

Aluísio José Gallo

**Estudo da Carga Genética em Populações
Naturais de *Drosophila Melanogaster*, para
Genes do Cromossomo X**



1910000212



*

pyfallo

ESTUDO DA CARGA GENÉTICA EM POPULAÇÕES
NATURAIS DE Drosophila melanogaster,
PARA GENES DO CROMOSSOMO X.

ALUISIO JOSE GALLO

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de
São José do Rio Preto, para a
obtenção do grau de Doutor.



212/84

São José do Rio Preto
1970

Índice

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MATERIAL E MÉTODO	10
2.1. Linhagem de laboratório	10
2.2. Ancestras coletadas na natureza	12
2.3. Ocorrência de outras espécies de <i>Drosophila</i>	12
2.4. Manutenção dos animais	13
3 - RESULTADOS	43
3.1. Viabilidade dos experimentos	43
3.2. Viabilidade que afeta ambos os sexos	47
3.3. Viabilidade limitada ao sexo	50
3.4. Esterilidade masculina	54
3.5. Esterilidade feminina	60
4 - DISCUSSÃO	62
4.1. Genes de viabilidade que afetam ambos os sexos	62
4.2. Genes de viabilidade limitada ao sexo	63
4.3. Esterilidade	65
4.4. Valor adaptativo de $B \cdot H^1$	68
5 - SUMÁRIO E CONCLUSÕES	70
6 - AGRADECIMENTOS	72
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

Í N D I C E

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MATERIAL E MÉTODO	10
2.1. Linhagem de laboratório	10
2.2. Amostras coletadas na natureza	12
2.3. Ocorrência de outras espécies de <u>Dro-</u> <u>sophila</u>	13
2.4. Manutenção das linhagens em laboratório ..	15
2.5. Distinção entre fêmeas de <u>Drosophila</u> , <u>melanogaster</u> e <u>Drosophila simulans</u>	16
2.6. Esquema de cruzamentos	33
3 - RESULTADOS E ANÁLISE	35
3.1. Recombinantes de F_3 e F_4	37
3.2. Contrôlo dos experimentos	43
3.3. Genes de viabilidade que afetam ambos os sexos	47
3.4. Efeitos limitados ao sexo	50
3.5. Esterilidade masculina	54
3.6. Esterilidade feminina	60
4 - DISCUSSÃO	62
4.1. Genes de viabilidade que afetam ambos os sexos	62
4.2. Genes de viabilidade limitada ao sexo	63
4.3. Esterilidade	65
4.4. Valor adaptativo de <u>B w^a</u>	68
5 - SUMÁRIO E CONCLUSÕES	70
6 - AGRADECIMENTOS	72
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela.	1 - Frequência das espécies em 13 coletas realizadas ,.....	14
Tabela.	2 - Fêmeas de <u>D. melanogaster</u> e <u>D. simulans</u> classificadas pela facêta	20
Tabela.	3 - Medidas da largura da facêta de fêmeas de <u>D. melanogaster</u> e <u>D. simulans</u>	21
Tabela.	4 - Fêmeas de <u>D. melanogaster</u> e <u>D. simulans</u> classificadas pelo tergito	22
Tabela.	5 - Classificação de fêmeas de <u>D. melanogaster</u> e <u>D. simulans</u> pela largura da faceta e pigmentação do 6º tergito	24
Tabela.	5-A - Distribuição do maior diâmetro do olho em <u>D. simulans</u>	27
Tabela.	5-B - Distribuição do maior diâmetro do olho em <u>D. melanogaster</u>	28
Tabela.	6 - Valores estatísticos relativos ao maior diâmetro do olho em <u>D. simulans</u> e <u>D. melanogaster</u>	29
Tabela.	6-A - Distribuição da maior largura da facêta em <u>D. simulans</u>	30
Tabela.	6-B - Distribuição da maior largura da facêta em <u>D. melanogaster</u>	30
Tabela.	7 - Valores estatísticos relativos à maior largura da facêta em <u>D. simulans</u> e <u>D. melanogaster</u>	31
Tabela.	8 - Total de moscas obtidas em cada uma das 5 gerações	36
Tabela.	9 - Total de indivíduos recombinantes em F_3 e F_4	38
Tabela.	10 - Total de indivíduos recombinantes distribuídos de acordo com o sexo	38
Tabela.	11 - Número de moscas obtidas em F_4 , e frequências percentuais nas culturas que apresentaram apenas uma forma recombinante	39
Tabela.	12 - Número e tipos de recombinantes em F_4 ..	40

Tabela.	13 - Contrôles dos experimentos para 185.....	..
	cromossomos X de F_4	43
Tabela.	14 - Número total de machos e fêmeas em	
	F_1 e F_5 com as razões sexuais cor-	
	respondentes	47
Tabela.	15 - Totais e frequências das diferentes.....	
	classes obtidas em F_3	48
Tabela.	16 - Proporções entre as classes de F_3	48
Tabela.	17 - Letais no cromossomo X	49
Tabela.	18 - Viabilidade de machos XI da gera-	
	ção F_3	51
Tabela.	19 - Efeitos limitados ao sexo	53
Tabela.	20 - Esterilidade masculina de F_3	59
Tabela.	21 - Esterilidade feminina de F_4	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.	1 - Olho de <u>Drosophila melanogaster</u> (largura da facêta)	18
Figura.	2 - Olho de <u>Drosophila simulans</u> (largura da facêta)	18
Figura.	3 - Sexto tergito de <u>Drosophila melanogaster</u>	19
Figura.	4 - Sexto tergito de <u>Drosophila simulans</u> ...	19
Figura.	5 - Distribuição de frequências relacionadas à largura da facêta de <u>D. melanogaster</u> e <u>D. simulans</u>	23
Figura.	6 - Intervalos de variação com 99% de probabilidade para o maior diâmetro do olho e maior largura da facêta de <u>D. melanogaster</u> e <u>D. simulans</u>	26
Figura.	7 - Esquemas de cruzamento	34
Figura.	8 - Recombinantes de F_3 ; distribuição de frequências	41
Figura.	9 - Recombinantes de F_4 ; distribuição de frequências	42
Figura.	10 - Distribuição de frequências de F_5	45
Figura.	11 - Distribuição de frequências de F_1	46
Figura.	12 - Distribuição de frequências da viabilidade de machos XY de F_3	52
Figura.	13 - Distribuição de frequências das porções sexuais em F_4 - A.	55
Figura.	14 - Distribuição de frequências das porções sexuais em F_4 - B.	56
Figura.	15 - Distribuição de frequências das porções sexuais em F_4 - C.	57
Figura.	16 - Distribuição de frequências das porções sexuais em F_4 (A+B+C)	58

1. INTRODUÇÃO

Populações naturais que se reproduzem sexualmente e por fecundação cruzada são conhecidas como portadoras de uma variabilidade, oculta em heterozigose, de genes ou complexos gênicos recessivos que, quando em homozigose, podem causar a morte, diminuir a viabilidade, a fertilidade, ou revelar mal formações até então desconhecidas. O conjunto dessas variantes deletérias constitui o que denominamos carga genética, no sentido amplo do termo.

Conforme Dobzhansky (1939, 1951), Chetverikov, em 1926, foi o primeiro autor a chamar a atenção sobre o problema da variabilidade genética oculta em populações naturais de Drosophila e sobre a necessidade de utilização de métodos genéticos próprios para detectá-la. Segundo o mesmo autor, um estudo quantitativo desta variabilidade revelaria a estrutura da população, levando-se também em conta alguns fatores como a geografia, ecologia, sub-divisão das populações em agrupamentos semi-independentes, etc.

Ainda conforme Dobzhansky, acima citado, os primeiros trabalhos experimentais para a detecção da variabilidade genética oculta foram realizados por Cheteverikov em 1927-1928, analisando pelo método do "inbreeding", a descendência de 239 fêmeas selvagens de D. melanogaster, coletadas em Gelendzhik no Cáucaso, nas quais verificou a presença de 32 mutações visíveis.

A partir dessa época, os estudos sobre genética de populações se intensificaram, mais que em outros grupos de animais ou plantas, nas espécies do gênero Drosophila, com

o aprimoramento de métodos que permitiram a detecção de genes deletérios em homozigose. (Entretanto o número de espécies estudadas ainda é muito pequeno (Spassky e cols., 1960)).

Estudos quantitativos, iniciados por Muller em 1927, utilizando-se de um sistema de letal balanceado, o método ClB (Muller, 1928), possibilitaram a avaliação de genes letais recessivos, presentes no cromossomo X de D. melanogaster. A denominação do método é derivada das mutações que o cromossomo X contém: a inversão In (I) Cl, inseparável de um letal e um marcador, o dominante "Bar" (B). Os machos ClB morrem e as fêmeas heterozigotas possuem viabilidade e fertilidade excelentes. A permuta genética é reduzida a menos de 1,0% em todo o cromossomo (Bridgés e Breheme, 1944).

Outros métodos semelhantes foram desenvolvidos para detectar a carga genética nos autossomos de algumas espécies de Drosophila. O objetivo destes métodos é a obtenção de moscas que sejam homozigotas para um ou mais cromossomos, os quais manifestarão seus efeitos em homozigose. Seu princípio consiste em cruzar indivíduos com linhagens de laboratório, que transportam um ou mais cromossomos com genes mutantes conhecidos e que servem como marcadores. Inversões supressoras da permuta genética são também utilizadas para manter a integralidade do cromossomo a ser testado.

+ Dubinin e cols. em 1934 (em Dobzhansky, 1939), utilizaram-se de uma técnica em que fêmeas selvagens de D. melanogaster foram cruzadas com machos de constituição "Curly" e "Lobe" para o cromossomo II e "Dichaete" "Stubble" para o cromossomo III, ambos possuindo inversões supressoras da permuta genética.

Sturtevant (1937) estudou letais autossômi-



cos em populações selvagens de D. pseudoobscura, para o cromossomo II, utilizando-se de métodos semelhantes ao anterior, diferindo apenas em detalhes (Spencer, 1947). Machos selvagens, ou um único filho de cada fêmea selvagem, fertilizada na natureza, são cruzados individualmente com fêmeas levando o gene recessivo "glass" (estrutura do olho). Dêste cruzamento um único macho é cruzado com fêmeas que levam o dominante "Bare" (forma das cerdas) e o recessivo "glass". Os descendentes dêste cruzamento, que mostram o caráter "Bare" são cruzados entre si, originando homozigotos para o mesmo cromossomo selvagem.

1953) e de D. willistoni. Dobzhansky e Queal (1938) estudaram a carga genética no cromossomo III de D. pseudoobscura utilizando-se também de métodos semelhantes aos anteriores. Outras técnicas em iguais condições, foram desenvolvidas posteriormente, entre os quais, Cavalcanti (1950) para D. prosaltans, Pavan e cols. (1951) para D. willistoni e outros, mas todos baseados no mesmo princípio: comparar a viabilidade de indivíduos homozigotos, para um dado cromossomo selvagem com indivíduos heterozigotos, para o mesmo cromossomo. Segundo Spassky e cols. (1960) trata-se de métodos para detectar variantes genéticas recessivas.

Wallace (1956) estudou o cromossomo II de D. melanogaster, através de um novo método, fazendo com que, nas culturas-teste, houvesse uma classe de môscas que não levassem os cromossomos a serem testados. Esta classe serviria como um denominador comum e sua presença permitiria também a detecção de efeitos dominantes do cromossomo estudado. Este método foi utilizado por Spassky e cols. (1960) para o cromossomo II e III em D. pseudoobscura.

Segundo Dobzhansky (1957), nas espécies de Drosophila que habitam variados ambientes, virtualmente cada



indivíduo leva, no mínimo, um cromossomo que tem algum tipo de efeito deletério quando colocado em homozigose.

Os dados encontrados na literatura de Drosophila sobre frequência de cromossomos com efeitos deletérios, mostram valores consideráveis, principalmente aqueles que se referem à carga autossômica nas espécies: D. melanogaster (entre outros, Ives, 1945 e 1954; Greenberg e Crow, 1960; Dawood, 1961; Band e Ives, 1963 e Allen, 1964), D. pseudoobscura (entre outros, Dobzhansky e Spassky, 1953; Spassky e cols., 1960; Dobzhansky, Spassky e Tidwell, 1963 e Dobzhansky e Spassky, 1963) e em D. willistoni (entre outros, Pavan e cols., 1951; Cordeiro, 1952 (em Cordeiro, 1954); Toledo, 1963; Magalhães e cols., 1965 e Magalhães, Toledo e da Cunha, 1965).

Com referência a estes cromossomos que possuem algum efeito deletério, uma convenção usual foi adotada entre os pesquisadores: a de classificá-los em função da viabilidade dos indivíduos portadores destes cromossomos em homozigose, quando comparada com a média das viabilidades dos heterozigotos ao acaso, considerada normal por definição (Dobzhansky, Holz e Spassky, 1942).

De um modo geral, cinco categorias gênicas são distintas e classificadas arbitrariamente: genes letais, semi-letais, sub-vitais, normais e super-normais. Os genes letais são aqueles cuja viabilidade é de 0%, traduzida, na prática, pelo não aparecimento de indivíduos do tipo selvagem (Cavalcanti, 1950 e Band, 1964). Entretanto Pavan e cols. (1951), Hoenigsberg e cols. (1965), consideram como letais os genes que mostram de 0 a 5% da viabilidade normal. Os genes semi-letais seriam aqueles que, em relação ao padrão normal, mostram uma viabilidade superior a 0% e inferior a 50% (Dobzhansky,



Holz e Spassky, 1942). Conforme Pavan e cols. (1951) e Hoenigsberg e cols. (1965) estes genes apresentam uma viabilidade entre 5 e 50%. As três classes restantes são enquadradas entre os chamados quasenormais (Spassky e cols., 1960; Band, 1964). Para Cavalcanti (1950) os genes sub-vitais estão compreendidos entre aqueles que determinam valores da viabilidade entre 50 e 90% da viabilidade normal. Os genes normais condicionam a viabilidade oscilando entre 90 e 120% do padrão normal e por fim os super-normais conferindo uma viabilidade aos homozigotos superior a 120% do padrão normal.

Uma vez que estas classes nos seus limites não são distintas, por serem seus limites arbitrários, uma melhor delimitação pode ser obtida com a ajuda de técnicas mais precisas, tais como as utilizadas por Dobzhansky, Holz e Spassky (1942) em D. pseudoobscura, e aquela desenvolvida por Wallace e Madden (1953) em D. melanogaster, Dobzhansky e Spassky (1953) em D. pseudoobscura e D. persimilis e Dobzhansky e Spassky (1954) em D. prosaltans, com base em análise estatística.

Os resultados obtidos por Chetverikov em 1927 e 1928 (em Dobzhansky, 1939), da análise da descendência de 239 fêmeas selvagens de D. melanogaster coletadas em Gelendzhik, Caucaso, não fazem alusão a mutantes ligados ao sexo. Dubinin e cols. em 1936 (em Dobzhansky, 1939) estudaram populações naturais de D. melanogaster do Caucaso e Rússia Central para os cromossomos II, III e X. Com a finalidade de detectar mutantes ligados ao sexo, analisaram mais de 8000 cromossomos X, sendo que nenhum letal ligado ao sexo foi encontrado.

Estes resultados, bem como outros, levaram muitos autores a considerar o cromossomo X como se fôsse mais homogêneo do que os autossomos e que a frequência de letais li



gados ao sexo seria extremamente baixa em populações naturais (Spencer, 1947).

Não há dúvida de que a frequência de letais no cromossomo X de populações naturais de Drosophila seja menor que nos autossômicos, uma vez que os machos heterogaméticos transportam este cromossomo em 1/3 da população e os expõem a forte seleção natural, sob as mais variadas condições ambientais.

Os dados apresentados por Dubinin (1946), indicam que tanto em populações de D. melanogaster da Flórida como nas populações russas, as frequências de letais no cromossomo X são baixas. Em linhagens de laboratório derivadas de uma linhagem selvagem da Flórida, a frequência média de letais observada foi de 0,25%.

Demerec (1943) induziu mutações no cromossomo X de machos selvagens do estoque Oregon-R, de D. melanogaster, tratando-os com dibenzantraceno, por uma técnica de aerossol. Para um total de 134 machos não tratados (experimento controle), foram analisados 10006 cromossomos X, dos quais, 28 foram letais, com uma frequência observada de 0,28%.

Wallace (1951) trabalhando com populações irradiadas de D. melanogaster mantidas em caixas, estudou as mudanças ocorridas nestas populações para o cromossomo II e eventualmente o X, após o tratamento com o raio-X. Uma das populações tratadas (pop. 1) recebeu alta dose de radiação (machos = 7125 r e fêmeas = 1012,5 r) e a população 3 não tratada funcionou como controle. Dos 306 cromossomos testados da amostra 21 da população controle, 3 letais foram encontrados no cromossomo X com uma frequência de 0,98%. Hildreth (1955) estudou a



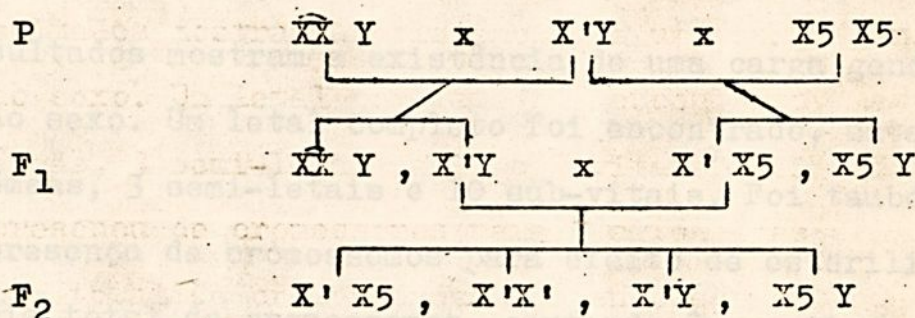
possibilidade de letais sintéticos no cromossomo X de D. melanogaster em 10 linhagens desta espécie. O número de letais encontrados foi de 1 em 994, o que corresponde a aproximadamente 0,10% entre os homozigotos e, 13 em 5186, aproximadamente 0,25% entre a classe heterozigota. Estes resultados, embora indiretos, relativos à análise da frequência de letais no cromossomo X de D. melanogaster, confirmam a existência de baixa taxa de mutação neste cromossomo, quando comparada com os autossomos.

