diferenças estatisticamente significantes para 2 sub-locais de um mesmo local, o mesmo não ocorrendo entre dois locais diferentes, sugerindo que, provavelmente, as diferenças microgeográficas atuam de forma bastante expressiva na diferenciação das freqüências gênicas.

Desta forma, acreditamos que nossos dados servem como reforço para a teoria selecionista, já que parece claro que variáveis geográficas e ambientais, bem como modificações temporais experimentadas pelas populações analisadas no presente estudo são, talvez, as maiores responsáveis pelas diferenças genéticas apresentadas.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Drosophila incompta, as the other species of the *flavo pilosa* group, explores *Cestrum* flowers as the only oviposition and larval development site.

Aiming to evaluate this species variability, regarding three enzymatic loci (Leucina Aminopeptidase, Esterase - 1 and 2), and to verify possible genetic-environmental associations, five populations, from three different localities of Rio Grande do Sul, were analyzed using horizontal electrophoresis in acrylamide gel.

Leucine Aminopeptidase locus presented five alleles, Esterase-1, six, and Esterase-2 had ten alleles.

Despite being an ecologically restricted species, *D. incompta* showed, at the three examined ~~and~~ loci, high heterozygosity levels, although in all samples except one these levels were far beyond those expected theoretically.

Allelic frequencies were calculated and compared at these three loci, considering the spatial and temporal environmental heterogeneity.

In different samples, the most frequent alleles were the same for each locality in the two periods. At the Leucina Aminopeptidase and Esterase-2 loci, Lap^{0.95} and Est-2^{1.00} alleles were, respectively, the most frequent in all samples.

At the Esterase-1 locus, Est^{0.97} was the most frequent allele in all localities and periods, except in Zoologico samples where Est-1^{1.00} was the most frequent one. Considering the other alleles, their distribution was very irregular at the three loci, in the different places.

The environments of the collection localities have marked climatic and ecological differences. Porto seems to be the most homogeneous site, perhaps being for this that these samples were also the most homogeneous, regarding allelic frequencies in different periods.

Comparing allelic frequencies of different localities and sub-localities, in the same period, some statistically significant differences were sometimes detected between two sub-localities of the same place, but not between two different localities. So, it is suggested that microgeographical differences actuate expressively in gene frequencies differentiation.

We believe that our data support the selectionist theory, since it seems clear that geographical and environmental variations and temporal modifications undergone by the analyzed populations are, perhaps, the main cause of the genetic differences observed.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- ALBUQUERQUE, C.M.R. & NAPP, M. 1981. Genetic variability at the Esterase-6 locus in natural populations of *Drosophila simulans* in relation to environmental heterogeneity. *Genetics*, 98: 399-407.
- AYALA, F.J.; MOURÃO, C.A.; PÉREZ-SALAS, S.; RICHMOND, R.; DOBZHANSKY, T. 1970. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. I. Genetic differentiation among sibling species. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 67(1): 225-232.
- AYALA, F.J. & POWELL, J.R. 1972. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. VI. Levels of polymorphism and the physiological function of enzymes. *Biochem. Genet.*, 7: 331-345.
- AYALA, F.J.; POWELL, J.R.; DOBZHANSKY, T. 1971. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. II. Polymorphism in continental and island populations of *Drosophila willistoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 68: 2480-2483.
- AYALA, F.J.; POWELL, J.R.; TRACEY, M.L.; MOURÃO, C.A.; PÉREZ-SALAS, S. 1972. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, 70: 113-139.
- AYALA, F.J.; TRACEY, M.L.; BARR, L.G.; McDONALD, J.F.; PÉREZ-SALAS, S. 1974. Genetic variation in natural populations of five *Drosophila* species and the hypothesis of the selective neutrality of Protein Polymorphisms. *Genetics*, 77: 343-384.
- AYALA, F.J. & VALENTINE, J.W. 1979. *Evolving - The theory and processes of organic evolution*. Ed. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- BAILEY, N.T.J. 1974. *Statistical methods in biology*. Unibooks, English Universities Press, Ltda. London.
- BARKER, J.S.F. & MULLEY, J.C. 1976. Isozyme variation in natural populations of *Drosophila buzzatti*. *Evolution*, 30: 213-233.

