

Marcelo Ferreira Lourenço

**Efeitos de Variantes Moleculares da
Esterase - 8 Sobre o Valor Adaptativo
de *Drosophila* Mulleri**



Marcelo Ferreira Lourenço

**Efeitos de variantes moleculares da esterase-8 sobre o
valor adaptativo de *Drosophila mulleri***



907/00

Tese apresentada para obtenção
do Grau de Doutor em Ciências
Biológicas-Genética.

ja xerocado

São José do Rio Preto - SP
2000

A minha esposa, Sheila, cujo apoio, carinho, estímulo, paciência e compreensão possibilitaram a realização deste trabalho.

A nossa filha, Marcela, motivo de muita alegria e verdadeiro amor, que já nos seus primeiros meses de vida tem nos trazido momentos inesquecíveis.

Orientação: *Profa. Dra. Cláudia Márcia A. Carareto*

Dedico...

Co-orientação: *Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron*

À minha esposa, **Sheila**, cujo apoio, carinho, estímulo, paciência e compreensão possibilitaram a realização deste trabalho.

À nossa filha, **Marcela**, motivo de muita alegria e

À minha esposa, **Sheila**, cujo apoio, carinho, estímulo, paciência e compreensão possibilitaram a realização deste trabalho.

À nossa filha, **Marcela**, motivo de muita alegria e verdadeiro amor, que já nos seus primeiros meses de vida tem nos trazido momentos inesquecíveis, acompanhados de esperança, paz e satisfação.

Dedico...

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Exterasse	3
I.2. Fatores responsáveis pela manutenção dos polimorfismos nas populações	6
I.3. Estudo dos polimorfismos em populações experimentais	14
I.4. Efeito dos polimorfismos em populações naturais	19
I.5. Objetivos	22

II. MATERIAL Para a realização do presente trabalho foram utilizados o **Laboratório de Populações de *Drosophila***, do Departamento de Biologia e, o **Laboratório de Genética Bioquímica**, do Departamento de Química e Geociências, ambos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP, com o auxílio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), da Fundação de Amparo à Pesquisa da UNESP (FUNDUNESP) e da Fundação Educacional de Votuporanga (FEV)..

II.5. Estudo de produtividade	28
II.7. Estudo dos tempos de desenvolvimento	29
II.8. Estudo de viabilidade	29
II.9. Estudo das frequências gênicas e genotípicas em descendentes de intra-cruzamentos dos heterozigotos	30
II.10. Análise estatística	30

III. RESULTADOS	36
III.1. Análise das populações experimentais	36
A. Frequências gênicas e genotípicas	38



SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Esterases	3
I.2. Fatores responsáveis pela manutenção dos polimorfismos nas populações	6
I.3. Estudo dos polimorfismos em populações experimentais	14
I.4. Estudo dos polimorfismos em populações naturais	19
I.5. Objetivos	22
II. MATERIAL E MÉTODOS	23
II.1. Obtenção e manutenção dos genótipos	23
II.2. Obtenção dos híbridos	24
II.3. Estudo das freqüências gênicas e genotípicas em populações experimentais	24
II.4. Eletroforese	26
II.5. Estudo da longevidade	27
II.6. Estudo da produtividade	28
II.7. Estudo dos tempos de desenvolvimento	29
II.8. Estudo da viabilidade	29
II.9. Estudo das freqüências gênicas e genotípicas em descendentes de intra-cruzamentos dos heterozigotos	30
II.10. Análise estatística	30
III. RESULTADOS	36
III.1. Análise das populações experimentais	36
A. Freqüências gênicas e genotípicas	36



B. Valor adaptativo líquido das populações.....	48
C. Análise de dependência.....	56
D. Análise das Cadeias de Markov.....	64
E. Análise de Tendência Linear de Séries Temporais.....	70
III.2. Componentes do valor adaptativo.....	77
A. Longevidade.....	77
B. Produtividade.....	82
C. Viabilidade.....	90
D. Tempos de desenvolvimento.....	93
E. Estimativa do valor adaptativo.....	97
III.3. Frequências genotópicas e gênicas na descendência de cruzamentos individuais entre heterozigotos.....	100
III.4. Alterações nas frequências gênicas e genotípicas em populações.....	104
A. Simulação segundo os valores adaptativos.....	104
B. Comparações entre as frequências do alelo Est^s observadas experimentalmente e os modelos simulados.....	107
III.5. Análise das frequências gênicas e genotípicas nas populações em estoque.....	120
IV. DISCUSSÃO.....	122
V. RESUMO E CONCLUSÕES.....	141
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	145
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	150
VIII. APÊNDICE.....	159
IX. AGRADECIMENTOS.....	161

I. INTRODUÇÃO

O grupo *repleta* do gênero *Drosophila* foi formalmente proposto por Sturtevant (1942), com base em algumas características morfológicas, principalmente relativas à cor escura das moscas e ao fato de que cada cerda do *mesonotum* origina-se de uma mancha marrom ou preta. Inicialmente, Patterson (1943) dividiu este grupo em três subgrupos (*hydei*, *repleta* e *mulleri*) e, logo depois, Wharton (1944) adicionou o quarto subgrupo (*mercatorum*). Baseando-se em resultados cito e morfológicos, Wasserman (1962) acrescentou o quinto subgrupo (*fasciola*). Atualmente este grupo compreende cerca de 80 espécies distribuídas nos cinco subgrupos, segundo Vilela (1983), da seguinte maneira: *fasciola* (18 espécies); *hydei* (6 espécies); *mercatorum* (quatro espécies); *mulleri* (38 espécies); e, *repleta* (seis espécies). As espécies restantes não pertencem a nenhum subgrupo formalmente descrito.

A maioria das espécies do grupo *repleta*, principalmente as do subgrupo *mulleri*, são cactofílicas na fase larval, o que as associa amplamente às regiões de clima relativamente mais seco, onde estes vegetais são mais abundantes. Entretanto, não se tem conhecimento de alguma citação a respeito de um comportamento verdadeiramente monófago, embora exista uma forte associação entre *D. mulleri* com a cactácea *Opuntia lindheimeri* (Kircher & Al-Azawi, 1985). A distribuição geográfica desta espécie foi assinalada por Wasserman (1982) apenas para os Estados Unidos, México e Índias Ocidentais (Jamaica, Cuba e Haiti). Entretanto, segundo Tsacas *et al.* (1981), outras espécies deste subgrupo ocorrem nas regiões Afrotropical, Paleártica, Neotropical e Australiana. As espécies do subgrupo *mulleri*, também mencionadas como "complexo *mulleri*", têm sido utilizadas em diversos estudos genéticos e evolutivos, principalmente devido a alguns fatores como o grande número de espécies

críticas e o alto grau de polimorfismo existente entre populações de uma mesma espécie (referências em Vilela, 1983; Ceron, 1988).

Dentre as várias maneiras de se estudar a biologia evolutiva de um organismo deve-se citar aquelas que buscam entender a adaptação deste ao seu ambiente, bem como, de que maneira a seleção natural atua na manutenção de características relativamente mais adaptativas, em dado momento e local, em detrimento daquelas que reduzem sua possibilidade de sobrevivência e reprodução, ou seja, promovem um menor valor adaptativo.

Segundo Dobzhansky (1973), valor adaptativo ou aptidão Darwiniana refere-se à taxa de transmissão de genes de uma geração a outra, ou seja, é a eficiência reprodutiva de um determinado genótipo, de um grupo de indivíduos ou de uma população. O valor adaptativo é uma medida relativa a partir da contribuição que os portadores de um genótipo fazem para o conjunto gênico da geração seguinte, em relação às contribuições de todos os outros genótipos. No nível individual, o valor adaptativo pode ser entendido como o resultado final de todos os processos fisiológicos e do desenvolvimento e, as diferenças entre indivíduos podem ser comparadas a partir do estudo de componentes mensuráveis como, por exemplo, a fecundidade, o tempo de desenvolvimento, a longevidade, entre outros, como demonstrado por Carareto & Mourão (1991a,b; 1992).

Avaliar de maneira global o valor adaptativo ainda é um passo não adequadamente atingido pelas condições metodológicas atuais. Assim, vários autores estudaram separadamente algumas características morfológicas, fisiológicas, etológicas e desenvolvimentais, sabidamente importantes para a biologia do organismo, na tentativa de fracionar o valor adaptativo total em componentes mensuráveis. Deste modo, torna-se possível pela composição destes últimos, avaliar-se uma porção considerável do todo, ou seja, do valor adaptativo total.

Segundo Carareto (1989), são abundantes os trabalhos que visam quantificar o valor adaptativo utilizando-se o gênero *Drosophila* mas, na maioria deles, são focalizados apenas poucos componentes do ciclo biológico, geralmente a fecundidade, a fertilidade e a viabilidade (e.g. Simmons *et al.*, 1980; Brittnacher, 1981; Mueller & Ayala, 1981; Rose 1983; Yamazaki & Hirose, 1984), o que poderia acarretar erros de interpretação. Esta mesma autora avaliou, em dois trabalhos distintos, 23 e 28 componentes do valor adaptativo total, respectivamente em *D. prosaltans* (Carareto & Mourão, 1991a,b) e *D. sturtevantii* (Carareto & Mourão, 1992). No primeiro, foram medidos componentes relativos à atividade sexual, à longevidade, à produtividade e ao



tempo de desenvolvimento de três linhagens geográficas de *D. prosaltans*, originando resultados que evidenciaram diferenças significativas nos componentes entre as linhagens. Além disso, os resultados mostraram que cada componente possuía diferentes contribuições para a composição do valor adaptativo total, sendo alguns mais importantes que os outros e, de maneira diferente, de acordo com a linhagem.

No segundo estudo, utilizando-se de quatro linhagens geográficas de *D. sturtevantii* com arranjos cromossômicos diferentes, bem como de seus híbridos, Carareto & Mourão (1992) observaram que alguns componentes contribuem mais fortemente para a composição do valor adaptativo total. Além disso, os componentes diferiram quanto à sua importância relativa de acordo com a linhagem, bem como, de acordo com a origem dos quatro arranjos cromossômicos (materna ou paterna), as importâncias dos componentes da progênie híbrida também diferiram. De maneira geral, destacaram-se como mais importantes os tempos de pré-cópula e de cópula, o número e a biomassa de machos, o tempo de desenvolvimento pupa-imago e a duração da emergência de imagos. Estes autores desenvolveram métodos matemáticos para avaliar as importâncias relativas de certos componentes na composição do valor adaptativo total, que podem ser usados no estudo das diferenças adaptativas entre genótipos de linhagens que diferem desde o nível alélico até o cromossômico.