Uma outra categoria de genes ocorre neste cromossomo: a dos que não sofrem efeitos da seleção natural quando presentes nos machos, podendo então se acumular na população conferindo-lhes uma grande variabilidade gênica. Estes são os limitados ao sexo feminino. Segundo Kerr (1951), White, em 1945, foi quem primeiro sugeriu a necessidade desta categoria de genes principalmente nos sistemas haplodiplóides e especialmente nos Hymenoptera.

Kerr (1951) compartilhando da mesma idéia lembra que, "as mutações cujos genes possuam efeito heterótico, limitados os seus efeitos de maior ou menor viabilidade somente ao sexo feminino, poderão ser importantíssimos para os himenópteros, pois capacita-os a ter uma plasticidade genética igual à das populações diplóides com fecundação livre,". Kerr (1951) e Kerr e Laidlaw (1956), Rothenbuler, Kulinčević e Kerr (1968), Kerr (1969a) e Kerr (1969b), citam alguns exemplos de genes limitados ao sexo feminino em populações de Hymenoptera, principalmente entre os Ápídeos. Da Cunha (1953) em D. willistoni e D. paulistorum e Da Cunha (1957) em D. willistoni mostraram a existência de inversões heteróticas nos cromossomos sexuais destas espécies cujos efeitos são limitados

ao sexo feminino.

Kerr e Kerr (1952) estudaram o efeito da carga genética limitada ao sexo feminino em populações naturais de D. melanogaster utilizando linhagens provindas das vizinhanças de Austin, Texas, e Wooster, Ohio, ambas nos EE.UU.. Estes autores utilizaram-se de machos selvagens ou filhos de fêmeas e 59 cromossomos X foram analisados para efeitos limitados ao sexo. Linhagens marcadas de laboratório foram utilizadas nestes cruzamentos: o estoque Base (Muller-5) e XX ligado. O seguinte esquema de cruzamentos foi usado pelos autores:



Conseguiram na geração F₂ fêmeas homozigotas para o cromossomo X original e machos hemizigóticos levando o mesmo cromossomo X. Os resultados mostraram a existência de uma carga genética limitada ao sexo, pois a viabilidade das fêmeas homozigotas mostrou-se inferior à viabilidade dos machos contendo o mesmo cromossomo e também inferior à viabilidade das fêmeas contendo diferentes X (contrôle).

Drescher (1964) confirmou os resultados de Kerr e Kerr (1952) utilizando-se de técnica semelhante, porém, com algumas modificações. Trabalhou também com machos selvagens de D. melanogaster coletados em Pearl River, a 30 milhas da cidade de Nova York, onde foram testados 234 cromossomos X.

Estes machos foram individualmente cruzados com fêmeas Base (Muller-5) e após o nascimento da geração F_1 , fêmeas virgens foram retrocruzadas com seus pais. O seguinte esquema foi utilizado por Drescher:

P X^1Y x X^5X^5

F_1 x X^1X^5

F_2 X^5Y , X^1Y , X^1X^1 , X^1X^5

Seus resultados mostram a existência de uma carga genética limitada ao sexo. Um letal completo foi encontrado, matando somente fêmeas, 3 semi-letais e 10 sub-vitais. Foi também constatada a presença de cromossomos para efeito de esterilidade. A frequência total de cromossomos, contendo êsses tipos de genes limitados ao sexo na população estudada, foi de 8,5%.

Tanto Kerr e Kerr como Drescher estudaram a frequência de genes com efeito limitado ao sexo feminino no cromossomo X de D. melanogaster, a partir de machos coletados na natureza. Sendo êsses machos hemizigóticos para o cromossomo X, não haveria a possibilidade de que a metodologia usada indicasse uma carga genética inferior à real?

O presente trabalho apresenta dados relativos à carga genética do cromossomo X de D. melanogaster, obtidos através de um esquema mais completo que o utilizado pelos autores acima citados, visando contornar êsse problema. Desta maneira, objetivamos contribuir para um melhor entendimento da carga genética em populações naturais de Drosophila.

2. MATERIAL E MÉTODO.

Drosophila melanogaster Meigen, 1830 é uma espécie cosmopolita, de hábito doméstico, encontrada em regiões tropicais em quase tôdas as épocas do ano (Patterson e Wagner, 1943; Patterson e Stone, 1952).

Esta espécie foi escolhida para o desenvolvimento de nosso trabalho pela facilidade de ser encontrada na natureza, nos mais variados nichos ecológicos, pela facilidade de ser criada em laboratório e pelo fato de que dispúnhamos de uma linhagem com o cromossomo X marcado.

As moscas provieram de linhagens de laboratório e amostras coletadas na natureza.

2.1. Linhagens de laboratório.

Utilizamos, para o presente trabalho, a linhagem de D. melanogaster conhecida pelo nome de "Basc" ou "Muller-5". Sua denominação deriva das mutações que o cromossomo X contém: o gene dominante "Bar" (B), o recessivo "apricot" (w^a ou apr.) e as inversões que envolvem o locus "scute" (sc), (Muller e cols., 1954).

Para uma melhor compreensão sobre a constituição do estoque "Basc" transcrevemos o original de Lindsley e Grell, 1967.

"Basc

constitution - $In(1)sc^{S1L}sc^{8R} + S, sc^{S1}sc^{8w^aB}$.

synthesis - Muller

synonym - M-5 - Muller-5.

references - Spencer and Stern, 1948, Genetics, 33: 43-74.

properties - Male and homozygous female viable and fertile; X/O male poorly viable, variegated for y, ac, and probably l(1)Jl. Suppresses crossing over in X, but less so than Binsc because In(1)S= In(1)6A1-3; 10F10-11A1 less effective than In(1)dL-49= In(1)4D7-E1; 11F2-4. Routinely used in detection of sex-linked recessive lethals.

In(1)sc^{S1L}sc^{8R} - Inversion (1) scute of Sinitskaya
l left scute-8 Right.

genetics- duplicated for sc.

origin - recombinant containing left end of
In(1)sc^{S1L} and right end of In(1)sc⁸.

sc^{S1} - scute of Sinitskaya.

discoverer - Sinitskaya, 34 c.

location - 1-0.0

sc⁸ -

origin - X ray induced.

discoverer - Sidorov, 1929.

w^a - white-apricot.

origin - spontaneous

discoverer - Huestis, 1923.

synonym - apr.

location - 1-1.5 (occupies middle site in the w
pseudoallelic series).

phenotype - Eyes of male yellowish with orange tone;
female eyes yellower, somewhat lighter than male. Lar-
val Malpighian tubules colorless.

B - Bar

location - 1-57.0

origin - spontaneous in female.

discoverer - Tice, 13b.

phenotype - eye restricted to narrow vertical bar of
about 90 facets in the male and 70 facets in the female
as contrasted with normal numbers of about 740 for ma-
les and 780 for females. B/+ female about 300 facets

and shows indentation terminating in horizontal fissure on anterior margin of the eye, producing a kidney-shaped eye."

O fato mais importante na linhagem Basc, são suas duas inversões contidas no cromossomo X, uma incluída dentro da outra, as quais permitem pouca permuta genética através deste cromossomo, e seus genes marcadores Bar (B) e apricot (w^a) que permitem reconhecer o cromossomo fenotipicamente (Stern e cols., 1952).

2.2. Amostras coletadas na natureza.

A captura das moscas foi feita em iscas naturais, na sua maioria em um depósito de bananas (localizado em São José do Rio Preto) onde, nos vasilhames que continham bananas maduras e em estado de fermentação adiantado, encontrava-se grande quantidade de moscas, principalmente na parte da manhã, entre 7,00 e 8,30 horas e à tardinha, entre 17,00 e 18,00 horas, talvez devido à sombra existente no local das iscas durante estes períodos.

As moscas, coletadas por meio de uma rede entomológica comum, eram colocadas em tubos de excursão e logo em seguida transferidas para tubos contendo meio de cultura.

Em outros locais visitados (Mercado Municipal e depósito de tomates) as coletas foram muito pobres tanto em relação ao número total de moscas coletadas como em relação ao número da espécie em questão.

Algumas iscas de banana fermentadas naturalmente, foram colocadas no quintal da Faculdade de Filosofia,



Ciências e Letras de São José do Rio Prêto, mais precisamente na estufa de plantas da Cadeira de Botânica, com coletas bem sucedidas.

Môscas provenientes de Pirassununga e Mendonça (Estado de São Paulo) também foram utilizadas no presente trabalho. Dos 203 cromossomos estudados, 146 procederam de São José do Rio Prêto, 27 de Pirassununga e 30 de Mendonça.

2.3. Ocorrência de outras espécies de Drosophila.

Tivemos a oportunidade de assinalar a ocorrência de outras espécies de Drosophila, durante a seleção das fêmeas de Drosophila melanogaster, utilizadas neste trabalho. Por ordem alfabética são as que se seguem: D. ananassae, D. busckii, D. guaramunu, D. latifasciaeformis, D. montium, D. nebulosa, D. simulans, D. sturtevantii, D. virilis e D. willistoni. Môscas dos grupos cardini, repleta e tripunctata também foram assinaladas. Com exceção de D. simulans, as demais espécies geralmente ocorrem com uma frequência inferior à de D. melanogaster.

Foram realizadas 13 coletas em São José do Rio Prêto e na tabela 1, estão registrados o número total de môscas coletadas por espécies e suas respectivas frequências percentuais.

Tabela 1.

Frequência percentual das espécies de Drosophila que ocorreram juntamente com D. melanogaster, em 13 coletas realizadas em São José do Rio Preto.

Espécie	Total	Freq. em %
<u>D. ananassae</u>	784	10,06
<u>D. busckii</u>	147	1,88
<u>D. guaramunu</u>	4	0,05
<u>D. latifasciaeformis</u>	243	3,11
<u>D. melanogaster</u>	1.211	15,53
<u>D. montium</u>	249	3,20
<u>D. nebulosa</u>	141	1,81
<u>D. simulans</u>	4.176	53,58
<u>D. sturtevantii</u>	17	0,21
<u>D. virilis</u>	3	0,04
<u>D. willistoni</u>	2	0,02
Grupo cardini	134	1,72
Grupo repleta	675	8,66
Grupo trinpunctata	8	0,10



2.4. Manutenção das linhagens em laboratório.

A manutenção do estoque "Muller-5" no laboratório é realizada em vidros de 1/4 de litro contendo meio de cultura, em câmara própria a $25^{\circ} \text{C} \pm$.

Os cruzamentos realizados com moscas coletadas na natureza foram feitos em tubos de 2 cm de diâmetro, por 10 cm de altura, mantidos também na câmara de temperatura constante. Desta maneira, todo o experimento para os 203 cromossomos analisados foi realizado nestes tubos.

O meio de cultura utilizado em nosso trabalho, é o mesmo usado para as demais atividades do Departamento, em pesquisas de Drosophila.

Sua fórmula, elaborada por nós, consta dos seguintes ingredientes:

Água.....	1.000 ml
Agar-agar.....	20 g
Banana.....	800 g
Mel Karó.....	20 ml
Fermento Fleischmann.....	25 g
Nipagin (sol. alc. a 10%)...	8 ml
Ácido propiônico.....	2 ml

Uma vez distribuído nos tubos, estes são esterilizados em autoclave.

As moscas nesse meio se desenvolvem bem e apresentam prole numerosa.



2.5. Distinção entre fêmeas de Drosophila melanogaster
e de Drosophila simulans.

Drosophila melanogaster e Drosophila simulans, espécies consideradas como crípticas, são difíceis de serem distinguidas por apresentarem características morfológicas muito semelhantes. A análise das fêmeas dessas espécies mostra uma tão grande semelhança morfológica, que nos trabalhos de flutuações encontrados na literatura científica, as frequências registram fêmeas de Drosophila melanogaster e de Drosophila simulans em conjunto, como por exemplo em Patterson (1943) e Pavan (1959).

Os machos podem ser reconhecidos pelo exame da genitália externa, pois em Drosophila simulans é possível verificar uma maior saliência do bordo posterior do arco genital não encontrada em Drosophila melanogaster (Sturtevant, 1919 e Salles, 1948).

Uma técnica foi desenvolvida, por nós, para a distinção entre fêmeas de Drosophila melanogaster e de Drosophila simulans, uma vez que não encontramos na literatura uma maneira para distinguir fêmeas dessas duas espécies, considerando que, o reconhecimento de fêmeas de D. melanogaster e de D. simulans seria para nós de grande valia para o desenvolvimento de nosso trabalho. Assim passamos a examinar vários caracteres e dois nos pareceram favoráveis para esse fim: "largura de uma região da faceta" e a "distribuição da pigmentação do 6º tergito abdominal".

a) Largura de uma região da facêta.

Esta é definida pelo segmento de reta que passa pela base da cerda vertical anterior até a base da última cerda que acompanha o bordo inferior da facêta. Esta cerda fica próxima de duas outras mais fortes na região infero-posterior. A distância entre a base desta cerda e o bordo do ôlho é o caráter em questão (figs. 1 e 2).

As medidas tomadas, apresentadas na tabela 2, foram feitas em microscópio estereoscópico Wild M-5, utilizando uma ocular micrométrica de 10 aumentos, uma objetiva adicional de 1,5 aumentos, num total de 75 aumentos.

b) Distribuição de pigmentos no 6º tergito.

Levou-se em consideração a presença ou não de pigmentos no 6º tergito abdominal, na margem lateral, bem como a área por êle formada (figs. 3 e 4).

Os resultados obtidos pela técnica adotada serão comentados neste capítulo uma vez que o problema é pertinente ao item Material e Método, e a sua solução facilitou-nos sobremaneira a coleta do material adequado.

Sturtevant (1919), na descrição de D. simulans, menciona o caráter "maior largura da facêta" como não sendo fator discriminante entre as duas espécies:

"The eyes are a little larger and the cheeks a little narrower than in that species; but these differences are not sufficiently well marked to serve as diagnostic caracteres".



Classificamos 260 fêmeas da natureza de acôr-
do com a largura da facêta e separamos-las em tubos com meio de
cultura. Os machos da primeira geração de uma dessas fêmeas fo-
ram analisados e classificados como D. melanogaster ou D. simu-
lans de acôrdo com a estrutura externa e suas genitálias. Des-
sa maneira foi possível classificar as fêmeas pelo método clás-
sico e comparar os resultados obtidos pela análise da largura
da facêta, o que nos permitiu verificar a precisão da técnica
que apresentamos. A tabela 2 mostra os resultados obtidos pelo
método proposto, comparados com os obtidos pelo método clási-
co. Das 260 fêmeas, 111 foram classificadas como D. melanogaster.

Fig. 1 - Largura de uma região da facêta de Drosophila
melanogaster.

Resultados comparativos da classificação de 260 fêmeas de D.
melanogaster - D. simulans pelo método largura da facêta e
pela genitália dos machos de F_1 .

Espécie	Nº de qq. classif. pe- lo larg. da facêta.	Concordância pela análise da genit. dos machos de F_1 .	% de erro
<u>D. melanogaster</u>	111	111	1,7
<u>D. simulans</u>	138	138	6,1

Fig. 2 - Largura de uma região da facêta de Drosophila
simulans.

Classificamos 260 fêmeas da natureza de acôrdo com a largura da facêta e separamo-las em tubos com meio de cultura. Os machos da primeira geração de uma dessas fêmeas foram analisados e classificados como D. melanogaster ou D. simulans de acôrdo com a estrutura externa de suas genitálias. Dessa maneira foi possível classificar as fêmeas pelo método clássico e comparar os resultados obtidos pela análise da largura da facêta, o que nos permitiu verificar a precisão da técnica que apresentamos. A tabela 2 mostra os resultados obtidos pelo método proposto, comparados com os obtidos pelo método clássico. Das 260 fêmeas, 113 foram classificadas como D. melanogaster e 147 como D. simulans, pelo nosso método. A comparação dêsse resultado com o obtido pela análise dos machos de F_1 , deu-nos um total de acôrto de 111 D. melanogaster (1,7% de êrro) e 138 D. simulans (6,1% de êrro).

Tabela 2.

Resultados comparativos da classificação de 260 fêmeas de D. melanogaster - D. simulans pelo caráter largura da facêta e pela genitália dos machos de F_1 .

Espécie	Nº de qq. classif. pela larg. da facêta.	Concordância pela análise da genit. dos ♂ de F_1 .	% de êrro
<u>D. melanogaster</u>	113	111	1,7
<u>D. simulans</u>	147	138	6,1

Diante dêsses resultados (tabela 2), foram tomadas medidas de uma amostra de 531 fêmeas provenientes da

natureza, que classificadas pela análise das genitálias dos machos de F_1 , determinaram resultados que são dados pela tabela 3. Dessas fêmeas, 237 são D. melanogaster e 294 D. simulans.