- BIRLEY, A.J. & MARSON, A. 1981. Genetical variation for enzyme activity in a population of *Drosophila melanogaster*. VII. Genotype-environment interaction for Alcohol Dehydrogenase (ADH) activity. *Heredity*, 46(3): 427-441.
- BORBA, C.M.B. & NAPP, M. 1981. Variabilidade enzimática na *Drosophila willistoni* sturtevant: Correlações Genético-Ecológicas. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales*, 14(1): 45.
- BRNCIC, D. 1966. Ecological and cytogenetic studies of *Drosophila flavopilosa*, a neotropical species living in *Cestrum* flowers. *Evolution*, 20:16-29.
- _____. 1968. The effects of temperature on chromosomal polymorphism of *Drosophila flavopilosa* larvae. *Genetics*, 59: 427-432.
- _____. 1970. Studies on evolutionary biology of chilean species of *Drosophila*. *Essays in Evolution and Genetics*: 401-433.
- _____. 1972. II. Seasonal fluctuation of the inversions polymorphism in *Drosophila flavopilosa* and the relationships with certain ecological factors. *Univ. Texas publ.*, 7213: 103-115.
- _____. 1976. Geographic variation of the chromosomal polymorphism in *Drosophila flavopilosa*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 18: 111-118.
- _____. 1978. A note on the *flavopilosa* group of species of *Drosophila* in Rio Grande do Sul, Brazil, with the description of two new species (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 38(3): 647-651.
- BRNCIC, D. & NAPP, M. 1980. Allozyme and inversion polymorphisms in chilean natural populations of *Drosophila flavopilosa*. *Rev. Brasil. Genet.*, III(1): 21-29.
- BRNCIC, D. & VALENTE, V.L.S. 1978. Dinâmica das comunidades de *Drosophila* que se estabelecem em frutos silvestres no Rio Grande do Sul. *Ciência e Cultura*, 30(9): 1104-1111.
- BUDNIK, M. & BRNCIC, D. 1972. The effects of intraspecific and interspecific larval competition on viability developmental rate and chromosomal polymorphism in *Drosophila pavani*. *Genetika*, 4(2): 281-295.
- CABRERA, V.M.; GONZÁLES, A.M.; GULLÓN, A. 1980. Enzymatic polymorphism in *Drosophila subobscura* populations from the Canary Islands. *Evolution*, 34(5): 875-887.
- CARSON, H.L. 1971. The Ecology of *Drosophila* breeding sites. *Univ. Hawaii, Harold L. Lyman Arboretum Lecture*, nº 2.

- CARSON, H.L. & JOHNSON, W.E. 1975. Genetic variation in Hawaiian *Drosophila*. I. Chromosome and allozyme polymorphism in *D. setosimentum* and *D. ochrobasis* from the island of Hawaii. *Evolution*, 29(1): 11-23.
- CHRISTIANSEN, F.B. & FRYDENBERG, O. 1974. Geographical patterns of four polymorphisms in *Zoarcetes viviparus* as evidence of selection. *Genetics*, 77: 765-770.
- COYNE, J.A. 1976. Lack of genic similarity between two sibling species of *Drosophila* as revealed by varied techniques. *Genetics*, 84: 593-607.
- DA CUNHA, A.B. 1951. Modification of the adaptive values of chromosomal types in *Drosophila pseudoobscura* by nutritional variables. *Evolution*, 5: 395-404.
- _____. 1957. Contribuição ao estudo da adaptação das populações de *Drosophila* (Diptera) a diferentes levedos. (Tese de Livre Docência). Fac. de Filosofia, Ciências e Letras da USP.
- DA CUNHA, A.B.; BRNCIC, D.; SALZANO, F.M. 1953. A comparative study of chromosomal polymorphisms in certain South American species of *Drosophila*. *Heredity*, 7: 193-202.
- DA CUNHA, A.B.; BURLA, H.; DOBZHANSKY, T. 1950. Adaptive chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. *Evolution*, 4: 212-235.
- DA CUNHA, A.B. & DOBZHANSKY, T. 1954. A further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. *Evolution*, 8: 119-134.
- DIKHUIZEN, D. & HARTL, D.L. 1980. Selective neutrality of G6PD allozymes in *E. coli* and the effects of genetic background. *Genetics*, 96: 801-817.
- DOBZHANSKY, T. 1977. Acaso e criatividade na Evolução. *Ciência e Cultura*, 29(11): 1203-1224.
- DOBZHANSKY, T. & AYALA, F.J. 1973. Temporal frequency changes of enzyme and chromosomal polymorphisms in natural populations of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 70(3): 680-683.
- DOBZHANSKY, T. & PAVAN, C. 1950. Local and seasonal variations in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. *The Journal of Animal Ecology*, 19(1): 1-14.
- GAINES, M.S.; McCLENAGHAN Jr., L.R.; ROSE, R.K. 1978. Temporal patterns of allozymic variation in fluctuating populations of *Microtus ochrogaster*. *Evolution*, 32(4): 723-729.