Segundo Futuyma (1992), uma questão ainda importante na genética de populações é se as variantes genéticas diferem em valor adaptativo, sendo assim matéria prima para a adaptação a novos regimes seletivos ou se a maior parte da variabilidade genética encontrada nas populações é seletivamente neutra, e desta maneira, irrelevante para a capacidade de uma população responder a novas forças de seleção.

I.1. Esterases

As isoenzimas, ou isozimas, podem ser definidas segundo a Comissão de Nomenclatura Bioquímica da IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry), de 1977, como "múltiplas formas de uma enzima que ocorrem dentro de uma única espécie, como resultado da presença de mais de um gene estrutural". A origem destas enzimas pode ser atribuída à presença de mais de um loco gênico ou de mais de um alelo em um mesmo loco.



Assim, em ambos os casos os produtos gênicos são diferentes e, no último em particular, as formas enzimáticas podem ser chamadas de aloenzimas (ou aloenzimas). Esta classe de isoenzimas é a responsável pelos polimorfismos enzimáticos observados em populações naturais.

As aloenzimas apresentam, então, diferentes padrões de mobilidade eletroforética resultantes de diferenças alélicas e têm se constituído em excelente material para o estudo da questão da adaptabilidade ou neutralidade dos polimorfismos, pois suas propriedades diferem entre populações e entre espécies que habitam diferentes ambientes (Somero, 1978). Dentre as aloenzimas estudadas, a álcool desidrogenase (ADH) e as esterases (EST) têm merecido destaque. Por exemplo, existe em *D. melanogaster* um polimorfismo em relação à ADH, que apresenta dois alelos eletroforeticamente distintos (Adh^F e Adh^S) diferindo somente na posição de um nucleotídeo, que determina a diferença de um único aminoácido entre as duas aloenzimas (Kreitman, 1983). Parece que a seleção tem sido suficientemente rígida para eliminar outras substituições de nucleotídeos que alterariam a seqüência de aminoácidos, mas manteve um sítio polimórfico. Ou essa substituição de aminoácidos é a única que não altera a função da molécula e é, portanto neutra - o que parece improvável - ou a seleção mantém ambos os alelos. Van Delden (1982) demonstrou que as freqüências destas duas formas alélicas variam gradualmente de acordo com a latitude em diferentes continentes.

As esterases compreendem um grupo multifuncional e heterogêneo de enzimas que participam da hidrólise de ésteres e outros compostos. Nos insetos, estas enzimas estão envolvidas em vários processos metabólicos, incluindo a digestão, a degradação de inseticidas organofosforados e carbamatos, bem como, a degradação de feromônios e do hormônio juvenil (Kort & Granger, 1981; Spackman *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1994; Rauschenbach *et al.*, 1994).

O envolvimento das esterases com o metabolismo do hormônio juvenil é um aspecto importantíssimo da bioquímica e fisiologia dos insetos. Nos insetos holometábolos, os níveis deste hormônio sintetizado pela *corpora allata* são regulados através da ação de esterases específicas denominadas de esterases do hormônio juvenil. Estas enzimas são sintetizadas precisamente no final da fase larval e têm como função a hidrólise do grupo metil-éster deste hormônio, cujo papel regulador pode ser visto no final da fase larval, culminando na produção de pupas (*cf.* Rits, 1997). Além disso, estas enzimas estão relacionadas a processos digestivos (Jones & Brancoft, 1986; Argentine & James, 1995) e à biologia reprodutiva de algumas

espécies de *Drosophila* (Johnson *et al.*, 1968; Kambisellis *et al.*, 1968; Carrasco *et al.*, 1984; Ceron, 1988; Mane *et al.*, 1983; Scott, 1986; Scott & Richmond, 1987).

A respeito da atividade esterásica na fisiologia digestiva de insetos, os resultados obtidos por Jones & Brancroft (1986) sugerem que a esterase-4 do lepidóptero *Anthonomus grandis* tenha um papel fundamental na degradação dos alimentos ingeridos pelos indivíduos adultos pois esta enzima foi detectada no intestino e não em outros tecidos, como túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, testículos e ovários. Já, Argentine & James (1995), trabalhando com o díptero *Aedes aegypti*, após verificarem a presença de uma esterase específica da glândula salivar de indivíduos adultos, sugeriram a possibilidade de associação desta enzima com a alimentação de açúcares destes insetos. Todavia, uma outra enzima com atividade esterásica foi encontrada apenas nas glândulas salivares de fêmeas adultas, o que pode estar relacionado com a hematofagia característica deste sexo.

As esterases relacionam-se também com a biologia reprodutiva de algumas espécies de *Drosophila*, como as sistematicamente próximas *D. melanogaster*, *D. simulans* e *D. mauritiana*, estudadas por Karotan & Oakeshott (1993). Estes autores observaram níveis aumentados desta enzima nos ductos espermáticos de machos. Além disso, segundo Mane *et al.* (1983), a esterase-6 é um dos componentes do líquido seminal dos machos de *D. melanogaster* capaz de hidrolisar, nos conductos reprodutivos das fêmeas, o cis-vacênil-acetato, que é um éster lipídico sintetizado apenas nos testículos, produzindo o cis-vacênol.

A esterase-6 é transferida para as fêmeas durante os três primeiros minutos de cópula (Richmond & Senior, 1981), e seu substrato (cis-vacênil-acetato) a partir do quinto minuto (Scott & Richmond, 1987), promovendo um decréscimo na receptividade para um novo acasalamento, como observado por Scott (1986). Scott & Richmond (*op.cit.*) trataram topicamente fêmeas virgens com o substrato cis-vacênil-acetato e com o produto vacênol e observaram uma redução no número de acasalamentos. Desta forma, estas moléculas foram consideradas agentes antiafrodisíacos, pois reduzem a frequência de corte e as chances de acasalamentos subseqüentes.

Em estudos que utilizaram outras espécies de *Drosophila*, como *D. aldrichi* (Johnson *et al.*, 1968; Kambysellis *et al.*, 1968), *D. dunni* (Carrasco *et al.*, 1984), *D. arizonae* e *D. mulleri* (Ceron, 1988), também foram encontradas esterases específicas do sexo masculino, que podem estar relacionadas com a biologia reprodutiva. Além disso, este último autor encontrou uma α -esterase (EST-7) exclusiva



de fêmeas em *D. arizonae*, evidenciando que muito ainda deve ser feito para que se possa conhecer mais acerca desta classe de enzimas, que parecem ser de suma importância aos organismos, já que ocorrem em diversas fases do desenvolvimento e em diversos tecidos, além dos aspectos fisiológicos já discutidos.

Estudos que visam detectar uma grande parcela da atividade esterásica em insetos podem certamente contribuir para um entendimento mais completo destas enzimas, do ponto de vista genético. Entre estes trabalhos devem ser citados os de Ceron (1988), com *D. mulleri* e *D. arizonae*, de Lima-Catelani (1996), com *Aedes aegypti* e *A. albopictus*, de Rits (1997), de Castiglioni-Ruiz (1997), com *Hematobia irritans*, com *Megaselia scalaris* e de Lapenta (1998), com um grupo de espécies próximas a *D. serido*. Ceron (1988), por exemplo, avaliou o padrão de esterases no desenvolvimento de *D. mulleri*, *D. arizonae* e de seus híbridos, constatando oito prováveis locos gênicos nas fêmeas e dez nos machos, responsáveis pela síntese dessas enzimas nas duas espécies, sendo seis deles homólogos em ambas. Além disso, este autor encontrou um polimorfismo no loco da β -esterase-8, na forma de duas variantes com diferentes velocidades de migração, observando que a frequência do alelo *Est-8^S* (do inglês "slow": migração lenta) nas populações experimentais estudadas era de aproximadamente 70%, contra 30% do alelo *Est-8^F* (de "fast": migração rápida).

II.2. Fatores responsáveis pela manutenção dos polimorfismos nas populações

Apesar de atualmente ser bem conhecida a variabilidade alélica de muitos locos enzimáticos de *Drosophila*, ainda existe controvérsia acerca de qual fração desta variabilidade é adaptativa, ou seja, alvo da seleção natural, e qual quantidade é seletivamente neutra. Kimura (1983) propôs que a evolução fenotípica é regida basicamente pela seleção normalizadora e, a evolução molecular, pela pressão de mutação e pela deriva genética. Estas afirmações vêm de encontro àquelas adaptacionistas (Lewontin, 1974), que propõem a manutenção ou eliminação de certas variantes moleculares como resultado da pressão de seleção, atuando sobre a variabilidade, a herdabilidade e a adaptabilidade diferencial.

Segundo Carareto (1989), uma questão que surgiu nas últimas décadas, iniciada pelos trabalhos pioneiros de Harris (1966), Hubby & Lewontin (1966) e



Lewontin & Hubby (1966) é se a imensa quantidade de variação genética em proteínas, detectada por eletroforese, reflete adaptação diferencial. Para os neutralistas, a maioria das variantes genéticas moleculares, especialmente para as enzimas, não diferem em valor adaptativo, e a variação genética observada na forma de polimorfismos é, portanto, irrelevante para a habilidade da população responder à seleção.

Os polimorfismos podem ser definidos segundo vários níveis de abordagem que vão desde o molecular até o fenotípico e, freqüentemente, este termo refere-se à existência de dois ou mais genótipos diferentes, dentro de uma mesma população, para uma mesma característica fenotípica. Considera-se como polimórfico um determinado loco gênico que possua mais de uma seqüência codificadora diferente. Muitas vezes, os resultados destas diferentes seqüências podem não ser visualizados fenotipicamente, principalmente em se tratando de enzimas que mantenham íntegra a sua atividade original ou, ainda, quando a alteração na seqüência do DNA tenha ocorrido em regiões não transcritas ou que serão eliminadas durante o processamento do RNA mensageiro, como os introns. Além disso, algumas alterações na codificação de regiões transcritas e importantes para a síntese da proteína, como os exons, ocorrem em bases nitrogenadas que não alteram o aminoácido que deverá ser introduzido no peptídeo em formação, como por exemplo, substituições na terceira base da trinca de nucleotídeos do codon (Ridley, 1996).