Tabela 3.

Medidas da largura da facêta de 531 fêmeas de D. melanogaster e de D. simulans, classificadas pela análise das genitálias dos machos de F_1 .

Divisão da régua	valor em μ	<u>D. melanogaster</u>		<u>D. simulans</u>	
		nº de ♀♀	%	nº de ♀♀	%
2	26,50	-	-	27	9,18
3	40,20	2	0,84	228	77,55
4	53,60	90	37,97	38	12,92
5	67,00	132	55,69	1	0,34
6	80,40	13	5,48	-	-

O gráfico da fig. 5 que ilustra os resultados da tabela 3, mostra uma coincidência na largura da facêta das fêmeas de ambas as espécies, nos valores de 40,20, 53,60 e 67,00 μ , o que corresponde às áreas de sobreposição, predominando o valor de 53,60 μ .

Um estudo comparativo entre os resultados apresentados na tabela 2 e os da tabela 3, representada graficamente na fig. 5, nos mostra, uma maior porcentagem de erro, sempre que se classifica D. simulans em relação à largura da facêta, o que pode ser explicado pelo fato de existir maior número de fêmeas de D. melanogaster invadindo a faixa de D. simulans do que o recíproco, como mostra a tabela 2. No valor 53,60 μ há 37,97% de D. melanogaster e 12,92% de D. simulans.

No valor 40,20 μ há 0,84% de D. melanogaster e 77,55% de D. simulans.

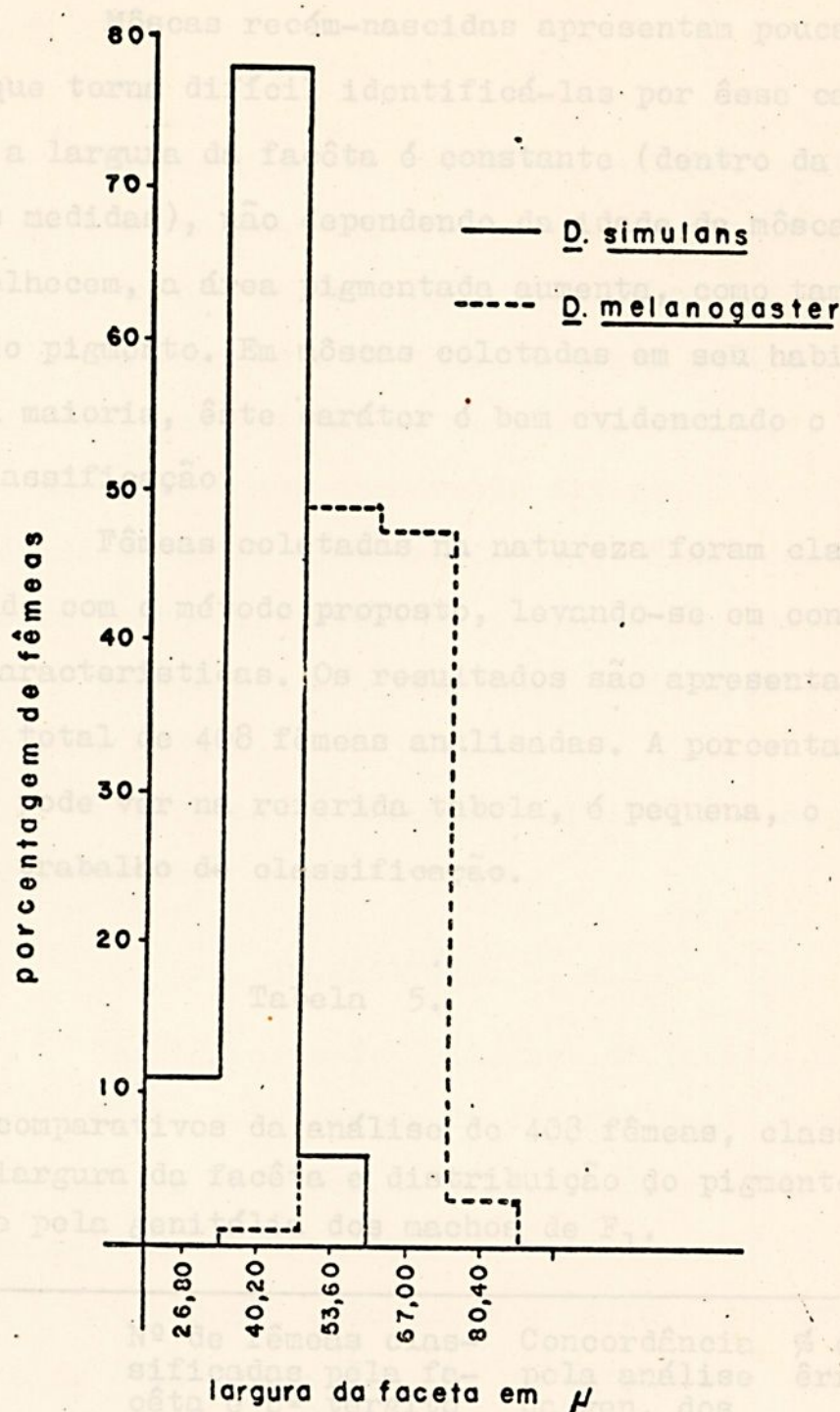
Com relação à segunda característica (pigmen-
tação do sexto tergito abdominal), 113 fêmeas foram classifica-
das e os resultados estão contidos na tabela 4.

Tabela 4.

Resultados da análise de 113 fêmeas classificadas pela dis-
tribuição do pigmento no 6º tergito abdominal.

Espécie	Número de fêmeas classificadas		% de erro
	pelo 6º terg.	pela genitália dos óó de F ₁	
<u>D. melanogaster</u>	32	32	--
<u>D. simulans</u>	81	80	1,2

A discriminação, entre as fêmeas dessas duas espécies, é feita levando-se em consideração a área de distribuição do pigmento no 6º tergito abdominal, bem como a figura por êle formada nas proximidades da margem lateral do mesmo. Assim, em D. melanogaster, o pigmento atinge a margem lateral e forma uma figura trapezoidal, figs. 3 e 4. Em D. simulans o pigmento distribui-se por uma área menor, raramente atingindo a margem lateral do tergito, terminando em ângulo agudo. Em algumas mósca examinadas, o pigmento que atinge a margem lateral, modificando o aspecto característico (ângulo agudo), o faz de maneira que, à medida que se aproxima da margem lateral do tergito vai-se diluindo dando uma tonalidade mais clara nos



Representação gráfica dos resultados da Tabela 3

FIG. 5

sa região, fig, 4.

Môscas recém-nascidas apresentam pouca pigmentação, o que torna difícil identificá-las por êsse caráter, enquanto que a largura da facêta é constante (dentro da precisão de nossas medidas), não dependendo da idade da mosca. À medida que envelhecem, a área pigmentada aumenta, como também a intensidade do pigmento. Em môscas coletadas em seu habitat natural, na sua maioria, êste caráter é bem evidenciado o que facilita sua classificação.

Fêmeas coletadas na natureza foram classificadas de acôrdo com o método proposto, levando-se em consideração as duas características. Os resultados são apresentados na tabela 5, num total de 408 fêmeas analisadas. A porcentagem de erro, como se pode ver na referida tabela, é pequena, o que facilitou nosso trabalho de classificação.

Tabela 5.

Resultados comparativos da análise de 408 fêmeas, classificadas pela largura da facêta e distribuição do pigmento no 6º tergito e pela genitália dos machos de F_1 .

Espécie	Nº de fêmeas classificadas pela facêta e 6º tergito	Concordância pela análise da gen. dos machos de F_1	% de erro
<u>D. melanogaster</u>	165	163	1,22
<u>D. simulans</u>	243	239	1,65

Análise de discriminação: Problema da objetividade da classificação.

Amostras de 40 indivíduos de cada espécie foram tomadas, e analisados, como caracteres discriminadores a maior largura da faceta e o maior diâmetro do olho.

Não usamos o 6º tergito nesta análise porque não nos foi possível quantificar as nossas observações. Por outro lado, como não tivéssemos encontrado diferença significativa entre as médias do maior diâmetro do olho, esse resultado não foi levado em conta em virtude da precisão não muito alta do experimento, e passamos a utilizar como caracteres discriminadores, a faceta e o olho.

Efetuada os cálculos, obtivemos a seguinte função de discriminação:

$$\Delta = -10,96617339 \cdot X_1 + X_2$$

Considerando X_1 , largura da faceta, e X_2 , maior diâmetro do olho, esta função de discriminação revelou-se significativa abaixo do nível de 0,1%, sendo o valor de $F = 114,95$ para $n_1 = 2$ e $n_2 = 77$.

Em seguida calculamos a média e o desvio padrão dos Δ para as duas populações, e, encontramos:

para D. simulans $\bar{\Delta}_s = 0,9099$ e $s(\Delta_s) = 4,7365$.

e D. melanogaster $\bar{\Delta}_m = -16,8385$ e $s(\Delta_m) = 5,5061$.

Com base nesses valores e admitindo-se a normalidade da distribuição dos Δ , construímos os intervalos de variação com 99% de probabilidade, representado na figura 6.

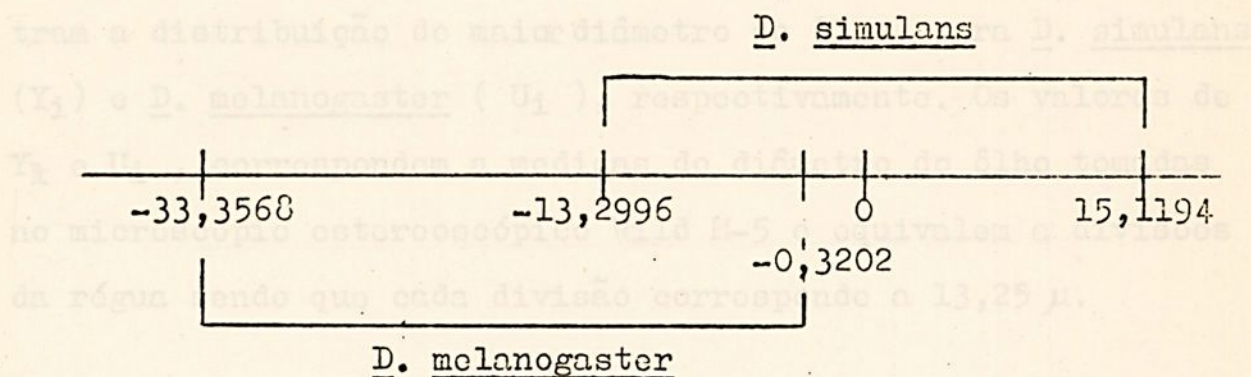


Fig. 6 - Intervalos de variação com 99% de probabilidade, para o maior diâmetro do ôlho e maior largura da facêta.

A ampla faixa comum aos dois intervalos impede que tal procedimento possa ter qualquer eficácia do ponto de vista prático. Isso, aliás, já deveria ter sido previsto, tendo em vista o baixo poder discriminativo do diâmetro do ôlho. É fácil verificar que a discriminação obtida por meio do diâmetro do ôlho e da facêta, é inferior à discriminação obtida pelo uso da faceta tão somente.

O alto poder discriminativo da facêta é o responsável pela significância da função de discriminação. É necessário portanto investigar um outro caráter para melhorar a discriminação realizada pela facêta, eliminando assim os elementos subjetivos e, portanto, pouco transferíveis, do uso do tergito.

Distribuição do diâmetro do olho.

Os dados contidos na tabela 5-A e 5-B mostram a distribuição do maior diâmetro do olho, para D. simulans (Y_i) e D. melanogaster (U_i), respectivamente. Os valores de Y_i e U_i , correspondem a medidas do diâmetro do olho tomadas no microscópio estereoscópico Wild M-5 e equivalem a divisões da régua sendo que cada divisão corresponde a $13,25 \mu$.

Tabela 5-A.

Distribuição do maior diâmetro do olho (Y_i) em Drosophila simulans. Os valores de Y_i correspondem a divisões da régua micrométrica, sendo que cada divisão equivale a $13,25 \mu$

Y_i	n_i
32	3
33	1
34	4
35	3
36	7
37	3
38	14
39	3
40	2
Total	40

Tabela 5-B.

Distribuição do maior diâmetro do olho (U_i) em Drosophila melanogaster. Os valores de U_i correspondem a divisões da régua micrométrica, sendo que cada divisão equivale a 13,25 μ

U_i	n_i
28	1
29	1
30	2
32	2
33	3
34	6
35	2
36	8
37	4
38	7
40	2
41	1
44	1
Total 40	

Na tabela 6 estão registrados os valores estatísticos relativos à média ($\bar{X}$), variância (λ^2), desvio padrão (λ), coeficiente de variação (CV), mediana (Md), amplitude (Ampl.), tamanho da amostra (n) e faixa de variação com 99% de probabilidade, para o maior diâmetro do olho, nas espécies D. simulans e D. melanogaster.



Tabela 6.

Valores estatísticos relativos do maior diâmetro do olho em D. simulans e D. melanogaster

Espécie	$\bar{X}$	s^2	s	CV	Md	Ampl.	n	*Faixa de var. c/99%p.
<u>D. sim.</u>	36,5	4,66	2,15	5,88	37	8	40	30,1 — 43,0
<u>D. mel.</u>	35,5	10,61	3,23	9,17	36	16	40	25,8 — 45,5

* Admitindo-se a distribuição normal da facêta nas duas espécies. Esses resultados devem ser tomados com reserva, porque um teste prévio rejeitou a hipótese de normalidade.

Prova de hipótese:

Com os dados referentes às duas espécies, foi realizado o teste t de Student para por à prova a igualdade das médias populacionais do maior diâmetro do olho.

A ausência de uma prova de normalidade e a falta de uma prova de igualdade das variâncias não foram levados em conta porque sabe-se que quando as duas amostras são do mesmo tamanho o teste t é um teste robusto.

Realizados os cálculos, encontramos $t = 1,68$, valor êsse que com 78 g.l. não rejeita a hipótese da igualdade das médias populacionais.

Distribuição da maior largura da facêta.

Na tabela 6-A e 6-B estão contidos os valores



correspondentes à distribuição da maior largura da facêta, nas espécies D. simulans (X_i) e D. melanogaster (Z_i) respectivamente.

Tabela 6-A.

Distribuição da maior largura da facêta (X_i) em D. simulans. Os valores de X_i correspondem a divisões da régua micrométrica, sendo que cada divisão equivale a $13,25 \mu$.

	X_i	n_i
D. sim.	2	27
	3	228
D. mel.	4	38
	5	1
Total		294

Tabela 6-B.

Distribuição da maior largura da facêta (Z_i) em D. melanogaster. Os valores de Z_i correspondem a divisões da régua micrométrica, sendo que cada divisão equivale a $13,25 \mu$.

Z_i	n_i
3	2
4	90
5	132
6	13
Total	237

Na tabela 7 estão registrados os valores estatísticos relativos à média ($\bar{X}$), variância (s^2), desvio padrão (s), coeficiente de variação (CV), mediana (Md), amplitude (Ampl.), tamanho da amostra (n) e faixa de variação com 99% de probabilidade, para a maior largura da facôta nas espécies D. simulans e D. melanogaster.

Tabela 7.

Valores estatísticos relativos à maior largura da facôta em D. simulans e D. melanogaster.

Espécie	$\bar{X}$	s^2	s	CV	Md	Ampl.	n	* Faixa de var. c/99%p.
<u>D. sim.</u>	3,0	0,23	0,48	15,79	3	3	294	1,5 — 4,5
<u>D. mel.</u>	4,7	0,35	0,59	10,57 12,55	5	3	237	3,0 — 6,5

* Admitindo-se a distribuição normal da facôta nas duas espécies. Esses resultados devem ser tomados com reserva, porque um teste prévio rejeitou a hipótese de normalidade.

Prova de hipótese: facôta.

Para por à prova a significância da diferença das médias correspondentes às duas espécies, novas amostras de 40 D. simulans e 40 D. melanogaster foram coletadas, fornecendo os seguintes dados:

D. simulans

X_i	n_i
3	30
4	10
	40

D. melanogaster

Z_i	n_i
4	12
5	25
6	3
	40

Em seguida foi realizada a prova t de Student. (Uma possível ausência de normalidade e a falta do teste de igualdade de variâncias não foram tomadas em consideração porque sabe-se que quando as duas amostras são iguais o teste t é um teste robusto).

Realizados os cálculos encontramos $t = 12,75$, valor êsse que com 78 g.l. rejeita a hipótese de igualdade das médias populacionais abaixo do nível de 0,1% .



2.6. Esquema dos cruzamentos.

Cada uma das fêmeas de Drosophila melanogaster, uma vez classificada, foi posta em um tubo contendo meio de cultura e da geração F_1 , apenas uma fêmea, de cada tubo, foi cruzada com um macho do estoque "Muller-5", resultando na geração F_2 fêmeas com o cromossomo X selvagem em heterozigose. Estas por sua vez, foram cruzadas novamente com machos "Muller-5", cujos descendentes, constituindo a geração F_3 , são formados de 4 tipos de indivíduos: machos selvagem (+/Y), machos "Muller-5" (M-5/Y), fêmeas heterozigotas para o X selvagem (+/M-5) e fêmeas "Muller-5" (M-5/M-5), (fig. 7).

Na geração F_3 os cruzamentos são consanguíneos e em triplicata, obtendo-se na geração F_4 cromossomos X selvagens em homozigose, o que nos permitiu testar a fertilidade dos machos de F_3 e o efeito limitado ao sexo feminino.