- GAINES, M.S. & WHITTAM, T.S. 1980. Genetic changes in fluctuating vole populations: Selective vs. nonselective forces. *Genetics*, 96: 767-778.
- GUEDES, M.A. 1975. Polimorfismos de isozimas esterásicas em populações naturais de espécies do grupo *guarani* de *Drosophila*. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- GYLLENSTEN, V.; REUTERWALL, C.; RYMAN, N.; STAHL, G. 1980. Geographical variation of transferrin allele frequencies in three deer species from Scandinavia. *Hereditas*, 92: 237-211.
- HAMRICK, J.L. & ALLARD, R.W. 1972. Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69(8): 2100-2104.
- HAMRICK, J.L. & HOLDEN, L.R. 1979. Influence of microhabitat heterogeneity on gene frequency distribution and gametic phase disequilibrium in *Avena barbata*. *Evolution*, 33(2): 521-533.
- HARRIS, H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.*, 164: 298-310.
- HUBBY, J.L. & LEWONTIN, R.C. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54: 577-594.
- HUBBY, J.L. & THROCKMORTON, L.H. 1968. Protein differences in *Drosophila*. IV. A study of sibling species. *Amer. Natur.*, 102(925): 193-205.
- JOHNSON, F.M. & POWELL, A. 1974. The Alcohol Dehydrogenases of *Drosophila melanogaster*: Frequency changes associated with heat and cold shock. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 71: 1783-1784.
- JOHNSON, F.M. & SCHAFFER, H.E. 1973. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. VII. Genotype-environment relationships in populations of *Drosophila melanogaster* from the eastern United States. *Biochem. Genet.*, 2: 149-163.
- JOHNSON, F.M.; SCHAFFER, H.E.; GILLASPY, J.E.; ROCKWOOD, E. S. 1969. Isozyme genotype-environment relationships in natural populations of the harvester ant, *Pogonomyrmex barbatus*, from Texas. *Biochem. Genet.*, 3: 429-450.
- JOHNSON, G.B. 1973. Relationship of enzyme polymorphism to species diversity. *Nature*, 242(16): 193-194.

- JOHNSON, W.E.; CARSON, H.L.; KANESHIRO, K.Y.; STEINER, W.W. M.; COOPER, M.M. 1975. Genetic variation in Hawaiian *Drosophila*. II. Allozymic differentiation in the *D. planitibia* subgroup. pp. 563-584. In: *Isozymes. IV. Genetics and Evolution*. Edited by C.L. Markert, Academic Press, New York.
- KIMURA, M. 1962. On the probability of fixation of mutant genes in a population. *Genetics*, 47: 713-719.
- _____. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217: 624-626.
- _____. 1969. The rate of molecular evolution considered from the standpoint of population genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 63: 1181-1188.
- KIMURA, M. & MARUYAMA, T. 1971. Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. *Genet. Res., Camb.*, 18(2): 125-131.
- KIMURA, M. & OHTA, T. 1971. Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. *Nature*, 229: 467-469.
- KING, J.L. & JUKES, T.H. 1969. Non-Darwinian Evolution. *Science*, 164: 788-798.
- KOEHN, R.K. 1969. Esterase heterogeneity: Dynamic of a polymorphism. *Science*, 163: 943-944.
- _____. 1978. Physiology and Biochemistry of enzyme variation: The Interface of Ecology and Populations Genetics. *Ecological Genetics: The Interface*. pp. 51-72. Spriger-Verlag: New York Inc. New York. USA.
- KOJIMA, K.; SMOUSE, P.; YANG, S.; NAIR, P.S.; BRNCIC, D. 1972. Isozyme frequency patterns in *Drosophila pavani* associated with geographical and seasonal variables. *Genetics*, 72: 721-731.
- KOJIMA, K. & TOBARI, Y. 1969. The pattern of viability changes associated with genotype frequency at the Alcohol Dehydrogenase locus in population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 61: 201-209.
- KOJIMA, K. & YARBROUGH, K.M. 1967. Frequency-dependent selection at the Esterase-6 locus in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 57: 645-649.
- LAKOVAARA, S. & SAURA, A. 1971. Genetic variation in natural populations of *Drosophila obscura*. *Genetics*, 69: 377-384.
- LANKINEM, P. & PINSKER, W. 1977. Allozyme constitution of two standard strains of *Drosophila subobscura*. *Experientia*, 33: 1301-1302.