Quando alelos de dois ou mais locos são combinados independentemente, ou seja, quando as freqüências dos gametas são probabilisticamente esperadas, diz-se que os locos encontram-se em equilíbrio de ligação. Por exemplo, um indivíduo heterozigoto para dois locos produziria quatro gametas diferentes, ou melhor ainda, quatro haplótipos diferentes seriam segregados para a próxima geração com iguais freqüências. Assim, da mesma forma que em cromossomos diferentes, genes não-ligados são mantidos em equilíbrio de ligação por estarem suficientemente distantes em um mesmo cromossomo.

Segundo Wills (1981) e Futuyma (1992), entre outros autores, o problema mais sério para determinar se a seleção atua ou não no loco de uma enzima é que se torna extremamente difícil excluir a possibilidade de que o loco esteja em desequilíbrio de ligação com locos proximamente localizados, os quais seriam o objeto real da seleção. O desequilíbrio de ligação resulta da associação não casual entre alelos de diferentes locos. Diversos autores observaram que a heterozigose aloenzimática é perdida mais vagarosamente em populações experimentais mantidas em ambientes

heterogêneos. Alguns genes são completamente afetados pela variação no ambiente experimental, mas não necessariamente os locos das enzimas que estão sendo estudadas. Este último autor utiliza como exemplo as variações de frequências com a latitude de um alelo no loco da lactato-desidrogenase em uma carpa (Meritt, 1972, *apud* Futuyma, 1992) e em um peixe não-aparentado (Place & Powers, 1979, *apud* Futuyma, 1992). Ainda, complementa que embora a variação alélica possa estar relacionada com a variação da temperatura, não explica de maneira suficiente sua natureza adaptativa, embora estudos bioquímicos mostraram que a aloenzima mais freqüente ao norte apresenta maior atividade a baixas temperaturas do que a variante freqüente ao sul.

Apesar de desequilíbrios de ligação constituírem uma questão relevante neste tipo de estudo, não devem ser considerados como um fator que comprometa o planejamento de estudos de variabilidade aloenzimática. Segundo Langley (1977), existe um número muito grande de locos gênicos em populações naturais de *D. melanogaster* em equilíbrio de ligação, mesmo sendo detectável um certo desequilíbrio devido ao excesso gamético, em locos muito ligados.

Várias abordagens têm sido utilizadas para avaliar se a seleção atua ou não sobre variantes aloenzimáticas, especialmente para estudos utilizando *Drosophila* como organismo experimental. Uma delas é medir a viabilidade ou outros componentes do valor adaptativo de indivíduos portadores de diferentes variantes enzimáticas. Para minimizar o problema de que locos vizinhos sejam responsáveis por diferenças no valor adaptativo e assegurar que a seleção seja detectada, Wills (1981), propõe que uma pressão seletiva específica para o loco em estudo seja aplicada aos organismos. Se uma enzima em particular está sendo estudada, o excesso de seu substrato ou de um análogo no meio de cultura, proporciona a pressão seletiva adequada. A segunda condição, de acordo com o autor, é que os indivíduos tenham sido endocruzados, de modo a reduzir o efeito da heterozigose do *background* genético.

Outra abordagem experimental tem sido iniciar réplicas de populações experimentais com diferentes frequências alélicas. Desta maneira, é possível verificar se, no curso das gerações, as réplicas convergem para a frequência alélica de equilíbrio determinado pela seleção. Bijlsma-Meeles & Van Delden (1974) observaram a ação da seleção balanceada em populações experimentais de *D. melanogaster*, quanto a dois alelos da álcool desidrogenase (também denominados Adh^S e Adh^F , segundo sua mobilidade eletroforética). Estes autores verificaram que em todas as

populações, fundadas com diferentes frequências alélicas (0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 Adh^F), o alelo Adh^F apresentava-se em maior frequência (aproximadamente 60%) após 38 gerações. Todavia, quando algumas condições ambientais foram experimentadas, como diferentes temperaturas e umidades relativas do ar, o alelo Adh^S mostrava-se mais vantajoso. Estudando populações naturais deste mesmo organismo, Pipkin *et al.* (1976) também observaram diferentes frequências dos alelos Adh^S e Adh^F , de acordo com a altitude da coleta: o alelo Adh^S foi encontrado em maior número nas populações provenientes de regiões relativamente mais quentes. Estes autores, sugeriram que a maior estabilidade ao calor demonstrada pelo produto protéico do alelo Adh^S , deva ser o fator responsável pela adaptabilidade diferencial dos genótipos.

Os polimorfismos protéicos foram e continuam sendo muito estudados em populações naturais e experimentais de microrganismos, de vegetais e de animais, incluindo o homem. Tem-se verificado que eles constituem grande parte da variação encontrada na natureza, embora não seja aparente e necessite de técnicas especiais para sua detecção. Um dos instrumentos mais poderosos para revelar estes polimorfismos é a eletroforese, que foi desenvolvida na década de 50. A partir das décadas de 60 esta técnica começou a ser utilizada para o estudo da variabilidade alélica. Nesta fase, devem ser citados os clássicos trabalhos de Lewontin & Hubby (1966) e Hubby & Lewontin (1966), com *D. pseudoobscura* e, Harris (1966) com a espécie humana.

A eletroforese baseia-se em diferenças na mobilidade de variantes protéicas, determinadas por diferentes proporções de aminoácidos com cargas positivas (entre eles: lisina, arginina e histidina) e negativas (ácido aspártico e ácido glutâmico), ou diferentes pesos moleculares destas macromoléculas, ou ainda, a combinação de ambos. As variantes protéicas surgem através das mutações, que podem alterar a seqüência de aminoácidos na proteína em questão, por exemplo uma enzima, promovendo diferentes padrões de migração eletroforética. Estas enzimas que apresentam diferentes padrões de mobilidade eletroforética resultantes de diferenças alélicas em determinado loco (aloenzimas ou alozimas), têm sido objeto de estudo de muitos pesquisadores, utilizando-se os mais variados sistemas biológicos animais e vegetais (Clegg & Allard, 1972; Hoenigsberg *et al.*, 1977). Estes estudos tiveram como objetivos principais a verificação do grau de polimorfismo enzimático em populações e das frequências alélicas ao longo de gerações, bem como, o entendimento dos processos que manteriam esta variação.



As comparações entre diferentes locos e populações podem ser feitas utilizando-se as frequências genotípicas e gênicas, bastando para isso um método de contagem simples a partir do resultado da análise eletroforética. É certo que as frequências observadas são estimativas das frequências reais das populações e, desta forma, possuam um forte componente amostral. Assim, os cuidados com o tamanho da amostra e com o seu grau de aleatorização (casualidade na escolha dos indivíduos) garantem uma boa representatividade da população.

A variação alélica observada em populações pode ser estudada do ponto de vista da genética de populações, principalmente quando pode ser admitido que os alelos em questão estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tornando possível a predição das frequências gênicas e genotípicas. Todavia, desvios numéricos nos valores esperados podem suscitar a presença de fatores que, de certa forma, possam estar atuando para produzir associações não-casuais em um determinado loco, quando considerados diferentes alelos, ou entre diferentes locos ligados, em desequilíbrio de ligação.

Na natureza, alterações nas frequências alélicas de um único loco ou de haplótipos (quando considerados vários locos gênicos), podem ser o reflexo de pressões exercidas a favor ou contra alelos de outros locos, mas íntima e fisicamente ligados àquele em estudo. As posições destes dois locos (ou um número maior de locos) em um mesmo cromossomo podem ser tão próximas que a probabilidade de ocorrer recombinação entre eles é praticamente desprezível. Desta forma, alguns haplótipos seriam mais comuns que outros, sendo transmitidos às gerações futuras como supergenes, não no sentido de uma atuação ou importância superior, mas sim, no sentido de ser mais de um loco segregando juntos pela sua proximidade. Dentre todos os gametas produzidos em uma geração na população, um número maior do que o esperado seria observado para o haplótipo em desequilíbrio (Ridley, 1996). Oportunamente, serão discutidos exemplos de fatores que poderiam colaborar na manutenção destes desequilíbrios.

Várias formas de seleção natural foram propostas até o momento, sendo que todas elas preconizam como primordiais a variação nas frequências e o tempo relacionado às sucessivas gerações. Dentre estas formas, a seleção direcional de mutações vantajosas seria a principal responsável pelas substituições gênicas ao longo de gerações, ou seja, o resultado de processos adaptativos de variantes alélicas que contribuíssem, em condição *sine qua non*, à adaptabilidade dos indivíduos portadores. Este tipo de seleção é responsável pelo aumento nas frequências de



alguns alelos ou combinações de genes, em detrimento dos demais, devido às modificações ambientais ou ao aparecimento de alelos ou combinações alélicas favoráveis. Esta forma de seleção pode levar à fixação de alguns alelos e, conseqüentemente, à eliminação de outros.

Outra forma de seleção, chamada de seleção balanceada, pode incluir vários tipos de processos seletivos, mas que, de maneira geral, possibilitam a manutenção dos polimorfismos, promovendo a permanência de dois ou mais alelos em um loco ou mais de uma variante cromossômica nas populações (Dobzhansky, 1973). Assim, os polimorfismos seriam mantidos quando a existência de mais de uma forma alélica para determinado loco gênico promovesse alguma vantagem para o organismo ou população. Desta forma, a substituição gênica e o polimorfismo poderiam ser interpretados como diferentes fenômenos influenciados por diferentes forças evolutivas.

Uma das formas de seleção balanceada pode ser determinada pela vantagem do heterozigoto ou sobredominância, que em última análise, ocorre quando o heterozigoto apresenta maior valor adaptativo em relação aos dois homozigotos. Embora muitos autores tenham sugerido que os polimorfismos encontrados nas populações naturais sejam mantidos por modos seletivos balanceados, estes ainda não foram demonstrados convincentemente. Um dos exemplos mais difundidos na Biologia Evolutiva refere-se à anemia falciforme humana (Allison, 1961; Cavalli-Sforza & Bodmer, 1971 *apud* Futuyma, 1992).