O grau de fertilidade das fêmeas homozigotas pode ser testado cruzando-as com machos procedentes de outras culturas, (+1/Y) originando uma descendência heterozigota para o X selvagem. Estes cruzamentos, como no caso anterior, foram também feitos em triplicata. Estas fêmeas, deram origem à geração F_5 , que também serviu como controle do experimento (fig. 7).

Os cruzamentos foram efetuados em tubos de 2 cm de diâmetro, por 10 cm de altura e após o 4º dia, o casal foi transferido para um 2º tubo (1º repique) e após 48 horas para um terceiro tubo (2º repique). Após a emergência, fêmeas virgens foram retiradas para dar continuidade ao esquema de cruzamentos, e, as demais moscas foram analisadas e contadas.

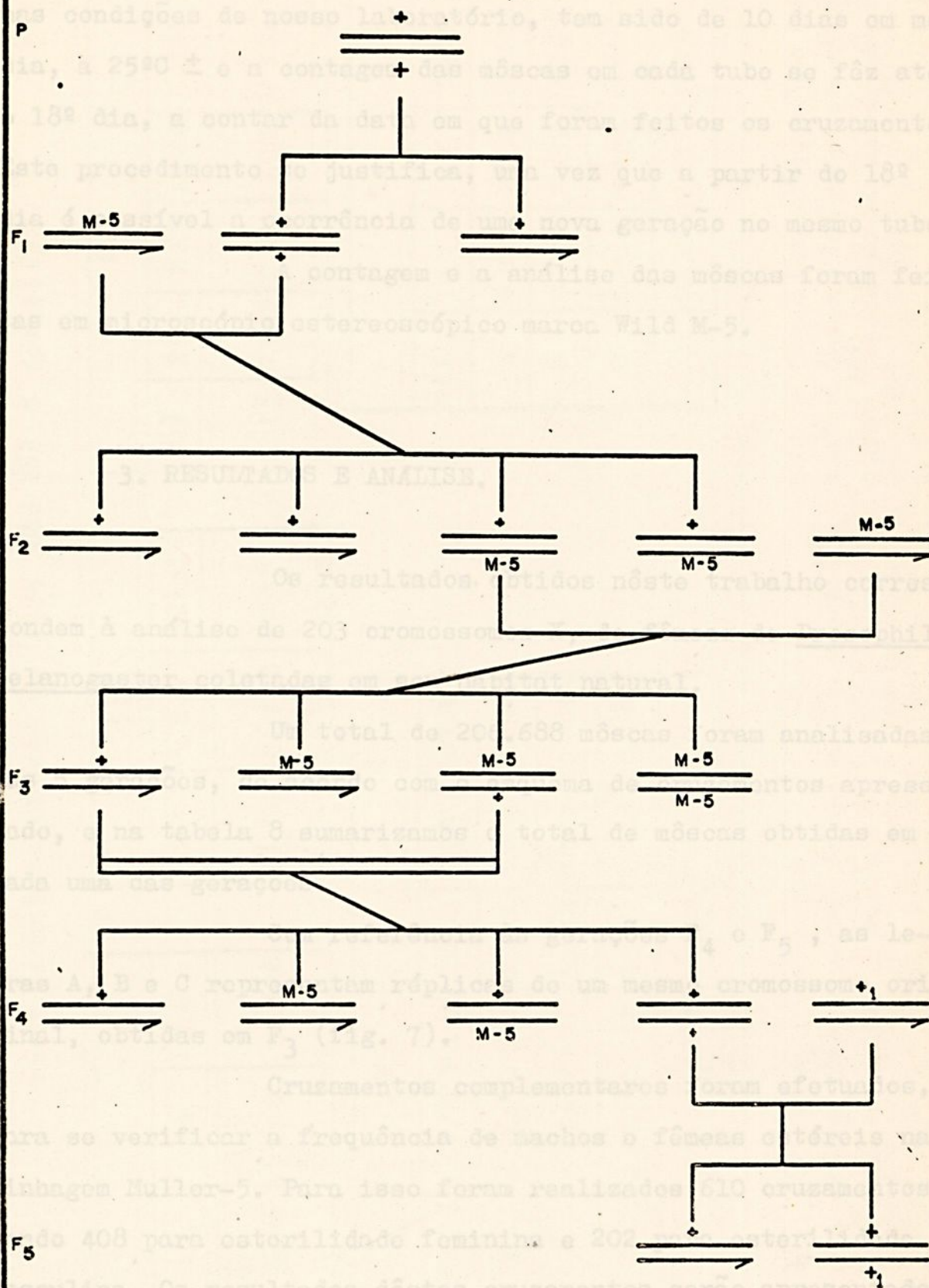


Fig. 7 - Esquema de cruzamentos

O ciclo de vida de Drosophila melanogaster nas condições de nosso laboratório, tem sido de 10 dias em média, a $25^{\circ}\text{C} \pm$ e a contagem das moscas em cada tubo se fez até o 18º dia, a contar da data em que foram feitos os cruzamentos. Este procedimento se justifica, uma vez que a partir do 18º dia é possível a ocorrência de uma nova geração no mesmo tubo.

A contagem e a análise das moscas foram feitas em microscópio estereoscópico marca Wild M-5.

3. RESULTADOS E ANÁLISE.

Os resultados obtidos neste trabalho correspondem à análise de 203 cromossomos X, de fêmeas de Drosophila melanogaster coletadas em seu habitat natural.

Um total de 206.688 moscas foram analisadas nas 5 gerações, de acordo com o esquema de cruzamentos apresentado, e na tabela 8 resumizamos o total de moscas obtidas em cada uma das gerações.

Com referência às gerações F_4 e F_5 , as letras A, B e C representam réplicas de um mesmo cromossomo original, obtidas em F_3 (fig. 7).

Cruzamentos complementares foram efetuados, para se verificar a frequência de machos e fêmeas estéreis na linhagem Muller-5. Para isso foram realizados 610 cruzamentos, sendo 408 para esterilidade feminina e 202 para esterilidade masculina. Os resultados destes cruzamentos serão apresentados no item Discussão, uma vez que o problema se encontra relacionado com a frequência de machos XY estéreis de F_3 e fêmeas XX estéreis de F_4 .

TABELA-8

Total de moscas obtidas em cada uma das 5 gerações.

F ₁		
XY	XX	Total
9.880	10.896	20.776

F ₂		
XY	XX5	Total
21.407	22.670	44.077

F ₃				
XY	X5Y	XX5	X5X5	Total
9.569	8.259	10.422	9.012	37.352

F ₄					
RÉPL.	XY	X5Y	XX	XX5	TOTAL
A	5.923	4.003	5.259	5.431	20.616
B	5.762	4.031	5.322	5.347	20.462
C	5.690	3.978	5.413	5.554	20.640
	17.375	12.012	15.999	16.332	61.718

F ₅			
RÉPL.	XY	XX	TOTAL
A	6.986	7.716	14.702
B	6.726	7.459	14.185
C	6.654	7.224	13.878
	20.366	22.399	42.765

Obs. XY = macho selvagem
 X5Y = macho Muller-5 (ôlho Bar-apricot).
 XX = fêmea selvagem

XX5 = fêmea heterozigota (ôlho Bar-het).
 X5X5 = fêmea Muller-5 (ôlho Bar-apricot).
 A, B e C = réplicas de um mesmo cromossomo.

3.1. Recombinantes em F_3 e F_4 .

Durante a realização do presente trabalho, foi possível observar a frequência de recombinação entre o cromossomo X selvagem e o cromossomo X Muller-5, de constituição $In(1) sc^{S1L} sc^{8R} + S, sc^{S1} sc^8 w^a B$ (Lindsley e Grell, 1967).

Entre as classes esperadas nas gerações F_3 e F_4 foram observados indivíduos recombinantes para o cromossomo X das moscas "Muller-5", com os seguintes fenótipos: machos olho normal-apricot e olho Bar de coloração normal. Entre as fêmeas apareceram três fenótipos diferentes: olho Bar-coloração normal, normal-apricot e Bar heterozigoto-apricot.

Na geração F_3 , 51% das culturas apresentaram recombinantes, num total de 374 moscas. O número de indivíduos contados nestas culturas foi de 21.569, sendo a frequência de permuta 1,73%. Na geração F_4 , 31% das culturas apresentaram novas combinações num total de 126 moscas. O número de indivíduos contados nestas culturas foi de 9.336, com frequência de permuta igual a 1,35%.

Apresentamos, na tabela 9, os dados acima referidos para as duas gerações.

	Total		%		Total		%	
N. apr.	102	27,27	56	44,44	51	13,64	1	0,80
Bar N.	85	22,72	33	26,19	91	24,33	32	25,40
Bar apr.	-	-	-	-	45	12,04	4	3,17

Obs.: N. apr. = forma normal, col. apricot; Bar N. = forma Bar, col. normal e Bar apr. = forma Bar-apricot.

Em outras 5 culturas da geração F_4 apareceu somente 1 tipo de forma recombinante, sendo que em 4 delas as

Tabela 9.

Recombinantes em F_3 e F_4 e respectivas frequências .

Geração	Nº de culturas que apresentaram recombinação	Nº de moscas	Nº de recombinantes	Frequência permuta em %
F_3	104	21.569	374	1,73
F_4	64	9.336	126	1,35

Tabela 11.

Na tabela 10 estão representados os tipos de recombinantes com as respectivas frequências:

Tabela 10.

Número de recombinantes de F_3 e F_4 , distribuídos de acordo com o sexo, caracteres fenotípicos e frequência percentual.

Fenótipo	MACHOS				FÊMEAS			
	F_3		F_4		F_3		F_4	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
N. apr.	102	27,27	56	44,44	51	13,64	1	0,80
Bar N.	85	22,72	33	26,19	91	24,33	32	25,40
Bar ^(het) apr.	-	-	-	-	45	12,04	4	3,17

Obs.: N. apr. = forma normal, col. apricot; Bar N. = forma Bar, col. normal e Bar^(het) apr. = forma Bar^(het) col. apricot.

Em outras 5 culturas da geração F_4 apareceu somente 1 tipo de forma recombinante, sendo que em 4 delas as

môscas eram machos de olho Bar-côr normal e na 5ª cultura eram fêmeas Bar (het.)-apricot. Estes casos não foram incluídos nos anteriores/^{mente} referidos pelo fato de somente um tipo recombinante ter-se manifestado, parecendo-nos tratar-se de mutação em relação à côr do olho.

As proporções entre as classes, nêstes 5 casos, aparecem bastante modificadas. O nº de môscas obtidas nessas culturas é mostrado na tabela 11.

Tabela 11.

Número de môscas obtidas em F_4 e frequências percentuais nas culturas que apresentaram apenas uma forma recombinante.

Nº da cult.	MACHOS				FÊMEAS			
	XY	%	X5 Y	%	XX5	%	XX	%
40 C	3	5,55	15	27,78	36	66,67	0	-
58 C	10	11,62	2	2,33	72	83,72	2	2,33
63 C	33	37,50	0	-	34	33,63	21	23,87
75 B	8	9,19	29	33,34	49	56,32	1	1,15
84 B	44	24,17	42	23,08	44	24,17	52	28,58

Na tabela 12 apresentamos o número e os tipos de recombinantes correspondentes às culturas mencionadas na tabela 11.

Tabela 12.

Número e tipos de recombinantes da geração F_4 , correspondentes às culturas mencionadas na tabela 11.

Nº da cult.	M A C H O S		F E M E A S		
	N. apr.	Bar N.	Bar N.	N. apr.	Bar(het.)apr.
40 C	-	18	-	-	-
58 C	-	24	-	-	-
63 C	-	25	-	-	-
75 B	-	35	-	-	-
84 B	-	-	-	-	12

Obs.: N. apr. = forma normal, col. apricot; Bar. N. = forma Bar, col. normal; Bar(het.),apricot = forma heterozigota para o Bar e col. apricot.

Nas figs. 8 e 9 está representada gráficamente a distribuição das frequências dos recombinantes de F_3 e F_4 .

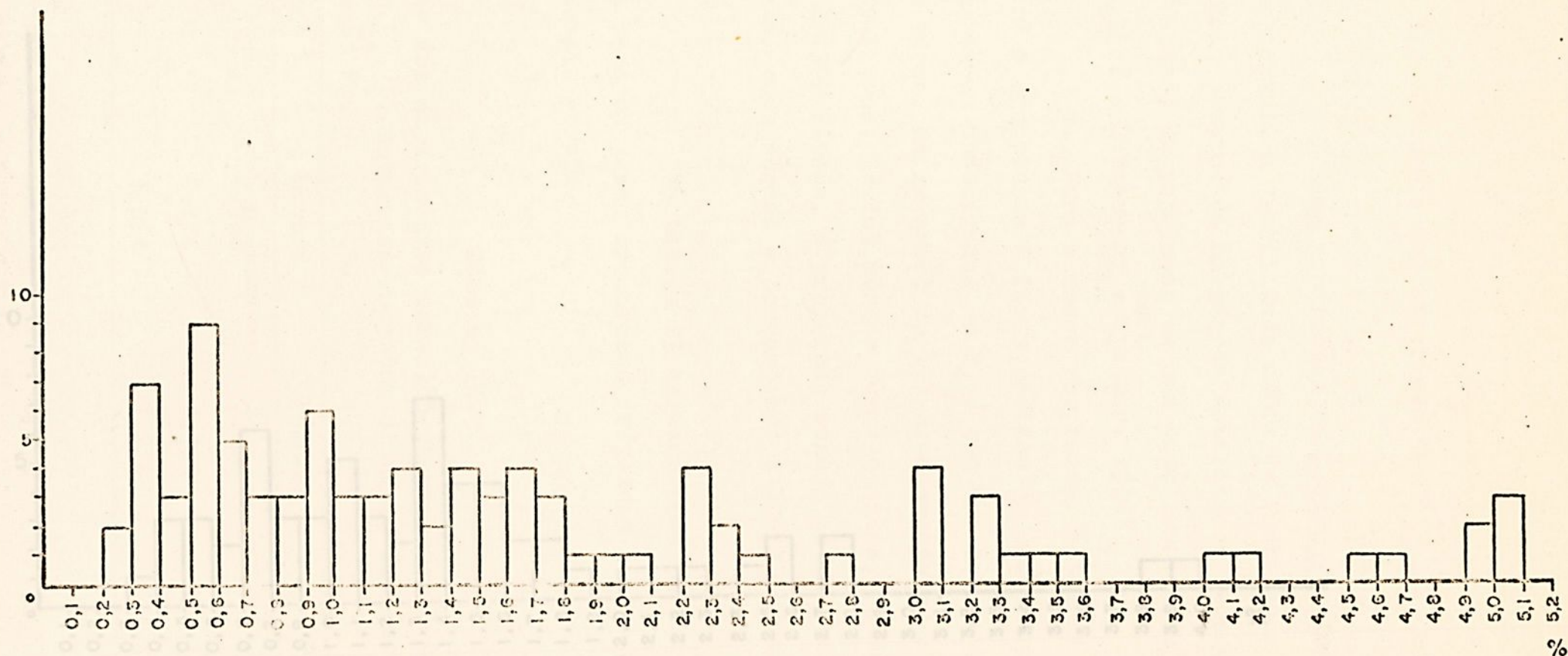


FIG.8 - Distribuição de frequências de recombinantes em F₃ para 94 cromossomos.

FIG. 9 - Distribuição de frequências de recombinantes em F₄ para 61 cromossomos.

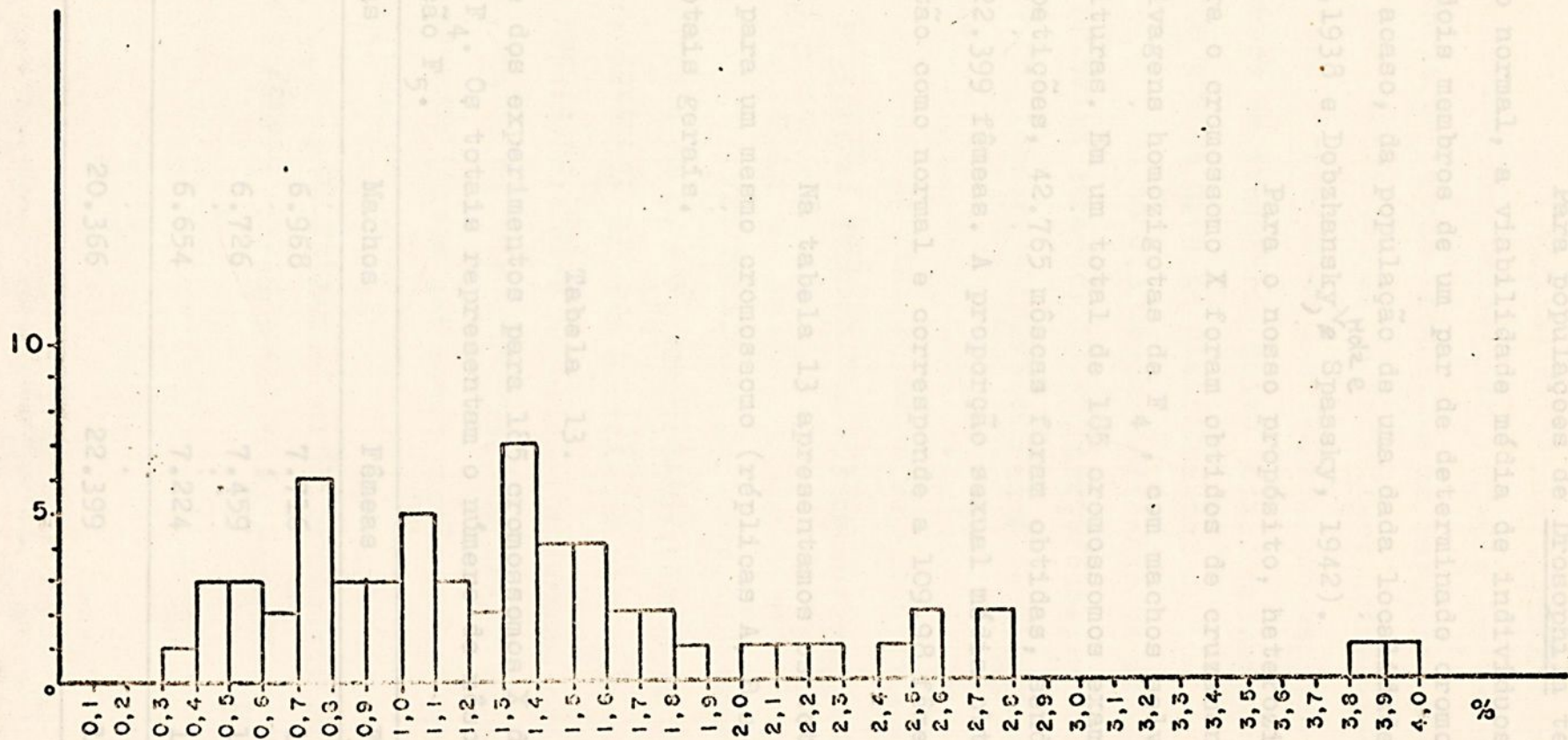


FIG. 9 - Distribuição de frequências de recombinantes em F4 para 61 cromossomos.