- LEWONTIN, R.C. & HUBBY, J.L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54: 595-609.
- MARINKOVIC, D. & AYALA, F.J. 1975. Fitness of allozyme variants in *Drosophila pseudoobscura*. I. Selection at the PGM-1 and ME-2 loci. *Genetics*, 79: 85-95.
- MILKMAN, R.D. 1967. Heterosis as a major cause of heterozygosity in nature. *Genetics*, 55: 493-495.
- MÜLLER FILHO, J.L. 1970. Notas para o estudo da geomorfologia do Rio Grande do Sul, Brasil. Ministério de Educação e Cultura, Universidade Federal de Santa Maria. Departamento de Geociências. Publicação Especial nº 1.
- MULLEY, J.C. & BARKER, J.S.F. 1977. Occurrence and distribution of *Drosophila aldrichi* in Australia. *Drosophila Inform. Service*, 52: 151-152.
- MULLEY, J.C.; JAMES, J.W.; BARKER, J.S.F. 1979. Allozyme genotype - environment relationships in natural populations of *Drosophila buzzatti*. *Biochem. Genet.*, 17(1/2): 105-126.
- NAIR, P.S. & BRNCIC, D. 1971. Allelic variations within identical chromosomal inversions. *Amer. Natur.*, Letters to the Editor, 105(943): 291-294.
- NAPP, M. & BRNCIC, D. 1978. Electrophoretic variability in two closely related brazilian species of the *flavopilosa* species group of *Drosophila*. *Rev. Brasil Genet.*, 1(1):1-10.
- NAPP, M. & CORDEIRO, A.R. 1978. Genetic variability and disequilibrium in the major Esterase locus in four species of the *cardini* group of *Drosophila*. *Rev. Brasil. Genet.*, 1(3): 193-202.
- _____. 1981. Inter-specific relationships in the *cardini* group of *Drosophila* studied by electrophoresis. *Rev. Brasil. Genet.*, IV(4): 537-547.
- NARANG, S. & KITZMILLER, J.B. 1971. Esterase polymorphism in a natural population of *Anopheles punctipennis*. II. Analysis of the Est-C System. *Can. Jour. Genet. Cytol.*, 13: 771-776.
- OHTA, T. 1972. Fixation probability of a mutant influence by random fluctuation of selection intensity. *Genet. Res.*, Camb., 19(1): 33-38.
- PATTERSON, J.T. 1943. Studies in the genetics of *Drosophila*. III. The *Drosophilidae* of the Southwest. *Univ. of Texas publ.* 4313.

- PINSKER, W. 1981. MDH-polymorphism in *Drosophila subobscura*: I. Selection and hitch-hiking in laboratory populations. *Theor. Appl. Genet.*, 60: 107-112.
- PINSKER, W.; LANKINEN, P.; SPERLICH, D. 1978. Allozyme and inversion polymorphism in a central european population of *Drosophila subobscura*. *Genetica*, 48: 207-214.
- PINSKER, W. & SPERLICH, D. 1979. Allozyme variation in natural populations of *Drosophila subobscura* along a North-South gradient. *Genetica*, 50(3): 207-219.
- _____. 1981. Geographic pattern of allozyme and inversion polymorphism on chromosome O of *Drosophila subobscura* and its evolutionary origin. *Genetica*, in press.
- PIPKIN, S.B.; RHODES, C.; WILLIAMS, N. 1973. Influence of temperature on *Drosophila* alcohol dehydrogenase polymorphism. *The Journal of Heredity*, 64: 181-185.
- POULIK, M.D. 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, 180: 1477-1479.
- POWELL, J.R. 1971. Genetic polymorphisms in varied environments. *Science*, 174: 1035-1036.
- _____. 1973. Apparent selection of enzyme alleles in laboratory populations of *Drosophila*. *Genetics*, 75: 557-570.
- _____. 1975. Isozymes and Non-Darwinian evolution: a re-evaluation. pp. 9-26. In: *Isozymes. IV. Genetics and Evolution*. Edited by C.L. Markert, Academic Press, New York.
- POWELL, J.R. & WISTRAND, H. 1978. The effect of heterogeneous environments and a competitor on genetic variation in *Drosophila*. *Amer. Natur.*, 112: 935-947.
- PRAKASH, S. 1973. Low gene variation in *Drosophila busckii*. *Genetics*, 75: 571-576.
- _____. 1976. Gene differences between Third-chromosome inversions of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 84: 787-790.
- PRAKASH, S.; LEWONTIN, R.C.; HUBBY, J.L. 1969. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 61: 841-858.
- RICHARDSON, R.H.; SMOUSE, P.E.; RICHARDSON, M.E. 1977. Patterns of molecular variation. II. Associations of electrophoretic mobility and larval substrate within species of the *Drosophila mullery* complex. *Genetics*, 85: 141-154.