Outra forma de seleção balanceada que pode auxiliar na manutenção dos polimorfismos em populações é chamada de seleção dependente da frequência. Neste caso, os valores adaptativos não são constantes e dependem da frequência genotípica e, desta forma, se o valor adaptativo do genótipo menos freqüente for maior que os demais, um equilíbrio estável pode ser instalado. Um exemplo deste tipo de seleção foi relatado por Sheppard & Cook (1962) com a mariposa *Panaxia dominula*. Nesta espécie, um loco controla a quantidade de pigmento preto nas asas e, indivíduos portadores dos três genótipos preferem cruzar-se com portadores de outros genótipos. Como nesta espécie as fêmeas cruzam-se apenas uma vez na vida e, os machos, estão aptos a cruzarem-se com muitas fêmeas virgens, machos portadores de genótipos mais raros terão uma vantagem sobre aqueles mais freqüentes, pois serão atraídos preferencialmente pelas fêmeas mais comuns, aumentando as freqüências do alelo raro que possuem.



Segundo Futuyma (1992), a manutenção da variabilidade genética nas populações poderia ser devida à detecção de um polimorfismo transitório que demonstraria estar o loco não em equilíbrio, mas sim, em um estado transiente, pois a seleção estaria dirigindo um alelo para a fixação, ou ainda, que o loco estaria ligado a outros genes que estariam sendo selecionados positivamente. Além disso, a variabilidade também poderia ser alcançada pela taxa de mutação recorrente ou pelo fluxo gênico entre populações, em contraposição à seleção que tenderia a fixar um alelo em particular. Assim, a presença de variabilidade genética pode ser explicada através de diferentes proposições e então, nem sempre caracterizaria a existência de polimorfismo nas populações.

A partir do crescente acúmulo de dados acerca das seqüências de aminoácidos de várias proteínas e de seqüências de nucleotídeos, novos modelos e hipóteses surgiram para explicar a manutenção de polimorfismos nas populações. Kimura, propondo uma nova teoria em 1968, afirmou que a maioria das alterações moleculares observadas nas linhagens filogenéticas era devida à fixação aleatória de mutações neutras ou quase neutras. Esta corrente, conhecida atualmente como neutralismo, parte do pressuposto que a maioria das mudanças moleculares evolutivas e grande parte da variabilidade molecular intraespecífica não são devidas à seleção positiva de alelos vantajosos, nem mesmo à seleção estabilizadora, mas decorrente da deriva genética de alelos que são seletivamente neutros.

O processo responsável pelas mudanças nas freqüências gênicas seria, então, a deriva genética, acarretando mudanças casuais nas freqüências, ao longo das gerações, principalmente nas populações pequenas, sem a participação da seleção natural, dado que os alelos não possuam diferenças apreciáveis no valor adaptativo. Fuerst *et al.* (1977) e Watterson (1978) demonstraram aderência ao modelo neutro entre as curvas de variação das freqüências alélicas no tempo e as obtidas teoricamente a partir da hipótese de deriva genética, embora uma série de ajustes matemáticos tenham sido feitos, principalmente para permitir a ponderação de fatores como fluxo gênico, tamanho efetivo da população ou seleção. Desta forma, alguns autores, entre eles Ohta (1974, 1992), propuseram a necessidade de modificar tais modelos, admitindo que a maioria das mutações são ligeiramente deletérias, ao invés de plenamente neutras.

O termo “neutralidade” não significa que todos os alelos de um determinado loco possuam a mesma adaptabilidade e, sendo assim, a seleção natural deve atuar, mas com tão pouca intensidade que não é suficiente para influenciar a



manutenção das variantes. A casualidade nos processos estocásticos de deriva genética é que determinaria a composição genética das populações, em termos de frequências gênicas. A qualquer tempo, as frequências observadas retratariam, segundo este ponto de vista, uma situação efêmera, de transição, em um processo dinâmico. Portanto, esta corrente admite que os polimorfismos e as substituições de variantes alélicas sejam conseqüências de um mesmo processo estocástico de surgimento, fixação aleatória e extinção de alelos.

Em essência, uma das principais discordâncias entre os modelos neutralistas e selecionistas diz respeito à distribuição dos valores adaptativos dos alelos mutantes. Ambas as teorias concordam que a maioria das mutações novas são deletérias e que são rapidamente removidas da população, tanto que elas não contribuem nem para as taxas de substituição nem para a quantidade de polimorfismo nas populações. A diferença encontra-se na proporção relativa de mutações neutras entre as mutações não-deletérias. Segundo o selecionismo, pouquíssimas mutações são seletivamente neutras e, de acordo com o neutralismo, a maioria das mutações não-deletérias são efetivamente neutras, ou seja, não contribuiriam nem pró e nem contra o valor adaptativo dos indivíduos (Kimura, 1983).

Visto que a evolução adaptativa pode ser definida como o processo direcionado de mudanças genéticas nas populações, as alterações nas frequências alélicas ao longo das gerações são o componente básico da evolução. Para que uma nova mutação torne-se importante do ponto de vista evolutivo, ela deve ter a sua frequência aumentada até que seja fixada na população, ou seja, todos os indivíduos de uma geração futura devem possuir o mesmo alelo. Sem aumento na sua frequência, uma nova mutação terá nenhum, ou no máximo poucos efeitos na história evolutiva das espécies. Todavia, as taxas de mutação recorrente não são suficientes para promover este aumento, havendo então a necessidade de que outros fatores atuem, entre eles, a seleção natural e a deriva genética, para que ocorra a fixação, ou então, fatores como a seleção, a recombinação e a migração, para que a variabilidade seja mantida.

Algumas evidências da ocorrência de polimorfismos enzimáticos em populações naturais e experimentais e, a complexa questão dos fatores responsáveis pela sua manutenção, têm sido amplo material de investigação em Biologia Evolutiva.

I.3. Estudo dos polimorfismos em populações experimentais

Segundo Futuyma (1992), o estudo dos fatores seletivos que manteriam os polimorfismos nas populações deve ser realizado considerando-se algumas premissas, tais como: bom tamanho populacional, para que os efeitos de deriva genética sejam atenuados; número suficiente de gerações, para que as diferenças nas freqüências genotípicas possam ser identificadas e acompanhadas durante o tempo; e, em alguns casos, perturbação controlada do ambiente, impondo obstáculos diferentes aos genótipos ou mantendo a sua homogeneidade. Desta forma, as populações experimentais são um instrumento muito importante para a pesquisa em Biologia Evolutiva, principalmente em se tratando de polimorfismos, pois em laboratório estas necessidades metodológicas são mais facilmente conseguidas. Muitos estudos valeram-se desta estratégia na busca de um melhor entendimento acerca da variação, de sua origem e de sua manutenção.

Utilizando 13 populações experimentais de *D. willistoni* com alto grau de heterozigose, em 22 polimorfismos eletroforéticos, Powell (1971) observou uma variabilidade significativamente maior naquelas mantidas em ambientes artificiais mais variáveis quanto ao alimento ou à temperatura após 15 gerações. Este autor propôs que quanto maior a diversidade ambiental, maior a variabilidade mantida pela seleção natural. Logo a seguir, King (1972) discutiu esta proposição, primeiramente afirmando que como esta espécie apresenta muitas inversões pequenas em todos os braços cromossômicos, genes seletivamente importantes mantidos nestas inversões é que estavam na verdade sendo detectados. Este autor sugeriu que a variabilidade observada era em sua grande maioria neutra e mantida por sobredominância associativa. Em consequência disto, a unidade de seleção não estava centrada nestes genes, mas sim, em alguns poucos sob forte pressão de seleção, localizados proximamente aos marcadores eletroforéticos estudados. Todavia, Powell (1972) argumentou que suas conclusões basearam-se na ausência de correlações positivas observadas em populações naturais desta espécie, em relação a determinadas inversões e seus alelos, ou então, entre heterozigose cromossômica e heterozigose enzimática.

McDonald & Ayala (1974), estudando *D. pseudoobscura*, utilizaram-se basicamente da mesma metodologia em populações fundadas a partir de moscas capturadas em um ambiente considerado constante e, em três ambientes com condições flutuantes e com complexidade cada vez maior. Após muitas gerações, foi

mantida maior variabilidade nos 20 locos eletroforéticos estudados nas populações fundadas a partir de moscas de ambientes estáveis, em relação àquelas dos ambientes heterogêneos, indo de encontro à proposta de Powell (*op.cit.*). Todavia, o segundo questionamento ainda permaneceu não respondido, ou seja, que genes intimamente ligados seriam as verdadeiras unidades de seleção?

Minawa & Birley (1975) observaram fortes indícios da ocorrência de seleção em pelo menos 8 locos estudados após 200 gerações, em populações experimentais de *D. melanogaster*, fundadas a partir de 2000 moscas. Os autores argumentaram que o grande número inicial de moscas e a longa duração do experimento com cultura em massa, devam ter sido suficientemente eficazes para eliminação do desequilíbrio de ligação como fator de alteração de frequências alélicas. Além disso, entre as réplicas do experimento - duas para cada um dos três ambientes com diferentes graus de heterogeneidade e duas para o ambiente homogêneo - não foram observadas diferenças significantes entre as frequências de alguns alelos, indicando que a seleção afetava as réplicas das populações da mesma forma.

Yamazaki (1971), estudando o polimorfismo da esterase-5 em populações experimentais de *D. pseudoobscura*, não observou alterações nas frequências alélicas para o equilíbrio, ao longo dos 20 meses de duração do estudo. A homogeneidade das frequências pode ter sido devida a problemas metodológicos, pois algumas diferenças em adaptabilidade de certos alelos só poderiam ter sido observadas se os indivíduos fossem submetidos a condições ambientais particulares. Um exemplo é a utilização de meios saturados de álcool etílico, o substrato da álcool desidrogenase de *D. melanogaster*, procedimento adotado por Clarke (1975) e Van Delden *et al.* (1978).

Arnason (1982) estudou o polimorfismo de outras duas enzimas digestivas, em *D. pseudoobscura*: a malato desidrogenase (MDH) do cromossomo IV e a esterase-5 (EST-5) ligada ao cromossomo X, na tentativa de elucidar as questões relativas aos modos de manutenção destes polimorfismos nas populações. Populações pequenas (aproximadamente 50 indivíduos) e grandes (cerca de 1350 indivíduos) foram iniciadas com frequências alélicas iguais a 50%, que são diferentes daquelas observadas na natureza: o alelo *Mdh*^{1,20} foi observado naturalmente nas populações que originaram as linhagens experimentais em frequência próxima a 6% e, o alelo *Est-5*^{1,12}, com aproximadamente 4%. Quatro amostras de moscas adultas foram coletadas ao longo do experimento que durou cerca de 400 dias. A partir dos resultados obtidos para a MDH, o autor sugeriu que as diferenças seletivas observadas

entre os dois alelos estudados ($Mdh^{1.00}$ e $Mdh^{1.20}$) corroboram o ponto de vista neutralista, pois estas diferenças foram menores que 1%. Todavia, os resultados observados para a dispersão ao longo das gerações dos seis alelos estudados da EST-5 ($Est-5^{0.90}$, $Est-5^{1.00}$, $Est-5^{1.02}$, $Est-5^{1.03}$, $Est-5^{1.06}$ e $Est-5^{1.12}$) foram incompatíveis com as premissas do neutralismo pois algum tipo de seleção estabilizadora deveria estar envolvida na redução dos valores iniciais do alelo $Est-5^{1.12}$ ao nível médio de 40%.