3.2. Contrôles dos experimentos.

Para populações de Drosophila tem-se definido, como normal, a viabilidade média de indivíduos que transportam dois membros de um par de determinado cromossomo, tomados, ao acaso, da população de uma dada localidade (Dobzhansky e Queal, 1938 e Dobzhansky^{Hoze} e Spassky, 1942).

Para o nosso propósito, heterozigotos selvagens para o cromossomo X foram obtidos de cruzamentos de fêmeas selvagens homozigotas de F_4 , com machos selvagens de outras culturas. Em um total de 185 cromossomos examinados, em três repetições, 42.765 moscas foram obtidas, sendo 20.366 machos e 22.399 fêmeas. A proporção sexual média obtida foi definida então como normal e corresponde a 109,98 fêmeas para 100 machos.

Na tabela 13 apresentamos os totais em triplicata para um mesmo cromossomo (réplicas A, B e C), assim como os totais gerais.

Tabela 13.

Contrôles dos experimentos para 185 cromossomos X de fêmeas da geração F_4 . Os totais representam o número de moscas obtidas na geração F_5 .

Réplicas	Machos	Fêmeas	F/M .100
A	6.968	7.716	110,50
B	6.726	7.459	110,90
C	6.654	7.224	108,56
Total (A+B+C)	20.366	22.399	109,98

Na fig. 10 estão representadas as frequências das proporções sexuais para os 185 cromossomos de F_5 .

A análise da primeira geração pode também ser considerada como um segundo controle das experiências. A descendência de fêmeas fecundadas na natureza, como as coletadas por nós, constitui-se de indivíduos heterozigotos e hemizigóticos para o cromossomo X selvagem, uma vez que a homozigose apresenta-se em frequência muito baixa, principalmente em populações com grande área de distribuição.

As 203 fêmeas coletadas na natureza originaram, na primeira geração, 20.776 indivíduos, sendo 9.880 machos e 10.896 fêmeas. A razão sexual é de 110,30 fêmeas para 100 machos.

Na fig. 11 estão representadas as frequências das proporções sexuais dos 203 cromossomos que formam a geração F_1 .

Foi realizado um teste de homogeneidade, dos valores obtidos em F_1 e F_5 (controles), dando um $X^2 = 0,022$ para 1 G.L., portanto podemos aceitá-las como amostras boas de uma mesma população. Estes resultados agrupados nos dão um valor médio, entre os dois controles, de 110,08 fêmeas para 100 machos, passando este a ser nosso padrão normal para a proporção sexual.

Na tabela 14 estão representados os totais de machos e fêmeas correspondentes às gerações F_1 e F_5 .

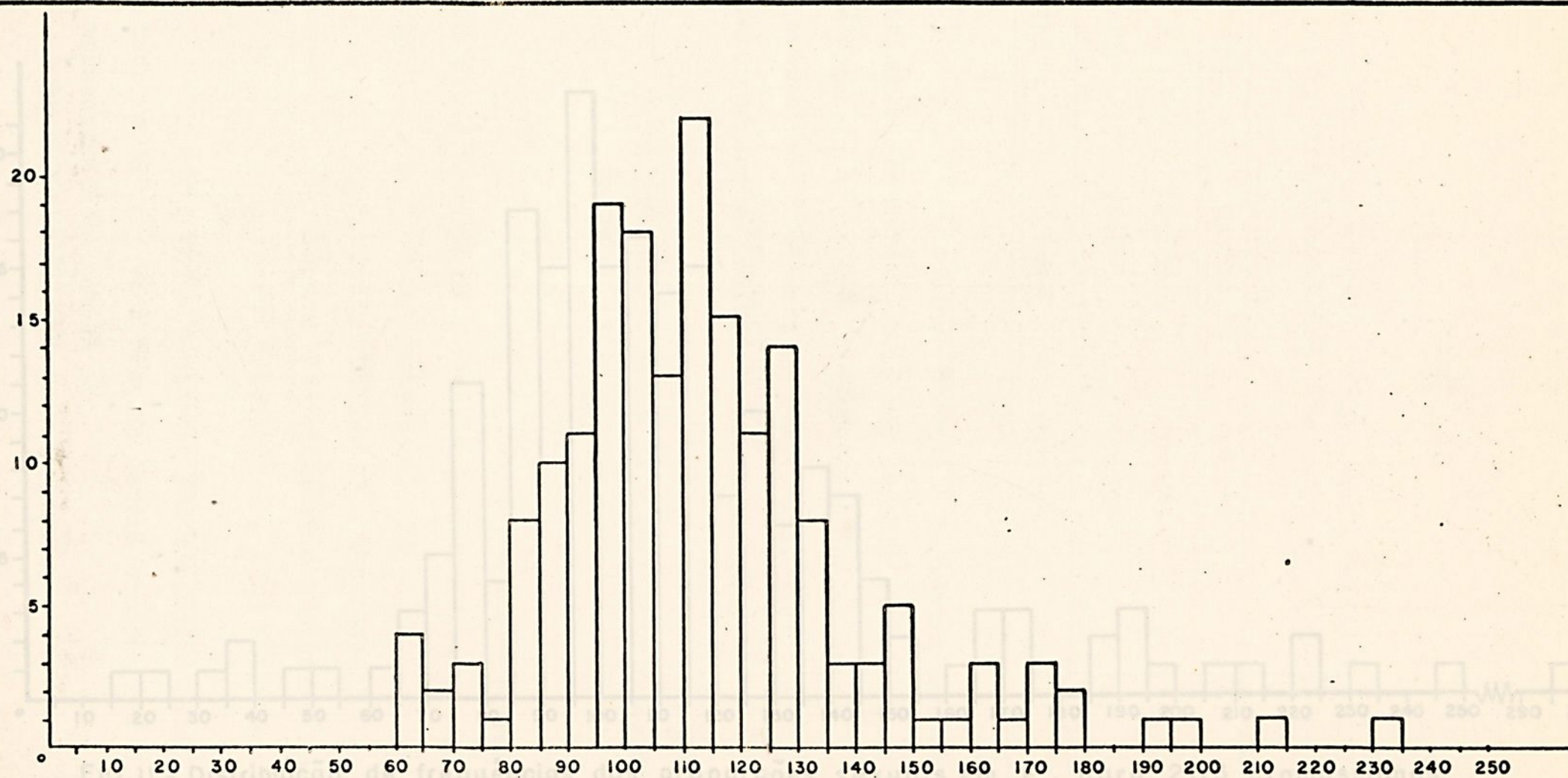


FIG. 10 - Distribuição de frequências das proporções sexuais em F_5 , para 185 cromossomos.
 Abcissa - proporções sexuais: nº de fêmeas: 100 machos. Ordenada - frequência absoluta.

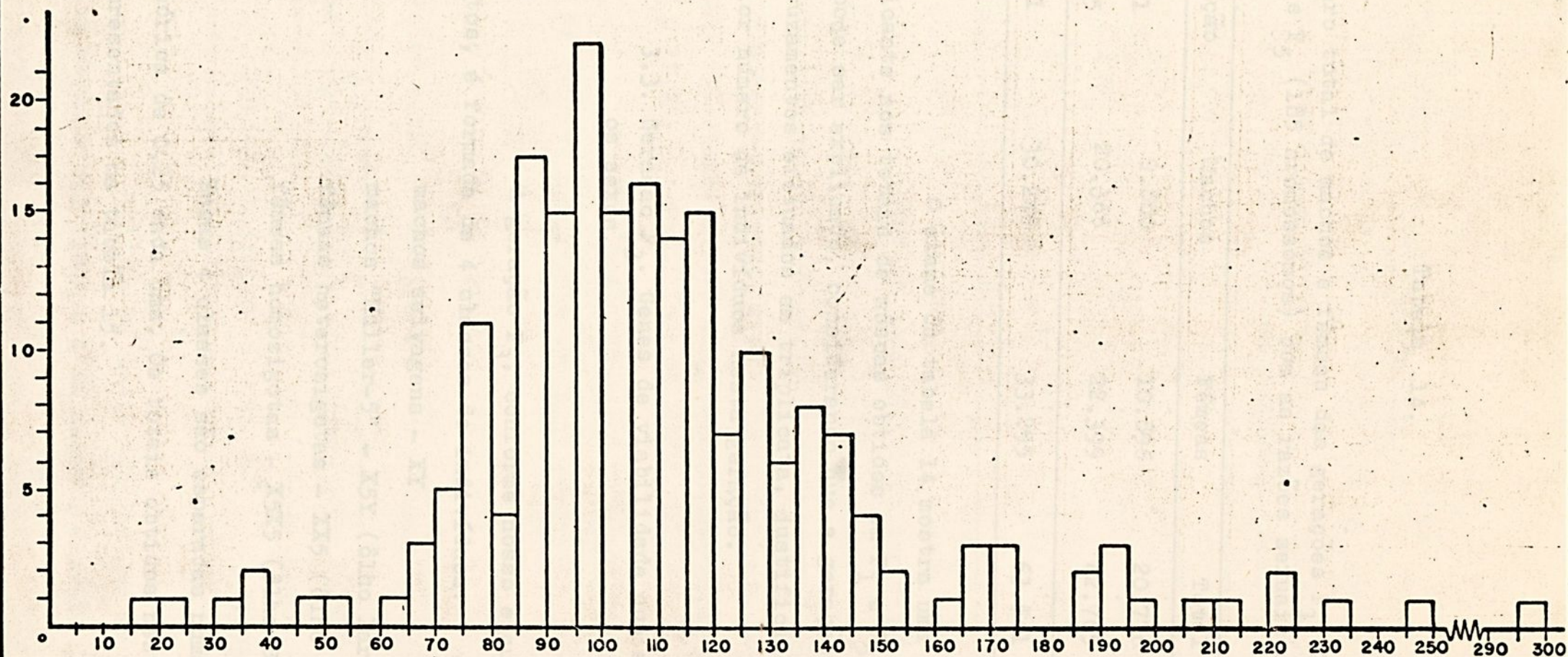


FIG. II - Distribuição de frequências das proporções sexuais em F_1 , para 203 cromossomos.

Abcissa - proporções sexuais; nº de fêmeas: 100 machos. Ordenada - frequência absoluta.

Tabela 14.

Número total de machos e fêmeas das gerações F_1 (203 cromossomos), e F_5 (185 cromossomos) com as razões sexuais correspondentes.

Geração	Machos	Fêmeas	Total	F/M .100
F_1	9.880	10.896	20.776	110,30
F_5	20.366	22.399	42.765	109,98
Total	30.246	33.295	63.541	110,08

O exame da tabela 14 mostra uma diferença significativa nos totais de moscas obtidos em F_1 e F_5 , fato este que pode ser explicado, considerando que a geração F_5 resultou de cruzamentos efetuados em triplicata, justificando portanto o maior número de indivíduos nesta geração.

3.3. Geração F_3 . Genes de viabilidade que afetam ambos os sexos.

A geração F_3 , conforme nosso esquema de cruzamentos, é formada de 4 classes de indivíduos:

machos selvagens - XY

machos "Muller-5" - X⁵Y (ôlho Bar-apricot)

fêmeas heterozigotas - XX⁵ (ôlho Bar)

fêmeas homozigotas - X⁵X⁵ (ôlho Bar-apricot)

Essas 4 classes são esperadas numa frequência teórica de 0,25 cada uma. Os totais obtidos nesta geração são apresentados na tabela 15.

Tabela 15.

Totais e frequências em porcentagem, das diferentes classes obtidas em F_3 , para 203 cromossomos analisados.

Classes	Total	Freq. em %
XY	9.569	25,62
X5Y	8.259	22,11
XX5	10.422	27,90
X5X5	9.102	24,37

Como se pode verificar por essa tabela, na geração F_3 as frequências observadas mostram uma maior viabilidade das classes que transportam o cromossomo X selvagem, sendo estas classes superiores, à frequência esperada de 0,25. Frequências inferiores a 0,25 são apresentadas pelas classes que levam o cromossomo X marcado.

Na tabela 16 estão relacionadas as proporções entre as classes que constituem a 3ª geração.

Tabela 16.

Proporções entre as classes que constituem a geração F_3 .

Classes	$\frac{XX5}{XY} \cdot 100$	$\frac{X5X5}{X5Y} \cdot 100$	$\frac{X5Y}{XY} \cdot 100$	$\frac{X5X5}{XX5} \cdot 100$
Prop.	108,91	110,20	86,31	87,33

Verifica-se nesta tabela, que as proporções entre as classes que levam o X selvagem e aquelas que levam o

X "Muller-5" se apresentam muito próximas, mas quando comparamos as classes de machos e fêmeas Base em relação aos machos selvagens e fêmeas heterozigotas para o X selvagem, verificamos a menor viabilidade destes últimos, ou seja: 86,31 X5Y : 100 XY e 87,33 X5X5 : 100 XX5.

A ausência de machos XY nesta geração indica a presença de genes letais transportados pelo cromossomo X das fêmeas que constituíram a geração F_3 . Dois casos dessa natureza foram observados em 203 cromossomos analisados, portanto com uma frequência de 0,98%. Letais, para o nosso propósito, são considerados cromossomos que não produziram machos selvagens para esta geração. A cultura nº 56 procedente de S. J. do Rio Preto e a 197 procedente de Mendonça, tiveram este comportamento. As culturas 22, 174 e 178 apresentaram uma frequência muito baixa de machos selvagens, 3,22 , 0,42 e 0,55% respectivamente, as quais podem ser consideradas como semi-letais extremos.

Na tabela 17 estão representados em conjunto os resultados acima referidos, sobre letais e semi-letais no cromossomo X, com suas frequências correspondentes ao total de moscas.

Tabela 17.

Número de indivíduos que apresentaram letais e semi-letais na geração F_3 e as frequências correspondentes.

Culturas Nº	XY	X5Y	XX5	X5X5	Freq. de XY em porcentagem.
22	3	21	39	30	3,22
56	0	82	121	103	-- --
174	45	338	428	261	0,42
178	2	105	137	117	0,55
197	0	97	128	114	-- --

Na tabela 18 está representada a viabilidade dos machos XY de F_3 , expressa em porcentagem da viabilidade média dos machos desta mesma geração, e na fig. 12 apresentamos o histograma da distribuição de frequências desses mesmos machos.

3.4. Efeitos limitados ao sexo feminino.

Foram cruzados irmãos de F_3 para originar a geração F_4 , sendo os machos portadores dos mesmos cromossomos X selvagem das fêmeas heterozigotas.

Todos os cruzamentos foram realizados em triplicata, ou seja, três casais, irmãos entre si, colocados em três tubos contendo meio de cultura, denominados A, B e C. As condições de cultura foram as mesmas para as três repetições.

A geração F_4 constituiu-se então de 4 classes de indivíduos, a saber:

machos selvagens - XY

machos "Muller-5" - X⁵Y

fêmeas heterozigotas - XX⁵

fêmeas homozigotas - XX

As frequências esperadas nesta geração são as mesmas da geração anterior, ou seja, 0,25.

Os efeitos limitados ao sexo feminino podem ser analisados nesta geração pelo fato das fêmeas XX serem homozigotas para o cromossomo X original e os machos, hemizigóticos para o mesmo cromossomo.

Os resultados obtidos nas três réplicas são



212/84

TABELA - 18.

Viabilidade de machos XY da geração F_3 expressa em porcentagem da viabilidade média dos machos desta mesma geração.