- RICHMOND, R. 1972. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. III. Amounts of variability in the superspecies *D. paulistorum*. *Genetics*, 70: 87-112.
- RICHMOND, R.C. 1978. Microspatial genetic differentiation in natural population of *Drosophila*. *Ecological Genetics: The Interface*. pp. 127-142. Spriger-Verlag: New York Inc. New York. USA.
- RIOS, R.I. & CORDEIRO, A.R. 1980. Variação da frequência gênica com o ambiente em *Drosophila willistoni*. *Ciência e Cultura*, 32(7-Supl.): 740.
- ROCKWOOD-SLUSS, E.S.; JOHNSTON, J.S.; HEED, W.B. 1973. Allozyme genotype - environment relationships. I. Variation in natural populations of *Drosophila pachea*. *Genetics*, 73: 135-146.
- RYMAN, N.; REUTERWALL, C.; NYGRÉN, K.; NYGRÉN, T. 1980. Genetic variation and differentiation in Scandinavian moose (*Alces alces*): Are large Mammals Monomorphic? *Evolution*, 34(6): 1037-1049.
- SALZANO, F.M. 1955. Chromosomal polymorphism in two species of the guaraní group of *Drosophila*. *Chromosoma*, 7: 39-50.
- SAUL, S.H.; SINSKO, M.J.; GRIMSTAD, P.R.; CRAIG Jr, G.B. 1978. Populations genetics of the mosquito *Aedes triseriatus*. Genetic-ecological correlation at an Esterase locus. *Amer. Natur.*, 112: 333-339.
- SAURA, A.; LAKOVAARA, S.; LOKKI, J.; LANKINEN, P. 1973. Genic variation in central and marginal populations of *Drosophila subobscura*. *Hereditas*, 75: 33-46.
- SCHAFFER, H.E. & JOHNSON, F.M. 1974. Isozyme allelic frequencies related to selection and the gene flow hypothesis. *Genetics*, 77: 163-168.
- SELANDER, R.K.; YANG, S.Y.; LEWONTIN, R.C.; JOHNSON, W.E. 1970. Genetic variation in the horseshoe crab (*Limulus polyphemus*), a phylogenetic "relic". *Evolution*, 24: 402-414.
- SELL, D.K.; ARMBRUST, E.J.; WHITT, G.S. 1978. Genetic differences between eastern and western populations of the alfafa weevil. *The Journal of Heredity*, 69: 37-50.
- SEMEONOFF, R. & ROBERTSON, F.W. 1968. A biochemical and ecological study of plasma esterase polymorphism in natural populations of the field vole, *Microtus agrestis* L., *Biochem. Genet.*, 1: 205-227.
- SENE, F.M. & CARSON, H.L. 1977. Genetic variation in Hawaiian *Drosophila*. IV. Allozymic similarity between *D. silvestris* and *D. heteroneura* from the island of Hawaii. *Genetics*, 86: 187-198.