A álcool desidrogenase (ADH) é uma enzima que catalisa a oxidação de uma grande variedade de álcoois, em aldeídos ou cetonas, e a redução de NAD^+ em NADH, promovendo a desintoxicação do organismo (O'Brien & MacIntyre, 1978). Em *D. melanogaster*, a ADH possui duas subunidades idênticas, cada uma com 254 resíduos de aminoácidos e peso molecular próximo a 27.400 daltons. As populações naturais desta espécie geralmente contêm dois alelos comuns, designados de Adh^S e Adh^F , cujos produtos diferem em um único aminoácido na posição 192 (Fletcher *et al.*, 1978; Kreitman, 1983). Outras variantes enzimáticas muito raras podem ser encontradas, incluindo mutantes sem atividade catalítica que, geralmente, também envolvem a substituição de apenas um aminoácido (Chambers *et al.*, 1981).

Com atividade biológica não vital, visto que linhagens de *Drosophila Adh*-nulas sobrevivem normalmente em cultura, a álcool desidrogenase é principalmente encontrada nos tecidos gordurosos, no intestino e nos túbulos de Malpighi de larvas e adultos (Van Delden, 1982). Como as atividades catalíticas *in vitro* das três formas mais comuns são diferentes, ou seja: $Adh^F/Adh^F > Adh^F/Adh^S > Adh^S/Adh^S$, pode-se prever que estes alelomorfos proporcionem diferentes habilidades de desintoxicação alcoólica, positivamente associadas às suas atividades catalíticas, o que resultaria em diferenças nos valores adaptativos dos genótipos. Desta forma, este autor sugeriu que devido aos vários aspectos relacionados ao polimorfismo desta enzima, ao seu papel fisiológico e ecológico, a hipótese da neutralidade na sua manutenção nas populações fica praticamente descartada, atribuindo-se à seleção um papel crucial nos resultados observados.

O valor adaptativo de um genótipo mantido por seleção dependente da frequência pode ser o resultado de uma facilitação entre genótipos, pela produção de resíduos do metabolismo ou pelo uso diferencial dos recursos ambientais. Contudo, é muito difícil isolar e identificar qualquer resíduo de importância, ou ainda, entender por quais maneiras os genótipos compartilham o ambiente. Assim, existe uma grande dificuldade na interpretação dos resultados experimentais que mostram efeitos

seletivos dependentes da frequência, principalmente devido ao desconhecimento dos mecanismos fisiológicos exatos que produzem estes efeitos.

Haj-Ahmad & Hickey (1982) investigaram quais mecanismos estariam associados com a seleção dependente da frequência no loco da amilase, em populações experimentais de *D. melanogaster* e observaram que a ocorrência de excrementos da forma cataliticamente ativa da enzima no meio de cultura, e seus efeitos sobre a sua composição, estavam correlacionados com os resultados da competição intraespecífica entre genótipos amilase-deficientes e normais. Apenas estes últimos excretavam a forma ativa no meio de cultura, promovendo a digestão do amido. Este fato indica que o aumento da viabilidade dos mutantes amilase-deficientes depende da frequência do genótipo normal em culturas com os dois genótipos, mantidos com uma dieta rica desse polissacarídeo.

Outro exemplo de seleção dependente da frequência envolvendo um loco enzimático foi relatado por Tomic & Ayala (1981), em *D. pseudoobscura*. Estes autores estudaram diferenças na produtividade de moscas que diferiam em dois alelos da malato desidrogenase-2 ($Mdh-2^S$ e $Mdh-2^F$), mantidas em culturas com diferentes densidades (alta e baixa) e com diferentes combinações de genótipos ($Mdh-2^S / Mdh-2^S$, $Mdh-2^S / Mdh-2^F$ e $Mdh-2^F / Mdh-2^F$), dois a dois, ou todos reunidos. Tendo como controle as culturas iniciadas com apenas um dos genótipos, estes autores verificaram que diferentes genótipos eram variavelmente afetados e que, da mesma forma, os seus valores adaptativos eram também afetados de modo diverso, segundo a combinação de genótipos em competição. Quando os três genótipos estavam presentes, principalmente em altas densidades populacionais, a competição intergenotípica era menos intensa que a intragenotípica, observada no controle, ou seja, os três genótipos juntos exploravam os recursos ambientais de uma maneira mais eficiente do que quando cada um deles estava sozinho em cultura. Ainda, os autores propuseram que o valor adaptativo dos genótipos seria dependente da frequência tanto nas combinações de dois como dentre os três genótipos e, que uma relação inversa entre a frequência e o valor adaptativo, observada nas culturas apinhadas, poderia levar a um polimorfismo estável, pelo fato do valor adaptativo de um genótipo ser maior quando a sua frequência decrescia.

Como discutido por Wills (1981), o polimorfismo de dois alelos poderia ser mantido na população se ambos os homozigotos fossem menos aptos que o heterozigoto, embora Lewontin (1974) tenha considerado que casos de excesso de heterozigotos ou de vantagem aparente destes genótipos sejam muito raros. Além



disso, Richmond & Powell (1970) e Wills & Nichols (1971, 1972) sugeriram que estes casos possam ser devidos à sobredominância associativa, ou ao efeito de ligação. Como já apresentado, a sobredominância refere-se ao fato de que a expressão de um caráter no heterozigoto é mais acentuada que nos homozigotos. Ainda, uma forma disto ocorrer, é se blocos de genes intimamente ligados ao alelo em questão incluir genes não-alelos subvitais. Um heterozigoto para este loco pode não ser mais apto que os homozigotos sob as condições experimentais, mas aparentar ser devido à complementação dos alelos subvitais ligados. Conclui-se que estudos ainda devam ser realizados para que generalizações acerca dos polimorfismos aloenzimáticos, principalmente a favor ou contrárias à seleção, possam ser propostas.

Os estudos com populações experimentais são, sem dúvida, importantes para o entendimento das forças que atuam na manutenção dos polimorfismos, ou ainda, daquelas que os eliminam. Todavia, as condições laboratoriais controladas se, por um lado, fornecem a confiabilidade metodológica na discussão dos resultados obtidos, por outro, jamais reproduzem aquelas encontradas na natureza, apesar de serem por várias vezes muito próximas.

Alguns autores têm-se dedicado ao estudo de populações naturais. Nevo *et al.* (1984) realizaram uma ampla revisão acerca dos níveis de diversidade genética, representados pela variação protéica, a partir dos resultados de estudos sobre a variabilidade aloenzimática de populações naturais de 1111 espécies distribuídas em 10 táxons: mamíferos, aves, répteis, anfíbios, peixes, crustáceos, insetos (excluindo-se *Drosophila*), *Drosophila*, moluscos e dicotiledôneas. Os autores evidenciaram que os níveis de diversidade enzimática têm variação não casual entre populações, espécies e táxons, quando considerados parâmetros ecológicos (tipo de habitat, região climática, etc.), demográficos (tamanho e estrutura da população, fluxo gênico, etc.) e da história da vida (longevidade, fecundidade, sistema de acasalamento, etc.).

Ainda, concluíram os autores, que a diversidade protéica das espécies encontra-se, de maneira geral, positivamente correlacionada com a amplitude das barreiras climáticas, geográficas e de habitats superáveis pelos organismos e, que parâmetros ecológicos possuem maior importância para a explicação da variabilidade enzimática, seguido pelos demográficos e da história da vida (90%, 39% e 3,5%, em média, respectivamente). Outros estudos com populações naturais serão apresentados a seguir.



manutenção das variantes. A casualidade nos processos estocásticos de deriva genética é que determinaria a composição genética das populações, em termos de frequências gênicas. A qualquer tempo, as frequências observadas retratariam, segundo este ponto de vista, uma situação efêmera, de transição, em um processo dinâmico. Portanto, esta corrente admite que os polimorfismos e as substituições de variantes alélicas sejam conseqüências de um mesmo processo estocástico de surgimento, fixação aleatória e extinção de alelos.

Em essência, uma das principais discordâncias entre os modelos neutralistas e selecionistas diz respeito à distribuição dos valores adaptativos dos alelos mutantes. Ambas as teorias concordam que a maioria das mutações novas são deletérias e que são rapidamente removidas da população, tanto que elas não contribuem nem para as taxas de substituição nem para a quantidade de polimorfismo nas populações. A diferença encontra-se na proporção relativa de mutações neutras entre as mutações não-deletérias. Segundo o selecionismo, pouquíssimas mutações são seletivamente neutras e, de acordo com o neutralismo, a maioria das mutações não-deletérias são efetivamente neutras, ou seja, não contribuiriam nem pró e nem contra o valor adaptativo dos indivíduos (Kimura, 1983).

Visto que a evolução adaptativa pode ser definida como o processo direcionado de mudanças genéticas nas populações, as alterações nas frequências alélicas ao longo das gerações são o componente básico da evolução. Para que uma nova mutação torne-se importante do ponto de vista evolutivo, ela deve ter a sua frequência aumentada até que seja fixada na população, ou seja, todos os indivíduos de uma geração futura devem possuir o mesmo alelo. Sem aumento na sua frequência, uma nova mutação terá nenhum, ou no máximo poucos efeitos na história evolutiva das espécies. Todavia, as taxas de mutação recorrente não são suficientes para promover este aumento, havendo então a necessidade de que outros fatores atuem, entre eles, a seleção natural e a deriva genética, para que ocorra a fixação, ou então, fatores como a seleção, a recombinação e a migração, para que a variabilidade seja mantida.

Algumas evidências da ocorrência de polimorfismos enzimáticos em populações naturais e experimentais e, a complexa questão dos fatores responsáveis pela sua manutenção, têm sido amplo material de investigação em Biologia Evolutiva.