0 0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160																																			
2	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	3	4	6	8	11	14	19	28	23	25	14	9	9	10	3	5	2	-	-	3			
LETAIS-2 0,98%	SEMI-LETAIS = 3 1,48 %											SUB-VITAIS = 48 23,64 %								NORMAIS = 118 58,13 %						SUPER-NORMAIS = 38 15,76 % 32									

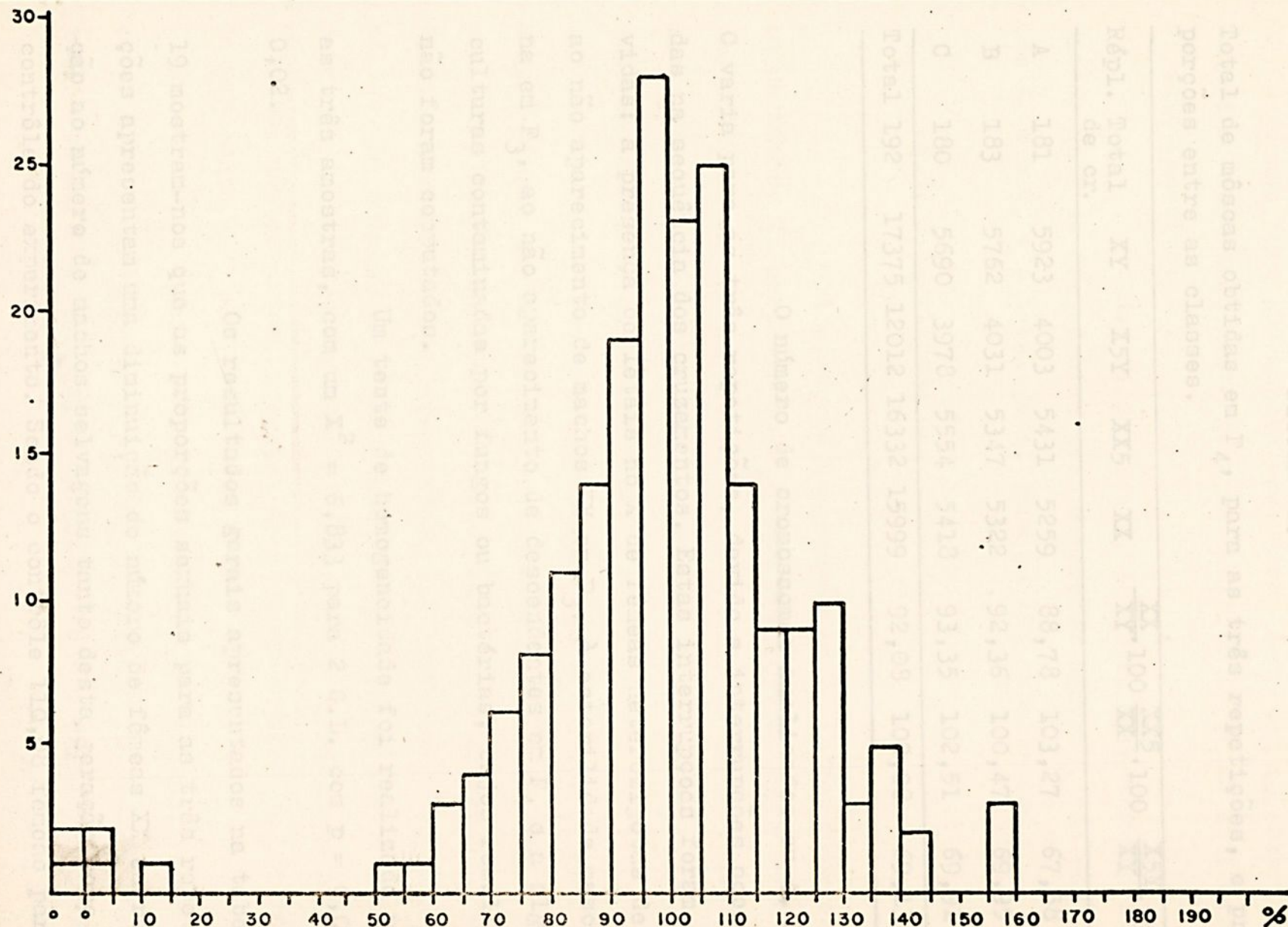


FIG. 12 - Distribuição de frequências da viabilidade de machos XY da geração 3 em relação a viabilidade média dos machos da mesma geração. Abcissa:- porcentagem da viabilidade média dos machos de F_3 . Ordenada:- frequência absoluta.

sumarizados na tabela 19, incluindo as proporções entre as classes que compõem esta geração.

Tabela 19.

Total de môscas obtidas em F_4 , para as três repetições, e proporções entre as classes.

Répl.	Total de cr.	XY	X5Y	XX5	XX	$\frac{XX}{XY} \cdot 100$	$\frac{XX5}{XX} \cdot 100$	$\frac{X5Y}{XY} \cdot 100$
A	181	5923	4003	5431	5259	88,78	103,27	67,58
B	183	5762	4031	5347	5322	92,36	100,47	69,95
C	180	5690	3978	5554	5418	93,35	102,51	69,91
Total	192	17375	12012	16332	15999	92,08	102,08	69,13

O número de cromossomos analisados em A, B e C varia para as três repetições, devido a interrupções ocorridas na sequência dos cruzamentos. Estas interrupções foram devidas: à presença de letais no X de fêmeas heterozigotas de F_2 , ao não aparecimento de machos XY em F_3 , à esterilidade masculina em F_3 , ao não aparecimento de descendentes em F_4 e a algumas culturas contaminadas por fungos ou bactérias, cujos resultados não foram computados.

Um teste de homogeneidade foi realizado para as três amostras, com um $\chi^2 = 6,833$ para 2 G.L. com $p = 0,05 < 0,02$.

Os resultados gerais apresentados na tabela 19 mostram-nos que as proporções sexuais para as três repetições apresentam uma diminuição do número de fêmeas XX em relação ao número de machos selvagens tanto desta geração como do controle do experimento. Sendo o controle 110,08 fêmeas para

100 machos, em F_4 obtivemos, para as repetições A, B e C as seguintes proporções: 88,78 , 92,36 e 93,35 fêmeas para 100 machos na mesma ordem. Agrupando os resultados A, B e C, obtemos um total de 192 cromossomos com a proporção sexual de 92,08 fêmeas para 100 machos, resultado este bem inferior ao controle, mostrando nesta geração o efeito de genes limitados ao sexo feminino.

Nas figs. 13, 14, 15 e 16, apresentamos os histogramas de frequências das proporções sexuais, nas réplicas A, B e C, e o total geral para os 192 cromossomos.

3.5. Esterilidade masculina.

A ausência de geração em F_4 indica a presença de machos XY estéreis em F_3 . Para comprovação desse fato , nas culturas em que não houve descendência, os machos, bem como as fêmeas, foram testados com outras moscas selvagens de estoques mantidos em laboratório.

Uma vez comprovada a esterilidade masculina, alguns desses machos foram dissecados em solução de Ringer e seu aparelho reprodutor examinado. Houve casos em que os testículos apresentavam-se atrofiados, com ausência de espermatozóides. Em outros, os espermatozóides existentes eram imóveis formando uma espécie de rede no interior do testículo e constatamos, nesses casos, presença de espermatozóides no interior da paragônia.

Para os 203 cromossomos analisados, foram encontrados 15 casos de esterilidade masculina, ou 7,39%. Destes, 4 ou 1,97% apresentaram esterilidade nas três repetições:



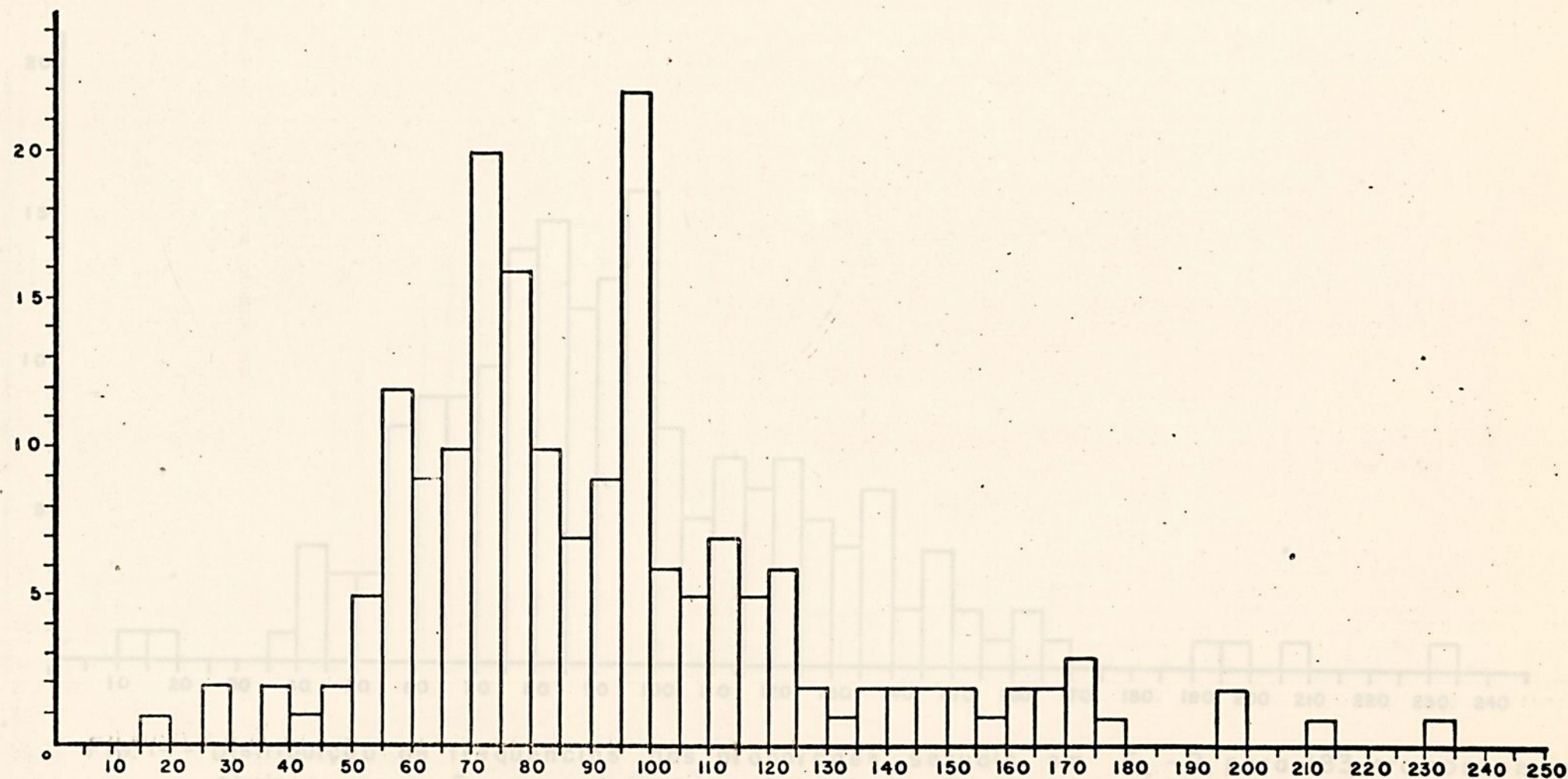


FIG.-13 - Distribuição de frequências das proporções sexuais em F_4A , para 181 cromossomos.
 Abcissa - proporções sexuais, nº de fêmeas: 100 machos. Ordenada - frequência absoluta.

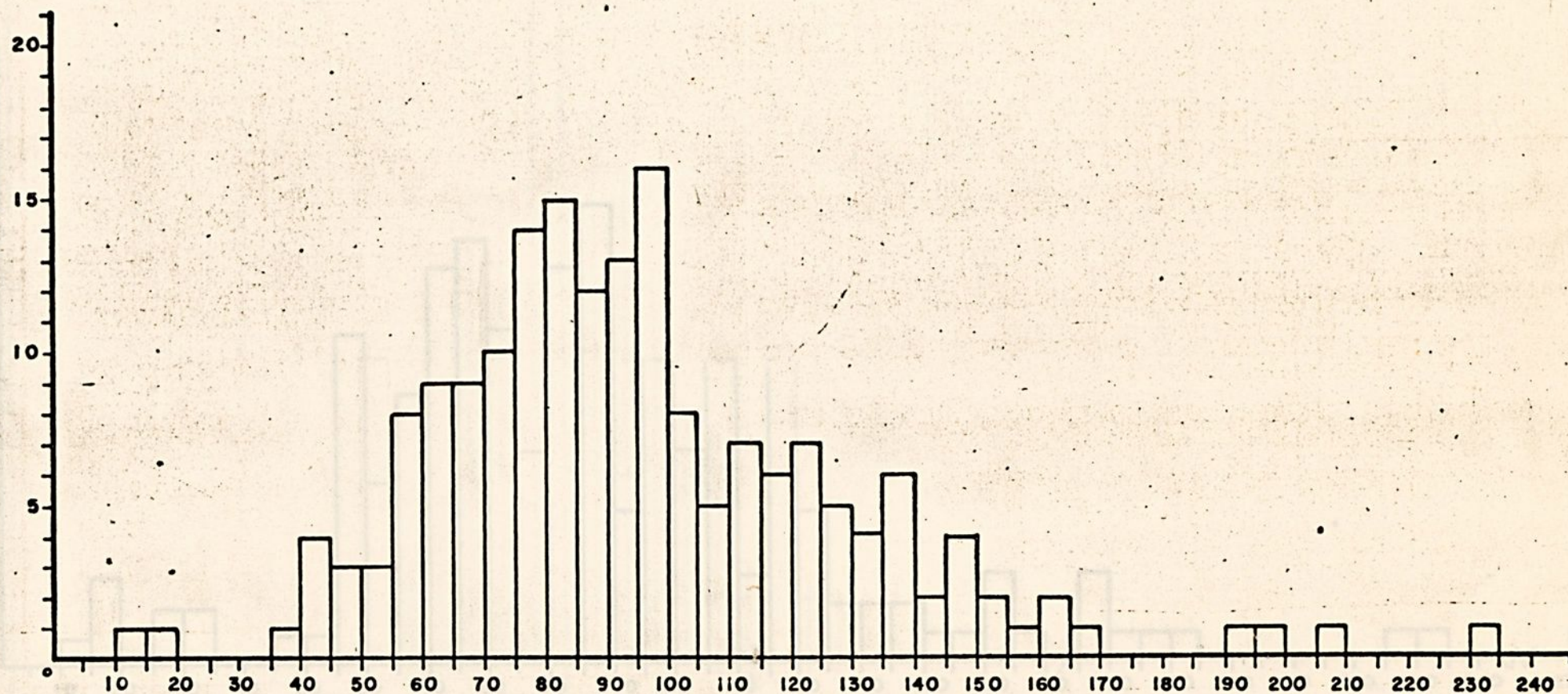


FIG. 14 - Distribuição de frequências das proporções sexuais em $F_4 - B$, para 183 cromossomos. Abcissa - proporções sexuais; nº de fêmeas: 100 machos. Ordenada - frequência absoluta.

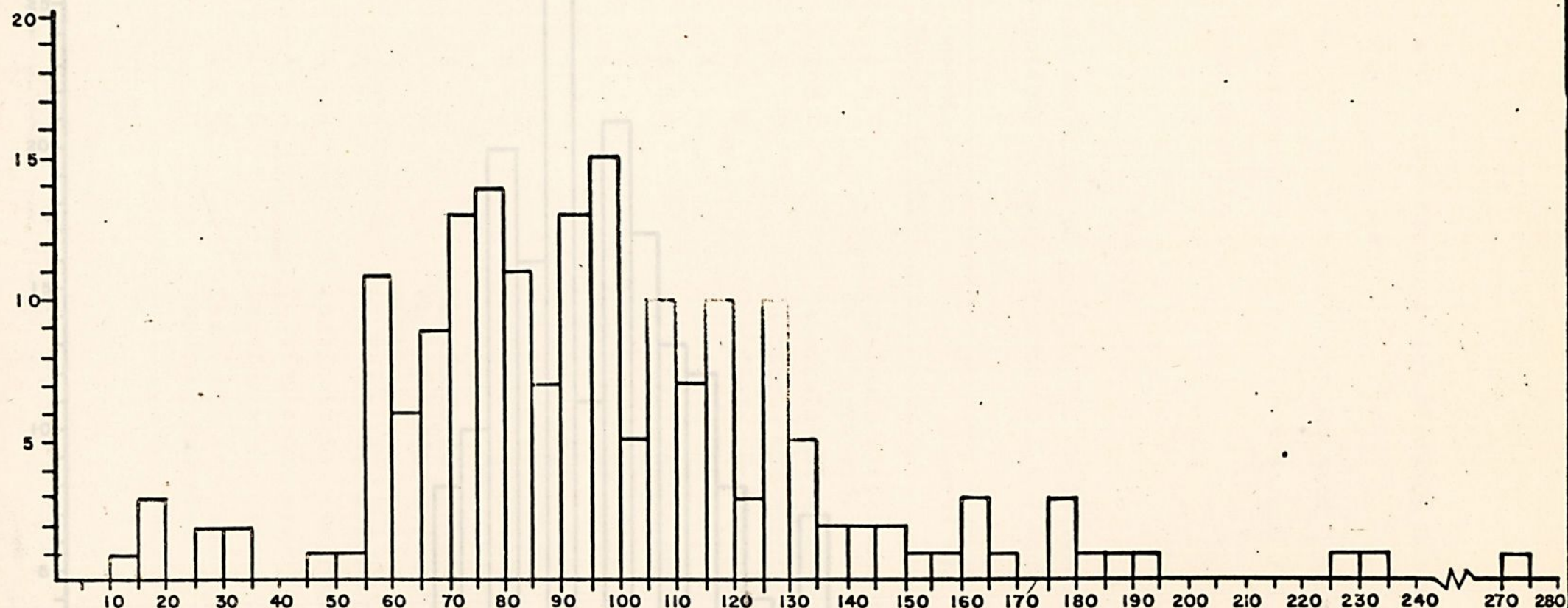


FIG. 15 - Distribuição de frequências das proporções sexuais em F_4 -C, para 180 cromossomos.