- SHAW, C.R. 1965. Electrophoretic variation in enzymes. *Science*, 149: 936-943.
- SOULÉ, M. 1973. The epistasis cicle: A theory of marginal populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 4: 165-187.
- _____. 1976. Allozyme variation: Its determinants in space and time. *Molecular Evolution*, Ed. F.J. Ayala. pp. 60-77.
- SPERLICH, D.; PINSKER, W.; MITROFANOV, V.G, 1981. Genetic characterization of a natural population of *Drosophila subobscura* from de Northern Caucasus (USSR) in comparison with other population samples. *Genetica*, 54: 329-334.
- SPERLICH, D.; PINSKER, W.; PFRIEM, P. 1980. Inversion, Allozyme and lethal frequencies in natural populations of *Drosophila subobscura*. *Genetika*, 12(1): 91-101.
- STALKER, H.D. 1980. Chromosome studies in wild populations of *Drosophila melanogaster*. II. Relationship of inversion frequencies to latitude, Season, Wing-Loading and Flight Activity. *Genetics*, 95: 211-223.
- STEINER, W.W.M. 1979. Genetic variation in Hawaiian *Drosophila*. VI. Seasonally-dependent gene changes in *D. mimica*. *Evolution*, 33(2): 543-562.
- SVED, J.A.; REED, T.E.; BODMER, W.F. 1967. The number of balanced polymorphisms that can be maintained in a natural population. *Genetics*, 55: 469-481.
- TAYLOR, C. & POWELL, J.R. 1977. Microgeographic differentiation of chromosomal and enzyme polymorphisms in *Drosophila persimilis*. *Genetics*, 85: 681-695.
- TOMASZEWSKI, E.K.; SCHAFFER, H.E.; JOHNSON, F.M. 1973. Isozyme genotype - environment associations in natural populations of the harvester ant, *Pogonomyrmex badius*. *Genetics*, 75: 405-421.
- TSUNO, K. 1975. Esterase gene frequency differences and linkage equilibrium in *Drosophila virilis* populations from different ecological habitats. *Genetics*, 80: 585-594.
- TURNER, B.J. 1974. Genetic divergence of Death Valley pupfish species: Biochemical versus morphological evidence. *Evolution*, 28: 281-294.
- VAN DELDEN, W.; BOEREMA, A.C.; KAMPING, A. 1978. The Alcohol Dehydrogenase polymorphisms in populations of *Drosophila melanogaster*. I. Selection in different environments. *Genetics*, 90: 161-191.
- VAN VALEN, L. 1965. Morphological variation and width of ecological niche. *Amer. Natur.*, XCIX: 377-390.

- VALENTE, V.L.S. & ARAÚJO, A.M. 1981. Polimorfismo cromossômico e variabilidade ambiental em populações naturais de *Drosophila willistoni*. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales*, 14(1): 87.
- VARVIO-AHO, S. 1981. On the causes of seasonal genetic changes in *Gerris lacustris*. *Hereditas*, 94: 139-141.
- VIGUE, C.L. & JOHNSON, F.M. 1973. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. VI. Frequency-property-environment relationships of allelic alcohol-dehydrogenase in *D. melanogaster*. *Biochem. Genet.*, 9: 213-227.
- VOELKER, R.A.; COCKERHAM, C.C.; JOHNSON, F.M.; SCHAFFER, H. E.; MUKAI, T.; METTLER, L.E. 1978. Inversion fail to account for allozyme clines. *Genetics*, 88: 515-527.
- WATANABE, T.K. & WATANABE, T. 1975. Enzyme and chromosome polymorphisms in japanese natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 85: 319-329.
- WHEELER, M.R.; TAKADA, H.; BRNCIC, D. 1962. The *flavopilosa* species groups of *Drosophila*. *Studies in Genetics*. II. Univ. Texas pub., 6205: 395-413.
- WILLS, C.; PHILPS, J.; FERGUSON, R. 1975. Further evidence for selective differences between isoalleles in *Drosophila*. *Genetics*, 79: 127-141.
- WINGE, H. 1971. Níveis de divergência evolutiva no grupo crípico da *Drosophila willistoni*. Tese de Doutorado - Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- YAMAZAKI, T. & MARUYAMA, T. 1972. Evidence of neutral hypothesis of protein polymorphism. *Science*, 178: 56-58.
- _____. 1975. Isozyme polymorphism maintenance mechanisms viewed from the standpoint of population genetics. pp. 103-114. In: *Isozymes. IV. Genetics and Evolution*. Edited by C.L. Markert, Academic Press, New York.
- YARBROUGH, K. & KOJIMA, K. 1967. The mode of selection of the polymorphic Esterase-6 locus in cage populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 57: 677-686.
- ZOUROS, E. 1973. Genetic differentiation associated with the early stages of speciation in the *mulleri* subgroup of *Drosophila*. *Evolution*, 27: 601-621.