I.4. Estudo dos polimorfismos em populações naturais

Morton (1964) e Morton *et al.* (1966) encontraram pequena evidência de seleção atuando em 14 locos polimórficos, analisando uma amostra de 1068 famílias humanas do noroeste brasileiro. Nenhuma diferença significante foi encontrada entre crianças e adultos na frequência de quaisquer dos locos. Ao contrário, encontra-se na literatura muitos relatos de vantagem do heterozigoto com o aumento da idade. Koehn *et al.* (1973, 1976) e Tracey *et al.* (1975), mostraram que mexilhões mais velhos ou ostras mais largas apresentaram menor desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação aos mais jovens. Além disso, os heterozigotos sobreviveram melhor ou se desenvolveram mais rápido. Entretanto, Wills (1981) sugeriu que no caso de organismos parcialmente endocruzados isto pode quase que certamente ser atribuído à sobredominância associativa, embora o efeito da seleção atuando em polimorfismos funcionais seja provavelmente pequeno em populações exocruzantes.

Butlin *et al.* (1982) estudaram as frequências alélicas para a álcool desidrogenase de sete populações geográficas do díptero *Coelopa frigida*, durante seis anos, e verificaram o excesso de heterozigotos Adh^B/Adh^D e a deficiência de homozigotos para cada alelo, em praticamente todas elas, de modo diferente ao esperado segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Pelo fato de estarem isoladas umas das outras e, desta forma, não ser possível o fluxo gênico entre as populações, os autores sugeriram a existência de seleção balanceada favorecendo os genótipos heterozigotos, que sobreviveriam em taxas maiores, ou ainda, que deixariam mais descendentes do que os homozigotos. Todavia, visto que este gene está localizado em uma inversão cromossômica, não fica claro se a seleção estaria favorecendo diretamente os heterozigotos, genes muito próximos ou supergenes em inversões.

A partir de experimentos que utilizaram a presença de inversões cromossômicas paracêntricas em algumas populações naturais de *Drosophila*, alguns autores contribuíram para o esclarecimento de questões relacionadas ao desequilíbrio de ligação. Por exemplo, a maior adaptabilidade proporcionada por algumas variantes enzimáticas poderia ser explicada como o reflexo de um aumento nas chances de sobrevivência e reprodução dos indivíduos que as possuem, resultantes de uma vantagem funcional destas enzimas ou, por outro lado, como o reflexo de genes

intimamente ligados a este loco, segregando-se como um supergene, em conexão a um determinado alelo.

Markow *et al.* (1993) forneceram evidências para propor que o polimorfismo dos antígenos HLA humanos, o principal complexo gênico de histocompatibilidade, seja mantido através de seleção balanceada. A partir do estudo dos locos *HLA-A* e *HLA-B* de indivíduos nativos isolados, da tribo Havasupai, habitantes do estado do Arizona, EUA, estes autores identificaram quatro alelos no loco *HLA-A* e oito no loco *HLA-B* e, em 20 dos 32 haplótipos possíveis neste sistema de dois locos foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre cinco dos seis haplótipos mais comuns, exibindo um alto desequilíbrio de ligação. Foi também observado um excessivo acúmulo de heterozigotos em ambos os locos, desviando do esperado segundo as proporções de Hardy-Weinberg, o que não pode ser atribuído a causas não-seletivas, como por exemplo, diferentes freqüências alélicas em homens e mulheres, ou ainda, cruzamentos consangüíneos preferenciais. Estas observações sugerem, então, que a seleção balanceada é de principal importância na manutenção do polimorfismo nestes dois locos.

Muitos estudos sobre a dinâmica de caracteres quantitativos enfatizaram os casos clássicos de seleção fraca sobre um caráter controlado por um grande número de locos gênicos (Barton & Turelli, 1989). Além disso, como citado por Orr & Coyne (1992), a evidência de que caracteres quantitativos são controlados por vários locos não significa que diversos traços qualitativos possam ser controlados por um número pequeno deles. Neste caso, a seleção sobre um certo loco gênico alterando um determinado traço deve, de fato, ser muito forte. Ainda, Endler (1986) sugere que em populações naturais, a seleção estabilizadora favoreça um fenótipo intermediário ótimo para alguns traços quantitativos. Todavia, a mutação deve ser incorporada à explicação pois, segundo Futuyma (1992), este tipo de seleção tende a reduzir a variabilidade genética em traços poligênicos.

Os efeitos que o intracruzamento produz sobre a fixação e a segregação de genes raramente foram confirmados através de observações diretas. McGoldrick & Hedgecock (1997) investigaram a fixação, a segregação e a ligação de alozimas na progênie de hermafroditas auto-fertilizados de uma espécie de ostra do Oceano Pacífico (*Crassostrea gigas*) e observaram que a taxa de fixação ponderada por loco, indivíduos e famílias, era significativamente menor que o valor esperado de 0,5. Além disso, a taxa de segregação (127:243:54) desviava do esperado 1:2:1, principalmente a respeito de homozigotos para alelos de menor freqüência na população. Os autores

sugeriram que a seleção para a viabilidade estaria condicionada ao genótipo dos fundadores, atuando sobre dois grupos de ligação, com interações entre fatores ligados e *backgrounds* polimórficos reguladores.

A partir de preceitos adaptacionistas, em um ambiente estável, a variabilidade genética é mantida em níveis mínimos, em contraposição aos ambientes sujeitos a mudanças constantes que possuem populações com maior variabilidade genética. Desta forma, as populações que habitam regiões de grande estabilidade ambiental, como as fossas oceânicas abissais, apresentariam menor variabilidade se comparadas às populações que habitassem regiões marinhas intermediárias. Todavia, podem ser encontrados exemplos contrários, com populações intermediárias de peixes apresentando uma variabilidade enzimática muito aquém da esperada, quando comparadas com as de zonas mais profundas (Futuyma, 1992; Ridley, 1996). Uma das possíveis explicações baseia-se na suposição de que as populações das zonas intermediárias apresentam, neste caso, menor variabilidade pelo fato de serem justamente estes alelos em fixação os selecionados a favor, por participarem efetivamente da adaptabilidade dos indivíduos neste ambiente mais perturbado. Sob o ponto de vista adaptacionista, nas zonas seletivamente mais amenas, a variabilidade populacional continua sendo pequena pois os alelos que promovem maior adaptabilidade já estariam fixados.

Estudos sobre a genética de populações de moluscos marinhos, que possuem uma grande variabilidade protéica detectável eletroforicamente, têm contribuído para a elucidação do debate sobre se esta variabilidade possui significado adaptativo. A heterozigose de alozimas está diretamente relacionada com traços associados ao valor adaptativo destes animais. Por exemplo, uma associação significativa entre o peso médio e a heterozigose destas enzimas foi detectada em populações naturais de bivalves marinhos por Zouros *et al.* (1980). Além disso, esta heterozigose é negativamente correlacionada à taxa de respiração, fornecendo uma razão fisiológica para a correlação positiva entre heterozigose e taxa de crescimento (Hilbish *et al.*, 1994). Duas hipóteses foram propostas para tentar explicar estas observações: a hipótese da sobredominância, que indica um papel funcional direto das alozimas para o valor adaptativo e, a hipótese da sobredominância associativa, que sugere, para as alozimas, o papel de marcadores genéticos, que estão indiretamente associados com traços relacionados ao valor adaptativo em desequilíbrio de ligação com alelos recessivos deletérios (McGoldrick & Hedgecock, 1997).



I.5. Objetivos

A observação da manutenção dos alelos **Est-8^S** e **Est-8^F** do loco da esterase-8 nos estoques de *Drosophila mulleri* motivou a realização deste trabalho com os seguintes objetivos:

- a) estudar a dinâmica de dispersão dos alelos **Est-8^S** e **Est-8^F** da esterase-8 em populações experimentais ao longo de 30 gerações;
- b) decompor o valor adaptativo total em componentes relativos à produtividade, ao tempo de desenvolvimento, à longevidade e à viabilidade, em diferentes fases do desenvolvimento e, avaliar diferenças na expressão destes componentes entre as linhagens homozigotas e heterozigotas para a esterase-8;
- c) verificar se algum modelo seletivo explica as variações nas frequências gênicas, bem como, identificar os fatores evolutivos atuantes no polimorfismo dos alelos **Est^S** e **Est^F** e, suas expressões ao longo das gerações.

II.1. Obtenção e manutenção dos genótipos

As linhagens de *Drosophila mulleri* fundadas a partir de moscas coletadas em Guayaquilo, México, foram obtidas em 1976, dos estoques do Genetics Foundation (University of Texas - USA).

Neste trabalho, a partir dos estoques de *D. mulleri* mantidos no Laboratório de Populações de *Drosophila*, que continham variantes "slow" (lenta) e "fast" (rápida) para o loco da esterase-8, classificadas por Ceron (1988) de acordo com o método eletroforético, foram isoladas duas linhagens homozigotas. A caracterização da linhagem "lenta" baseou-se na presença de uma banda com expressão estereotípica mais próxima da origem da corrida (ânodo) em comparação com

a linhagem "rápida", caracterizada pela presença de uma banda esterásica mais afastada da origem.

Para melhor apresentação das linhagens utilizou-se as abreviações Est^S , representando o alelo "slow" e Est^F , representando o alelo "fast". Da mesma forma, as linhagens homozigotas para Est^S foram representadas por Est^S/Est^S , as homozigotas Est^F por Est^F/Est^F e as linhagens heterozigotas por Est^S/Est^F (com o alelo Est^S de origem materna) e por Est^F/Est^S (com o alelo Est^S de origem materna).

Todos os experimentos foram realizados utilizando-se meio de cultura banana-agar e os tubos, ou garrafas, foram mantidos em câmara de temperatura constante a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo claro-escuro de aproximadamente 12 horas.

Como estoque, foram utilizadas 50 garrafas de cada linhagem, com machos e fêmeas, os quais foram obtidos em laboratório.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho foram utilizados dois laboratórios do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP: **a)** Laboratório de Populações de *Drosophila* (Departamento de Biologia) para os procedimentos que envolveram a manutenção e o manejo das populações experimentais, bem como, para a montagem, a manipulação, a execução e a análise dos cruzamentos; **b)** Laboratório de Genética Bioquímica (Departamento de Química e Geociências) para a realização das eletroforeses e das demais técnicas de preparo das amostras e dos géis.

Os cruzamentos foram realizados em massa (50 casais por garrafa), nas duas direções de cruzamento: fêmeas Est^S/Est^S com machos Est^F/Est^F , para a obtenção dos indivíduos Est^F/Est^S e, fêmeas Est^F/Est^F com machos Est^S/Est^S , para a obtenção dos indivíduos Est^S/Est^F .