Abcissa - proporções sexuais; nº de fêmeas: 100 machos. Ordenada - frequência absoluta.

FIG. 15 - Distribuição de frequências das proporções sexuais em F_4 (A+B+C), para 192 cromossomos.

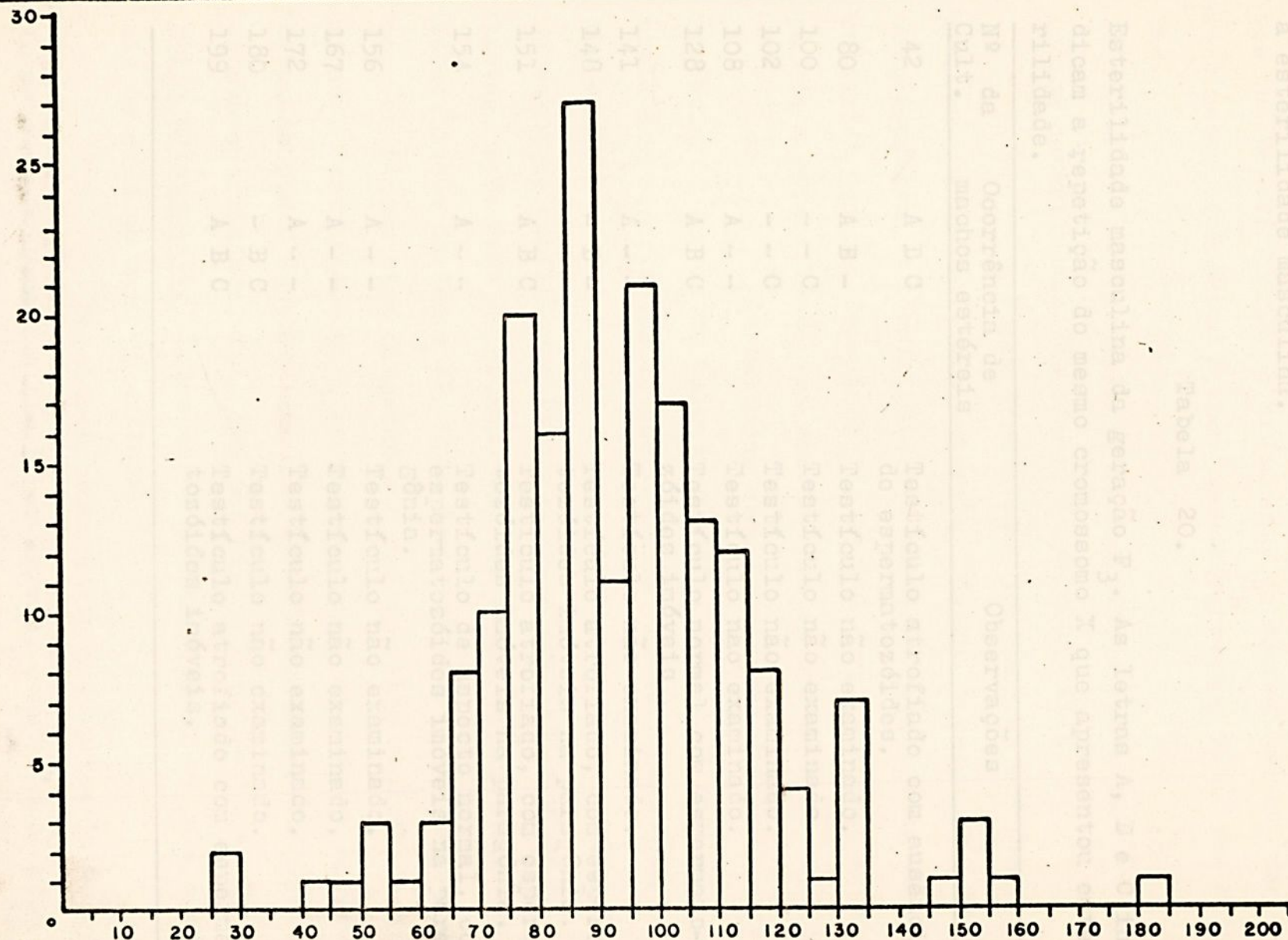


FIG. 16 - Distribuição de frequências das proporções sexuais em F_4 (A+B+C), para 192 cromossomos.

Abcissa - proporções sexuais; nº de fêmeas: 100 machos. Ordenada - frequência absoluta.

tubos A, B e C, 4 apresentaram esterilidade nas duas réplicas e 9 em uma das repetições.

Na tabela 20 apresentamos o número das culturas e a discriminação das repetições em que foi verificada a esterilidade masculina.

Tabela 20.

Esterilidade masculina da geração F_3 . As letras A, B e C indicam a repetição do mesmo cromossomo X que apresentou esterilidade.

Nº da Cult.	Ocorrência de machos estéreis	Observações
42	A B C	Testículo atrofiado com ausência de espermatozóides.
80	A B -	Testículo não examinado.
100	- - C	Testículo não examinado.
102	- - C	Testículo não examinado.
108	A - -	Testículo não examinado.
128	A B C	Testículo normal com espermatozóides imóveis.
141	A - -	Testículo não examinado.
148	- B -	Testículo atrofiado, com espermatozóides imóveis na paragônia.
151	A B C	Testículo atrofiado, com espermatozóides imóveis na paragônia.
154	A - -	Testículo de aspecto normal, com espermatozóides imóveis na paragônia.
156	A - -	Testículo não examinado.
167	A - -	Testículo não examinado.
172	A - -	Testículo não examinado.
180	- B C	Testículo não examinado.
199	A B C	Testículo atrofiado com espermatozóides imóveis.

3.6. Esterilidade feminina.

Como foi dito, as m^oscas que constituíram a geração F₅ foram tomadas como contr^ole dos experimentos, uma vez que se originaram do cruzamento de fêmeas homozigotas, para o mesmo cromossomo X, com machos selvagens de outras culturas.

A ausência de indivíduos nesta geração nos indica esterilidade das fêmeas homozigotas XX de F₄.

Foram constatados 38 casos em 188 cromossomos, ou 20,21% de fêmeas estéreis. Dêstes, 5 casos ou 2,66% corresponderam a fêmeas estéreis nas três repetições. Os 33 restantes com uma frequência de 17,55% corresponderam àquelas em que a esterilidade foi demonstrada em uma ou duas réplicas.

As culturas eram examinadas diariamente e a ausência de larvas no meio de cultura, após o 2^o repique, permitiu-nos supor esterilidade feminina. Estas fêmeas eram postas em novo meio e cruzadas com outros dois machos selvagens, de estoques mantidos no laboratório. A completa ausência de larvas, após êsse 2^o cruzamento, era então interpretada como esterilidade da fêmea XX. Após êsse tratamento, em alguns casos, as fêmeas eram dissecadas e seu aparelho reprodutor examinado. Constatamos que, em alguns casos, os ovários apresentavam-se pouco desenvolvidos, mostrando numerosos filamentos em sua extremidade, fato que não ocorre normalmente em Drosophila melanogaster. Êstes casos caracterizavam-se pela ausência de ovos no meio de cultura.

Em outros cruzamentos que apresentavam ovos no meio de cultura mas não deram larvas, constatamos, pela dis

secção das fêmeas, ovários de aparência normal, com espermatozóides móveis nas espermatécas e receptáculo seminal. A dissecação dos machos mostrou que seus espermatozoides eram móveis.

As culturas, nas quais foi constatada esterilidade feminina, estão relacionadas na tabela 21, perfazendo um total de 38 casos. As letras A, B e C constantes da tabela indicam as réplicas de um mesmo cromossomo em que ocorreu a esterilidade.

Tabela 21.

Relação das culturas e discriminação das réplicas de 1 mesmo cromossomo (A, B e C), em que foi constatada esterilidade feminina em F_4 .

Nº da cultura	Fêmeas estéreis	Nº da cultura	Fêmeas estéreis	Nº da cultura	Fêmeas estéreis
2	A - C	80	- - C	153	- B -
5	A - -	81	A B C	161	- - C
6	- B -	84	A B C	162	A - -
7	- - C	93	- - C	176	- B C
10	- B -	98	- B -	179	- - C
17	- B -	117	A - -	190	- B -
19	- B -	138	- B C	192	- B -
20	A B C	139	- B -	193	A - -
26	- - C	141	- B -	200	- - C
36	A B C	142	A B C	201	A - -
55	A - -	147	A - C	202	- B -
74	A - -	150	A - -	203	A B -
75	- B -	152	A - -		

4. DISCUSSÃO.

O esquema de cruzamentos utilizado em nosso trabalho, a partir de fêmeas coletadas em seu habitat natural, possibilitou-nos um exame mais geral da carga genética no cromossomo X de Drosophila melanogaster. Foi possível então a análise de genes que afetam a viabilidade de ambos os sexos, de genes limitados ao sexo feminino e de genes para esterilidade masculina e feminina.

4.1. Genes de viabilidade que afetam ambos os sexos.

Os resultados obtidos na geração F_3 , permitem verificar o efeito de genes que afetam ambos os sexos, pois que a ausência completa de machos selvagens nesta geração indica a presença de letais no cromossomo X.

Pelos trabalhos realizados até o presente momento, tem-se verificado que a frequência de letais neste cromossomo é baixa, dadas as condições em que se encontra, sofrendo forte seleção natural quando de sua passagem ao estado hemizigótico, característico dos machos. Apresenta, dessa maneira, uma taxa de mutação pequena.

Os dados apresentados por Dubinin (1946, tabelas 4, 5 e 6) e outros autores, mostram que a frequência de letais no cromossomo X não vai além de 1%, frequência essa muito baixa quando comparamos com as frequências correspondentes à carga genética autossômica nesta mesma espécie, como por exemplo, no cromossomo II: 39,15%, em Ives, 1945; 20,26%, em Dawood, 1961 e 17,88%, em Hoenigsberg e Navas, 1965.



Em nosso trabalho, obtivemos, nos 203 cromossomos analisados, dois casos de letais, com uma frequência de 0,98% (tabela 17, pag. 49), o que não discorda dos resultados obtidos por outros autores, como por exemplo, Dubinin (1946), Demerec (1948) e Wallace (1951).

Não encontramos na literatura dados sobre semi-letais, mas os nossos resultados mostram que a frequência desses genes na amostra da população examinada, também é baixa. Três casos foram detectados, com frequência de 1,48%.

Os demais cromossomos, num total de 198, enquadram-se entre os chamados quasenormais (Band, 1964), com uma frequência de 97,54% (tabela 18, pag. 51 e fig. 12, pag. 52).

4.2. Genes de viabilidade limitada ao sexo.

O efeito de genes limitados ao sexo feminino, constatado pela primeira vez em populações de Drosophila por Kerr e Kerr (1952), pôde ser comprovado pelo nosso trabalho e concorda com os achados de Kerr e Kerr (1952) e Drescher (1964).

A proporção entre fêmeas e machos portadores do mesmo cromossomo X, para um total de 192 cromossomos analisados, foi de 92,08 fêmeas para 100 machos, sendo que o nosso controle é de 110,08 fêmeas para 100 machos (pag. 44).

Os resultados obtidos por Kerr e Kerr de 97,66 fêmeas por 100 machos e por Drescher de 95,98 fêmeas por 100 machos são superiores ao nosso e isto pode ser explicado pela diversidade do método de trabalho que nós utilizamos em relação ao utilizado pelos dois pesquisadores, e a origem geo-

gráfica das amostras utilizadas, uma vez que utilizamos amostras do centro-sul do Brasil. Um teste de homogeneidade para as três amostras, isto é, a de Kerr e Kerr, a de Drescher e a nossa, foi realizado dando um χ^2 significativo ($\chi^2 = 10,127$ para 2 G.L.), sugerindo que as amostras podem pertencer a diferentes populações.

Os dados obtidos por Kerr e Kerr e Drescher e os nossos foram comparados isoladamente e mostram que entre as amostras de Kerr e Kerr e de Drescher, não ocorre diferença significativa ($\chi^2 = 2,557$ para 1° de liberdade), indicando que as amostras ou pertencem a uma mesma população ou foram analisadas com uma mesma metodologia. Em relação ao nosso resultado quando comparado com os de Kerr e Kerr e com os de Drescher, o teste de homogeneidade é altamente significativo ($\chi^2 = 10,141$ e $4,937$, para 1 G.L., respectivamente), indicando que a nossa metodologia permite detectar um maior número de genes deletérios. Evidentemente não podemos fugir à interpretação de que estamos lidando com populações geneticamente diferentes.

Para efeito de comparação, usaremos a mesma convenção utilizada por Drescher (1964, pag. 168), para caracterizar o efeito deletério limitado ao sexo. Drescher encontrou um letal completo, de cuja cultura nenhuma fêmea emergiu. Em nosso trabalho não foi detectado caso semelhante. Quanto aos cromossomos de efeito semi-letal, Drescher encontrou 3 casos com uma frequência de 1,28% e nós encontramos 4 casos com uma frequência de 2,1%. Os semi-letais são considerados aqueles cromossomos que produziram menos que 5% do número esperado de fêmeas homozigotas. Os sub-vitais, enquadrados entre os

cromossomos que produziram mais que 50% e menos que 75% do número esperado de fêmeas homozigotas. Drescher encontrou 10 casos de sub-vitais em 234 cromossomos analisados, ou seja, uma frequência de 4,27% e nós encontramos 25 casos da mesma natureza em 192 cromossomos, portanto, uma frequência de 13,02%.

Dados relativos a normais e super-normais não são apresentados por Drescher, mas podemos verificar que os restantes cromossomos X, subtraindo-se o letal, os semi-letais e os sub-vitais, apresentam uma frequência de 94,01%. Em ^{nosso} resultado temos, para o conjunto de normais e super-normais, uma frequência de 84,89% assim distribuídos: normais 75,52% e super-normais 9,37%.

Nota-se que a carga genética limitada ao sexo feminino, detectada por nós, é superior àquela detectada pelos autores que nos precederam, o que provavelmente indica que a nossa metodologia permite uma melhor avaliação desta variabilidade oculta nas populações naturais.

4.3. Esterilidade.

Os dados apresentados, no presente trabalho, revelam, também, que as populações aqui estudadas apresentam uma carga genética para esterilidade, afetando tanto machos como fêmeas.

Na geração F_3 , a frequência observada de machos estéreis foi de 7,39% para o total de 203 cromossomos X analisados, e, 20,21% para a esterilidade feminina em 138 cromossomos da geração F_4 . Essa diferença mostra-se estatisticamente significativa ($P < 0,001$) o que nos leva a supor que não



estamos lidando com os mesmos genes.

Os dados contidos nas tabelas 20 e 21 (pags. 59 e 61), revelam que a esterilidade tanto em machos como em fêmeas, abrange 1, 2 ou 3 réplicas de um mesmo cromossomo. Entre os machos obtivemos, em 203 cromossomos analisados, 9 casos ou 4,43%, em que uma das repetições apresentou esterilidade, 2 ou 0,98% em duas réplicas e 4 ou 1,97% nas três repetições. Em relação à esterilidade feminina, 28 casos ou 14,89% em uma repetição, 5 ou 2,66% em duas, e, finalmente, 5 ou 2,66% nas três repetições.

Esses resultados sugerem que o mecanismo de esterilidade que está afetando tanto machos como fêmeas não esteja relacionado somente ao cromossomo X, como esperávamos, pois teríamos, nêsse caso, esterilidade nas três repetições de um mesmo cromossomo. O Professor Doutor Luiz Edmundo de Magalhães sugeriu, para explicar a esterilidade nas fêmeas, que tal esterilidade fosse condicionada por um gene autossômico do estoque "Muller-5". Para pesquisar a validade desta hipótese, experimentos com a linhagem Muller-5 foram efetuados posteriormente, com o intuito de se conhecer a frequência de estéreis nesta população. Foram analisados 610 cruzamentos, dos quais, 202 para os machos e 408 para as fêmeas. A frequência de estéreis observada nesta amostra foi de 8,41% para os machos e 12,00% para as fêmeas.

Admitindo-se que a esterilidade necessariamente deve ser recessiva, e, chamando de q a frequência dêste gene, ou equivalente, na população, o seu valor corresponderia a 0,3464. Com base nesta frequência, $q = 0,3464$, deveríamos encontrar na geração F_3 fêmeas $XX-5$ estéreis, na proporção de 6%. e o resultado obtido foi de 0%. A frequência real na nossa po-



pulação deve ser inferior a 0,34. Isso é plausível, já que a amostra da população de Muller-5 utilizada neste teste, foi diferente daquela usada no trabalho inicial. A amostra de Muller-5 utilizada para os testes de esterilidade, nos foi fornecida pelo Professor Doutor Luiz Edmundo de Magalhães, pois que, o nosso estoque perdeu-se por razões técnicas, e a primeira nos foi trazida dos Estados Unidos pelo Professor Doutor Warwick Estevam Kerr.

Para explicarmos os resultados obtidos (tabela 21, pag. 61), a hipótese que melhor nos parece é aquela que admite: um gene determinador de esterilidade feminina, no cromossomo X, com frequência de 2,66% (ou equivalente de esterilidade com a mesma frequência), responsável pelos 5 casos nas três repetições, e um gene (ou equivalente de esterilidade) nos autossomos da linhagem Muller-5, com frequência ao redor de 17% (e não 34% como foi obtido na população de São Paulo).