II.1. Obtenção e manutenção dos genótipos

As linhagens de *Drosophila mulleri*, fundadas a partir de moscas coletadas em Guayalejo, México, foram obtidas em 1976, dos estoques do Genetics Foundation (University of Texas - USA).

Neste trabalho, a partir dos estoques de *D. mulleri* mantidos no Laboratório de Populações de *Drosophila*, que continham variantes "slow" (lenta) e "fast" (rápida) para o loco da esterase-8, classificadas por Ceron (1988) de acordo com a mobilidade eletroforética, foram isoladas duas linhagens homozigotas. A caracterização da linhagem "lenta" baseou-se na presença de uma banda com expressão esterásica mais próxima da origem da corrida (ânodo) em comparação com

na fundação de cada população são apresentados no quadro a seguir.



à linhagem “rápida”, caracterizada pela presença de uma banda esterásica mais afastada da origem.

Para melhor apresentação das linhagens adotou-se as abreviações **Est^S**, representando o alelo “slow”, e **Est^F**, representando o alelo “fast”. Da mesma forma, as linhagens homozigotas para **Est^S** foram representadas por **Est^S/Est^S**, as homozigotas **Est^F**, por **Est^F/Est^F** e, as linhagens heterozigotas, por **Est^S/Est^F** (com o alelo **Est^F** de origem materna) e por **Est^F/Est^S** (com o alelo **Est^S** de origem materna).

Todos os experimentos foram realizados utilizando-se meio de cultura banana-água e os tubos, ou garrafas, foram mantidos em câmara de temperatura constante a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo claro-escuro de aproximadamente 12 horas.

Como estoque, foram utilizadas 50 garrafas de cada linhagem, com repiques a cada 25 dias, das quais foram obtidos os indivíduos para a realização dos experimentos.

II.2. Obtenção dos híbridos

Foram coletados das garrafas do estoque, 500 machos e 500 fêmeas recém-emergidos de cada linhagem e mantidos isolados em garrafas com meio de cultura, durante sete dias, para que ocorresse o completo amadurecimento sexual. A partir deste período foram realizados cruzamentos em massa (50 casais por garrafa), nas duas direções de cruzamento: fêmeas **Est^S/Est^S** com machos **Est^F/Est^F**, para a obtenção dos indivíduos **Est^F/Est^S** e, fêmeas **Est^F/Est^F** com machos **Est^S/Est^S**, para obtenção dos indivíduos **Est^S/Est^F**.

II.3. Estudo das freqüências gênicas e genotípicas em populações experimentais

Foram fundadas cinco populações experimentais com diferentes freqüências gênicas iniciais, com cinco réplicas cada uma, utilizando-se duzentos casais virgens, com sete dias de idade, em garrafas de ¼ de litro. Por não haverem condições experimentais para a manutenção das cinco réplicas de cada população, duas foram descartadas. As freqüências iniciais e os números de indivíduos utilizados na fundação de cada população são apresentados no quadro a seguir:

11.4. Eletroforese

População	Frequências gênicas iniciais		Indivíduos Est ^S /Est ^s		Indivíduos Est ^F /Est ^f	
	Est ^S	Est ^F	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
A	50,00	50,00	100	100	100	100
B	25,00	75,00	50	50	150	150
C	75,00	25,00	150	150	50	50
D	12,50	87,50	25	25	175	175
E	87,50	12,50	175	175	25	25

As populações foram mantidas através da técnica da transferência seriada, proposta por Buzzati-Traverso (1955), modificada por Dobzhansky & Pavlovsky (1961) e descrita em Tadei & Mourão (1981), com sete dias entre cada transferência dos indivíduos adultos. Desta forma, cada réplica era mantida com cinco garrafas, ou seja: a quinta garrafa, e mais nova, mantinha a parcela adulta da população; a quarta garrafa, mantinha os ovos e as larvas em seus estágios mais iniciais; a terceira, mantinha as larvas mais desenvolvidas e algumas pupas; a segunda garrafa, mantinha as pupas mais velhas e alguns imagos recém-emergidos; e, finalmente, a primeira garrafa mantinha os imagos jovens. Os imagos da primeira e da quinta garrafas eram então transferidos para uma nova garrafa (sexta garrafa) e a primeira garrafa (a mais velha) era descartada.

Na próxima transferência, os imagos da sexta e da segunda garrafas eram transferidos para a sétima garrafa, com descarte da segunda. Assim, sucessivamente a cada sete dias, era descartada a mais velha das cinco garrafas após a transferência de seus imagos para a nova garrafa que era acrescentada na série.

A cada três gerações, ou seja, a cada sete transferências, uma amostra de aproximadamente 30 machos e 30 fêmeas era retirada da parcela adulta de cada uma das três réplicas de cada uma das cinco populações. As moscas foram mantidas à temperatura de -16°C para posterior análise eletroforética.

Foram amostradas as gerações de número 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30.

Ao término do tempo de coleta, os moscos eram retirados do sistema e pré-incubados por 30 minutos em 50,0mL de tampão fosfato 0,1M, pH 8,2. Fato isto, o tampão era refeito e adicionado a seguinte relação de coloração:

II.4. Eletroforese

As análises eletroforéticas em gel de poliacrilamida seguiram a técnica adaptada a partir do protocolo de Ceron (1988). Basicamente, a técnica consiste em expor as proteínas a uma corrente elétrica, para que ocorra a migração destas moléculas através do gel em direção ao cátodo, com diferentes velocidades, impostas pelos diferentes pesos moleculares e/ou cargas elétricas destas proteínas.

Para o estudo das populações experimentais, os géis de poliacrilamida foram polimerizados entre duas placas de vidro de 11 x 31cm (altura x largura), com espaçamento de 1mm, adaptando-se um pente para 45 amostras. O modelo da cuba permitiu a utilização de dois géis, possibilitando a separação eletroforética de até 90 amostras simultaneamente.

No presente trabalho, utilizou-se gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida) a 10%, a partir da seguinte formulação, para 60,0mL:

Solução de acrilamida/bisacrilamida 30,8%.....	20,0mL
Tampão do gel Tris-HCl 1,5M, pH 8,8.....	15,0mL
Água destilada.....	24,0mL
Solução de persulfato de amônio a 10%.....	1,0mL
TEMED (N,N,N,N, tetrametilenodiamina).....	50,0μL

Após a introdução do TEMED, a solução de polimerização era transferida para as placas dando início à polimerização.

As moscas eram maceradas individualmente em tubos de centrífuga contendo 20,0μL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M, pH 8,8) a 0°C e centrifugados a 3000 rpm, por aproximadamente três minutos. Eram retirados 15,0μL do sobrenadante para a aplicação nos poços dos géis.

As placas de vidro contendo os géis eram colocados dos dois lados de uma cuba de acrílico e mantidas na posição vertical com o auxílio de garras e de vaselina sólida branca. Após a aplicação das amostras, os géis eram submetidos à eletroforese por aproximadamente duas horas, sob voltagem constante de 200V, utilizando-se tampão de corrida Tris-Glicina 0,1M, pH 8,3.

Ao término do tempo de corrida, os géis eram retirados do sistema e pré-incubados por 30 minutos em 50,0mL de tampão fosfato 0,1M, pH 6,2. Feito isto, o tampão era retirado e adicionava-se a seguinte solução de coloração:



β -naftilacetado (em 3,0mL de acetona).....	60,0mg
Fast Blue RR (em 5,0mL de N-propanol).....	240,0mg
Tampão fosfato 0,1M, pH 6,2.....	100,0mL

Os géis permaneceram incubados na solução corante por 30 minutos, em agitação e na ausência de luz.

A análise dos géis foi feita visualmente através da caracterização genotípica, contando-se o número de indivíduos homozigotos Est^S/Est^S ou Est^F/Est^F e heterozigotos Est^S/Est^F ou Est^F/Est^S , estes últimos indistinguíveis e considerados genericamente como “heterozigotos”. Para isso, foi observada a presença de uma (homozigotos) ou três bandas (heterozigotos) próximas à parte menos anódica do gel, originadas pela presença de um diazo composto de cor vermelha, resultante da reação entre o Fast Blue RR e o β -naftol, o álcool produzido a partir da reação catalítica da esterase-8 sobre o β -naftilacetato, naquele ponto do gel.

Após a análise, os géis foram tratados durante 24 horas em solução descorante do gel (etanol-ácido acético) e mantidos em recipientes plásticos contendo solução conservante (glicerina-ácido acético). Alguns géis foram digitalizados para documentação, a partir da captura de sua imagem por um “scanner”.

Para a análise eletroforética dos indivíduos obtidos a partir dos cruzamentos entre os híbridos do estudo da longevidade, foram utilizadas as mesmas condições com exceção de cubas e sistemas de vidro menores (para 20 amostras cada), utilização do α -naftilacetato para visualização de α -esterases e secagem do gel, utilizando-se a solução conservante e uma solução de gelatina comercial a 5% e papel celofane que cobria todo o gel durante uma semana, de acordo com o método de secagem descrito por Ceron *et al.* (1992).

O modo de preparo e as fórmulas das soluções utilizadas estão pormenorizados no **Apêndice**.

II.5. Estudo da longevidade

Para o estudo da longevidade, foram observadas duas situações: **1)** indivíduos virgens mantidos sem atividade sexual; e **2)** indivíduos de ambos os sexos mantidos juntos, com possibilidade de atividade sexual.



Para o estudo da longevidade na ausência de atividade sexual, foram retirados 50 machos e 50 fêmeas de cada genótipo, homozigotos e heterozigotos, que foram mantidos aos pares de mesmo sexo em tubos contendo meio de cultura até a morte dos dois indivíduos. A cada quatro dias, os indivíduos remanescentes foram transferidos para novas unidades de alimento.

Da mesma forma, 50 machos e 50 fêmeas de cada genótipo foram mantidos aos pares de mesmo sexo, em tubos, até completarem sete dias de idade. Cada macho foi, então, acasalado com uma fêmea de mesmo genótipo, sendo transferidos a cada intervalo de quatro dias para tubos novos e permanecendo juntos até a morte. Dos imagos produzidos nos três primeiros dias de emergência, nos tubos do sete primeiros períodos de ovoposição dos cruzamentos entre os híbridos, foram obtidas as amostras para posterior análise eletroforética.