Kerr e Kerr (1952) não apresentam o efeito da homozigose para estes cromossomos sobre a fertilidade das fêmeas e Drescher (1964) encontrou, 2,56% de fêmeas estéreis. Se admitirmos que nossos resultados de 2,66%, (em que as três réplicas apresentaram esterilidade feminina), correspondam somente à esterilidade causada pela homozigose de X, e compararmos esses resultados com os obtidos por Drescher, verificamos que são bem próximos, com $X^2 = 0,0036$ para 1 G.L..

Drescher (1964) considerou os genes para esterilidade como componentes da carga limitada ao sexo, com o que concordam os resultados por nós obtidos. Além disso, conforme Pavan e cols. (1951): "It is evident that physiological

mechanisms which produce female and male sterility are so different that genetic changes which cause both simultaneously are rare". Por outro lado, para Lindsley (1968) "The genetic system controlling spermatogenesis seems to be distinct from that controlling oogenesis; the evidence for this comes from studies of sterile mutants, the vast majority of which sterilize either males or females, but not both. This is not surprising considering the striking differences in the cellular events accompanying gametogenesis in the two sexes."

4.4 Valor adaptativo de $B w^a$.

O cálculo do valor adaptativo dos machos Muller-5 ($B w^a$), foi realizado tomando-se por base a viabilidade das fêmeas da geração F_5 , heterozigotas para o cromossomo X selvagem. Admitindo-se o valor 1 para a viabilidade destas fêmeas, os machos XY da geração F_5 apresentam um valor adaptativo igual a 0,9092. Este mesmo valor é atribuído aos machos XY de F_4 , o qual comparado ao de seus irmãos X^5Y , dá uma estimativa de 0,63. Este resultado obtido por nós é inferior àqueles encontrados por outros autores, que estudaram a viabilidade de B/Y .

Wright e Kerr (1954) encontraram um valor de 0,80, enquanto que Petit encontrou uma viabilidade de $0,68 \pm 0,12$ e Teissier mostra um valor de 0,67, ambos citados em Wright e Kerr.

Para explicar os resultados por nós obtidos, de 0,63, inferior aos demais, podemos admitir que ele não corresponda somente ao valor adaptativo de B/Y , mas também à influência de w^a (apricot) e das inversões que ocorrem no mes

mo cromossomo e que devem ser levadas em conta em relação a viabilidade dos machos Muller-5.

Drescher (1964) comparando a viabilidade dos machos Muller-5 com machos selvagens encontrou uma proporção de 66,50 machos X5Y para 100 XY. Os resultados de Kerr e Kerr (1952) nos mostram um valor de 71,60 machos X5Y para 100 XY e o nosso corresponde a 69,13 machos X5Y para 100 XY.



5. SUMÁRIO E CONCLUSÕES.

Foram estudados 203 cromossomos X de fêmeas de Drosophila melanogaster, coletadas em seu habitat natural, com o objetivo de detectar a carga genética.

Um método foi desenvolvido para a distinção entre fêmeas de Drosophila melanogaster e de Drosophila simulans, baseado em duas características morfológicas que são: largura de uma região da faceta e distribuição de pigmentos no 6º tergito abdominal.

O esquema de cruzamentos utilizado no presente trabalho, difere, em alguns detalhes, daqueles usados pelos autores que estudaram a carga genética limitada ao sexo feminino no cromossomo X, principalmente no que se refere ao material coletado na natureza, uma vez que nos servimos das fêmeas selvagens, e não dos machos. Isso permitiu-nos estudar cromossomos que ainda não sofreram a pressão da seleção natural, o que ocorre quando utilizamos machos.

O resultado da análise de 206.688 môscas, em 5 gerações, permitiu-nos chegar às seguintes conclusões:

A frequência de permuta genética observada entre os cromossomos X da linhagem Muller-5 e o X selvagem foi de 1,73% para a geração F_3 e de 1,35% para a geração F_4 .

Genes de viabilidade que afetam ambos os sexos foram detectados. A frequência de letais observada foi de 0,98%, a de semi-letais de 1,48% e sub-vitais de 23,64%. Os demais cromossomos, normais e super-normais, apresentaram uma frequência de 73,89%.

Foram também detectados genes para esterili-



dade masculina e feminina com frequências de 7,39% e 20,21% ; respectivamente. De acôrdo com os nossos dados os mecanismos que produzem a esterilidade masculina diferem daqueles que produzem a esterilidade feminina. Os irmãos das fêmeas estéreis, portanto carregando o mesmo X, não apresentam esterilidade.

O efeito de genes limitados ao sexo feminino pôde ser detectado e a proporção de fêmeas que carregam em homozigose o mesmo cromossomo X do macho foi de 92,08 fêmeas por 100 machos. Nenhum letal limitado ao sexo foi encontrado e a frequência de semi-letais observada foi de 2,1%. Entre os sub-vitais a frequência observada foi de 13,02% e os demais cromossomos, normais e super-normais, apresentaram uma frequência de 84,49%.

Os dados mostram também, a baixa viabilidade de Bw^a , com valor adaptativo de 0,63.



6. AGRADECIMENTOS.

Desejo manifestar minha gratidão a todos aqueles, pessoas e instituições, que contribuíram para a realização deste trabalho:

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, meu orientador e amigo, pela atenção e interesse com que acompanhou minha pesquisa, procurando sempre me incentivar para que esta se concretizasse.

Ao Prof. Dr. Michel Pedro Sawaya, Diretor desta Faculdade, que colocou à minha disposição os recursos necessários para a realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Celso Abbade Mourão, meu sincero amigo, pela oportunidade de, neste Departamento, ter iniciado minha vida científica, pela colaboração e estímulo que concorreram decisivamente para o desenvolvimento deste trabalho.

A Prof^a Dr^a Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, companheira de Departamento, pelas sugestões e estímulo com que sempre me distinguiu.

A minha esposa Carmelisa Terra Gallo, pela sua compreensão, estímulo e colaboração em diversas etapas desta pesquisa.

Ao Prof. Carlos Funari Prósperi que acompanhou com amizade e interesse o desenvolvimento deste trabalho, colaborando decisivamente na parte estatística.

Ao Prof. Dr. Luiz Edmundo de Magalhães pelas valiosas sugestões apresentadas e por ter cedido parte das máquinas utilizadas nesta pesquisa.



Aos meus amigos e funcionários do Departamento de Biologia Geral, desta Faculdade, Srt^a Elza Silva, Valeriano Macias Neto, João Roberto Domingues e Srt^a Delalande de Almeida Nascimento, que muito concorreram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Dino Vizzoto que enviou-me da Universidade do Texas algumas separatas de trabalhos científicos, necessários à realização desta pesquisa.

Ao Sr. Edson Ferreira da Silva pela confecção dos gráficos aqui apresentados.

Ao Sr. José Cúrtolo pela execução da parte datilográfica.

Aos funcionários da Faculdade de Filosofia, que sempre me distinguiram com sua dedicação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, (FAPESP), pelo auxílio concedido durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Sociedade Brasileira de Genética (SBG), na pessoa de seu então Presidente Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, pelo auxílio concedido, facilitando meu contáto com seu Laboratório em Ribeirão Preto.

A todos aqueles que integram o Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que me acolheram durante a minha estada naquele local.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ALLEN, A. C., 1964. Lethal frequencies for the second and third chromosomes in populations of Drosophila melanogaster. Genetics, 50: 232 (Abst.).
- BAND, H. T. and P. T. IVES, 1963. Genetic structure of populations. I. On the nature of the genetic load in the South Amherst population of Drosophila melanogaster. Evolution, 17: 198 - 215.
- BAND, H. T., 1964. Genetic structure of population. III. Natural selection and concealed genetic variability in a natural population of Drosophila melanogaster. Evolution, 18: 334-404.
- BRIDGES, C. B. and K. S. PREHLE, 1944. The mutants of Drosophila melanogaster. Carnegie Institution of Washington 552, 257 pp; Second Printing, 1950.
- CAVALCANTI, A. G. L., 1950. Contribuição à genética das populações naturais: análise dos gens autossômicos recessivos dos cromossomos II e III de Drosophila prosaltans Duda. Tese de Concurso à Cátedra. Dep. de Imp. Nacional, 1-90.
- CORDEIRO, A. R., 1954. Viabilidade de heterozigotos e a dinâmica das populações naturais de Drosophila willis-toni. Inst. de Ciênc. Natur., U.R.G. do Sul, Bol. 1: 1-54.
- DA CUNHA, A. B., 1953. Chromosomal inversions with sex-limited effects. Nature, 172: 815-816.
- DA CUNHA, A. B., 1957. Contribuição ao estudo da adaptação das populações de Drosophila (Diptera) a diferentes le-

- vedos. Bol. Fac. Fil., Ciên. e Letr. nº 220, Biologia Geral, 10: 1-56.
- DA CUNHA, A. B., J.S. de TOLEDO, C. Pavan, H. L. de SOUZA, H. E. MELARA, N. GABRUSEWYCZ, M. R. GAMA, H. L. P. de CAMARGO and L. C. de MELO, 1959. A comparative analysis of the effects of natural and of radiation-induced lethals in heterozygous individuals and of their frequencies in natural populations of Drosophila willistoni. Biological Sciences, 2: 359-363.
- DAWOOD, M. M., 1961. The genetic load in the second chromosomes of some populations of Drosophila melanogaster in Egypt. Genetics, 46: 239-246.
- DEMEREK, H., 1948. Induction of Mutations in Drosophila by Dibenzanthracene. Genetics, 33: 337-348.
- DOBZHANSKY, Th. and H. L. QUEAL, 1938. Genetics of Natural Populations. II. Genic Variation in Populations of Drosophila pseudoobscura inhabiting isolated Mountain Ranges. Genetics, 23: 463-484.
- DOBZHANSKY, Th., 1939. Experimental studies of freelifving populations of Drosophila. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 14: 339-368.
- DOBZHANSKY, Th., A. M. HOLZ and B. SPASSKY, 1942. Genetics of natural populations. VIII. Concealed variability in the second and the fourth chromosome of D. pseudoobscura and its bearing on the problem of heterosis. Genetics, 27: 463-490.
- DOBZHANSKY, Th., 1951. Genetics and the Origin of Species. Columbia University Press, New York; 3rd. ed.

- DOBZHANSKY, Th. and B. SPASSKY, 1953. Genetics of natural populations. XXI. Concealed variability in two sympatric species of Drosophila. Genetics, 38: 471-484.
- DOBZHANSKY, Th. and B. SPASSKY, 1954. Genetics of natural populations. XXII. A comparison of the concealed variability in Drosophila prosaltans with that in other species. Genetics, 39: 472-487.
- DOBZHANSKY, Th., 1957. Genetics loads in natural populations. Science, 126: 191-194.
- DOBZHANSKY, Th., B. SPASSKY and T. TIDWELL, 1963. Genetics of natural populations. XXXII. Inbreeding and mutational and balanced genetics loads in natural populations of Drosophila pseudoobscura. Genetics, 48: 361-373.
- DOBZHANSKY, Th. and B. SPASSKY, 1963. Genetics of natural populations. XXXIV. Adaptative norm, genetic load and genetic elite in Drosophila pseudoobscura. Genetics, 48: 1467-1486.
- DRESCHER, W., 1964. The sex limited genetic load in natural populations of Drosophila melanogaster. Am. Naturalist, 98: 167-171.
- DUBININ, N. P., 1946. On lethal mutations in natural populations. Genetics, 31: 21-38.
- GREENBERG, R. and J. F. CROW, 1960. A comparison of effect of lethal and detrimental chromosomes from Drosophila populations. Genetics, 45: 1153-1168.
- HILDRETH, P. E., 1955. A test for recombinational lethals in the X chromosomes of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 41: 20-24.

- HIRAIZUMI, Y. and J. F. CROW, 1960. Heterozygous effects on viability, fertility, rate of development, and longevity of Drosophila chromosomes that are lethal when homozygous. *Genetics*, 45: 1071-1083.
- HOENIGSBERG, H. F. and U. G. de NAVAS, 1965. Populations Genetics in the American Tropics. I. Concealed recessives in different bioclimatic regions. *Evolution*, 19: 506-513.
- IVES, P.T., 1945. The genetic structure of American populations of Drosophila melanogaster. *Genetics*, 30: 167-196.
- IVES, P. T., 1954. Genetics change in American populations of Drosophila melanogaster. *P.N.A.S.*, 40: 37-92.
- KERR, W. E., 1951. Bases para o estudo da genética de populações dos Hymenoptera em geral e dos Apinae sociais em particular. *An. E. S. A. "Luiz de Queiróz"*, 8: 219-359.
- KERR, W. E. and L. KERR, 1952. Concealed variability in the X-chromosome of Drosophila melanogaster. *Am. Naturalist*, 86: 405-407.
- KERR, W. E. and H. H. LAIDLAW Jr., 1956. General Genetics of bees. *Advances in Genetics*, 8: 109-148.
- KERR, W. E., 1969a. Genética e Melhoramento de abelhas. Ed. no livro "Melhoramento e Genética". Editôra Melhoramentos, São Paulo.
- KERR, W. E., 1969b. Aspects of the evolution of social bees. *Evolutionary Biology*, 3: 111-167.
- LINDSLEY, D. D. and E. H. GRELL, 1967. Guide to Genetic Variation of Drosophila melanogaster. Carnegie Institution of Washington Publication, 627; 471 pp.

LINDSLEY, D. L., 1968. Nuclear function during gametogenesis. International Symposium of Nuclear Physiology and Differentiation. Belo Horizonte; Minas Gerais, Brasil. December 1st to 6th, 1968: 45.

MAGALHÃES, L. E., A. B. da CUNHA, J. S. de TOLEDO, S. A. TOLEDO F^o, H. L. de SOUZA, H. J. TARGA, V. SETZER and C. PAVAN, 1965. On lethals and their suppressors in experimental populations of Drosophila willistoni.

MAGALHÃES, L. E. de, J. S. de TOLEDO and A. B. da CUNHA, 1965. The nature of lethals in Drosophila willistoni. Genetics, 52: 599-608.

MULLER, H. J., 1928. The problem of genic modification. Suppl. Bd. I des Zeit. f. ind. Abst. u. Vererb.: 234-260. Republicado em "Studies in Genetics by H. J. Muller, Second printing, 1964: 252-276. Copyright 1962 by Indiana University Press. Library of Congress Catalog Card nº 62-8976.

MULLER, H. J., I. H. IERSKOWITZ, S. ABRAHAMSON and I. I. OSTER, 1954. A non linear relation between X-ray dose and recovered lethal mutations in Drosophila. Genetics, 39: 741-749.

PATTERSON, J. T., 1943. Studies in the Genetics of Drosophila. III. The Drosophilidae of the Southwest. Fluctuations in the Population of Drosophila. Univ. Texas Pub., 4313: 203-216.

PATTERSON, J. T. and R. P. WAGNER, 1943. Studies in the Genetics of Drosophila. III. The Drosophilidae of the Southwest. Geographical Description of Species



- of the Genus Drosophila in the United States and Mexico. Univ. Texas Pub., 4313: 217-231.
- PATTERSON, J. T. and W. S. STONE, 1952. Evolution in the genus Drosophila. New York, Macmillan: 610 pp.
- PAVAN, C., A. R. CORDEIRO, Th. DOBZHANSKY, N. DOBZHANSKY, C. MALOGOLWIKIN, B. SPASSKY and M. WEDEL, 1951. Concealed genic variability in brasilian populations of Drosophila willistoni. Genetics, 36: 13-30.
- PAVAN, C., 1959. Relações entre populações naturais de Drosophila e o meio ambiente. Bol. Fac. Filos. Ciênc. e Letras, USP, 221; Biol Geral, 11: 1-81.
- ROTHENBUHLER, W. C., J. M. KULINČVIC and W. E. KERR, 1968. Bee Genetics. Annual Review of Genetics, 2: 413-438.
- SALLES, H., 1948. Sobre a genitália dos Drosofilídeos (Diptera): I. Drosophila melanogaster e D. simulans. Summa Brasiliensis Biologiae, 1: 311-383.
- SPASSKY, B., N. SPASSKY, O. PAVLOVSKI, M. G. KRIMBAS, C. KRIMBAS and Th. DOBZHANSKY, 1960. Genetics of Natural Populations. XXIX. The magnitude of the genetic load in populations of Drosophila pseudoobscura. Genetics, 45: 723-740.
- SPENCER, W. P., 1947. Mutations in wild populations in Drosophila. Advances in Genetics, 1: 359-402.
- STERN, C., G. CARSON, M. KINST, E. NOVITSKI and D. UPHOFF, 1952. The viability of heterozygous for lethals. Genetics, 37: 413-449.
- STURTEVANT, A. H., 1919. A new species closely resembling Drosophila melanogaster. Psyche, 26: 153-155.

- STURTEVANT, A. H., 1937. Autosomal lethals in wild populations of Drosophila pseudoobscura. Biological Bulletin, 73: 542-551.
- TOLEDO F^a, S. A., 1963. Verificação preliminar sôbre a frequência de gens letais em populações de Drosophila willistoni que vivem em regiões de alto nível de radiação. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 35: 103-107.
- WALLACE, B., 1951. Genetics changes within populations after X-Irradiation. Genetics, 36: 612-628.
- WALLACE, B. and C. MADDEN, 1953. The frequencies of sub- and supervitals in experimental populations of Drosophila melanogaster. Genetics, 38: 456-470.
- WALLACE, B., 1956. Studies on irradiated populations of Drosophila melanogaster. J. Genet., 54: 280-293.
- WRIGHT, S. and W. E. KERR, 1954. Experimental studies of the distribution of gene frequencies in very small populations of Drosophila melanogaster. II. Bar. Evolution, 8: 225-240.