II.6. Estudo da produtividade

Para o estudo da produtividade, vinte casais virgens com sete dias de idade, de cada uma das 16 combinações de cruzamentos, foram mantidos durante quatro dias em tubos com meio de cultura. Após oito dias, ou seja, dois períodos de ovoposição de quatro dias, os casais foram descartados e os dois tubos de cada casal foram reservados para a análise da produtividade, em número de machos, fêmeas e total. As contagens das moscas recém-emergidas foram feitas diariamente.

No quadro a seguir, são apresentados os 16 tipos de cruzamentos:

Fêmeas	Machos			
	Est^S/Est^F	Est^F/Est^S	Est^F/Est^F	Est^S/Est^S
Est^S/Est^F	$Est^S/Est^F \times Est^S/Est^F$	$Est^S/Est^F \times Est^F/Est^S$	$Est^S/Est^F \times Est^F/Est^F$	$Est^S/Est^F \times Est^S/Est^S$
Est^F/Est^S	$Est^F/Est^S \times Est^S/Est^F$	$Est^F/Est^S \times Est^F/Est^S$	$Est^F/Est^S \times Est^F/Est^F$	$Est^F/Est^S \times Est^S/Est^S$
Est^F/Est^F	$Est^F/Est^F \times Est^S/Est^F$	$Est^F/Est^F \times Est^F/Est^S$	$Est^F/Est^F \times Est^F/Est^F$	$Est^F/Est^F \times Est^S/Est^S$
Est^S/Est^S	$Est^S/Est^S \times Est^S/Est^F$	$Est^S/Est^S \times Est^F/Est^S$	$Est^S/Est^S \times Est^F/Est^F$	$Est^S/Est^S \times Est^S/Est^S$

II.7. Estudo dos tempos de desenvolvimento

Para a obtenção dos embriões para o estudo do tempo de desenvolvimento e da viabilidade dos quatro genótipos, dois homozigotos e dois heterozigotos, foram utilizadas garrafas de meio de cultura de ¼ de litro, contendo em seu fundo uma circunferência de papel absorvente (mata-borrão) preto, pincelado com uma solução concentrada de fermento biológico, que serviu como substrato de ovoposição. Cerca de 50 casais permaneceram nas garrafas por 12 horas para que fosse obtido o número necessário de embriões.

Os embriões com um dia de idade foram coletados delicadamente com a utilização de um pincel fino embebido em solução fisiológica. Grupos de cinco embriões foram transferidos para cada um dos 40 tubos contendo meio de cultura, totalizando duzentos embriões por genótipo.

Os tubos foram analisados diariamente, duas vezes ao dia e, os locais do vidro onde cada uma das larvas empupou foram marcados com canetas de retroprojektor de cores diferentes, de acordo com o dia da empupação. Desta forma foi possível a identificação do sexo da pupa após a emergência do imago e a análise dos tempos de desenvolvimento ovo-pupa, ovo-fêmea, ovo-macho e ovo-imago, bem como, dos tempos de desenvolvimento pupa-fêmea, pupa-macho e pupa-imago.

II.8. Estudo da viabilidade

Da mesma forma que para o estudo dos tempos de desenvolvimento, os embriões com um dia de idade foram retirados das placas de ovoposição e transferidos para placas de Petri com aproximadamente 6cm de diâmetro, contendo 100 embriões de um mesmo genótipo, com cinco réplicas para cada um. Após 48 horas da montagem da placa foi observado o número de ovos eclodidos e não-eclodidos para o cálculo da viabilidade ovo-larva, em termos percentuais.

As viabilidades ovo-pupa e pupa-imago foram obtidas a partir das observações do número de pupas e de imagos produzidos no experimento para o estudo dos tempos de desenvolvimento.



II.9. Estudo das freqüências gênicas e genotípicas em descendentes de intra-cruzamentos dos heterozigotos

A partir dos tubos utilizados para o estudo da longevidade foram obtidos os indivíduos para o estudo das freqüências gênicas e genotípicas na descendência de casais heterozigotos. Como descrito anteriormente, de todos os imagos produzidos nos três primeiros dias de emergência, nos tubos dos sete primeiros período de ovoposição destes cruzamentos, foram escolhidos aleatoriamente 25 machos e 25 fêmeas, que foram mantidos a -16°C. Destes, uma segunda aleatorização foi feita e escolhidos 15 machos e 15 fêmeas, que foram submetidos à análise eletroforética.

II.10. Análise estatística

A. Análise paramétrica

Foram utilizados o teste *t* de Student e a análise de variância com um critério de classificação, para o estudo da diferença entre médias e da homogeneidade das médias, respectivamente, da longevidade, da produtividade e dos tempos de desenvolvimento, com a utilização do MINITAB® for WINDOWS®, v. 10.1 (Minitab Inc., 1994). A partir dos resultados obtidos nas análises de variância, a determinação de quais médias eram significativamente diferentes foi feita aplicando-se o teste para comparações múltiplas de Tukey, quando os valores de *n* eram iguais e, o teste para comparações múltiplas de Newman-Keuls, quando os valores de *n* não eram iguais, ambos segundo Zar (1998).

B. Análise não-paramétrica

A verificação da igualdade entre as freqüências obtidas experimentalmente e a partir das simulações computacionais foi feita aplicando-se os testes de χ^2 (para igualdade) e *G* (logaritmo da razão de verossimilhança), segundo Zar (1998).

A seguir, são apresentados os números de indivíduos (absoluto e percentual) esperados para cada genótipo ou alelo, segundo o equilíbrio de Hardy-

Weinberg para as cinco populações experimentais, utilizados para os testes **G** e de χ^2 das gerações 1, 3 e 6 (n=44).

Foi utilizada a Análise de Dependência - ANADEP (Cordeiro, 1990) para o

População	Valor	Est ^S /Est ^S	Heterozigoto	Est ^F /Est ^F	Est ^S	Est ^F
A	Absoluto	11	22	11	44	44
	%	25,00	50,00	25,00	50,00	50,00
B	Absoluto	2,75	16,50	24,75	22	66
	%	6,25	37,50	56,25	25,00	75,00
C	Absoluto	24,75	16,50	2,75	66	22
	%	56,25	37,50	6,25	75,00	25,00
D	Absoluto	0,69	9,63	33,68	66	22
	%	1,56	21,88	76,56	12,50	87,50
E	Absoluto	33,68	9,63	0,69	66	22
	%	76,56	21,88	1,56	12,50	87,50

produzindo em um mesmo dia as seguintes proporções: 11 indivíduos com o alelo S e 11 indivíduos com o alelo F, totalizando 22 indivíduos.

No quadro abaixo, são apresentados os números de indivíduos (absoluto e percentual) esperados para cada genótipo ou alelo, segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg para as cinco populações experimentais, utilizados para os testes **G** e de χ^2 da nona à trigésima geração (n=40).

corresponde a um ponto 1:1, que é uma distribuição de três proporções, obtida a partir

População	Valor	Est ^S /Est ^S	Heterozigoto	Est ^F /Est ^F	Est ^S	Est ^F
A	Absoluto	10	20	10	40	40
	%	25,00	50,00	25,00	50,00	50,00
B	Absoluto	2,50	15,00	22,50	20	60
	%	6,25	37,50	56,25	25,00	75,00
C	Absoluto	22,50	15,00	2,50	60	20
	%	56,25	37,50	6,25	75,00	25,00
D	Absoluto	0,64	8,75	30,61	60	20
	%	1,56	21,88	76,56	12,50	87,50
E	Absoluto	30,61	8,75	0,64	60	20
	%	76,56	21,88	1,56	12,50	87,50

codominância é uma situação que se comporta de uma maneira diferente das

variáveis aleatórias. O coeficiente de correlação entre duas variáveis é

entre duas variáveis, do ponto de vista da análise de variância, é

coeficiente é definido como o quociente da covariância entre elas pelo produto das

C. Análise de Dependência

Foi utilizada a Análise de Dependência - ANADEP (Cordeiro, 1990) para o estudo das possíveis interações entre genótipos e gerações, nas cinco populações experimentais. Esta é uma análise de componentes principais feita através de uma matriz de dependências e codependências entre as gerações e de uma matriz de dependências e codependências entre os genótipos, que indica diferenças e similaridades em um diagrama bidimensional representando as projeções da distribuição espacial dos pontos-geração e, da dos pontos-genótipo, de acordo com os dois vetores de maior explicação da dependência total da matriz inicial.

O método de análise considera cada uma das i gerações como um vetor de n coordenadas ou uma distribuição de proporções de tamanho n , cuja soma resulta 1. O n é o número de categorias de uma dada variável, nesta análise o genótipo, produzindo, em um espaço de três dimensões, 11 pontos que representam as gerações. Nesse espaço, pontos próximos, segundo uma medida de proximidade adequada, denominada de Distância de Hellinger (Hellinger, 1909), representam gerações similares quanto à variável estudada. Foi utilizado o software ANADEP v.1.1, desenvolvido pelo autor em 1993.

Uma geração-padrão ou média, que representaria todas as 11 gerações, corresponde a um ponto $i+1$, que é uma distribuição de três proporções, obtida a partir da soma dos 11 pontos iniciais das gerações. Assim, uma geração semelhante à geração-padrão “assemelha-se a todas”, como indica a sua proximidade aos 11 pontos correspondentes no espaço de três dimensões. Uma geração muito diferente da padrão, destaca-se no grupo dos 11 pontos. Assim, define-se como a dependência de uma geração sua distância à geração-padrão, distância esta que se comporta como a variância de uma variável aleatória. A codependência entre duas gerações quaisquer é o balanço multivariado entre elas e a geração-padrão, isto é, se estiverem do mesmo lado do espaço (no mesmo hiper-quadrante) em relação à geração-padrão, então estas duas gerações serão positivamente codependentes; por outro lado, se estiverem em hiper-quadrantes opostos, serão negativamente codependentes. Deste modo, a codependência é uma medida que se comporta como a covariância entre duas variáveis aleatórias. O coeficiente de codependência mede o grau de similaridade entre duas gerações, do ponto de vista dos genótipos, variando de -1 a 1. Este coeficiente é definido como o quociente da codependência entre eles pelo produto das raízes quadradas das respectivas dependências.

D. Análise das Cadeias de Markov

As Cadeias de Markov são obtidas a partir do resultado da exponenciação de uma matriz de transição composta pelas proporções que representam a chance de um evento probabilístico permanecer no mesmo estado ou da transição deste evento para um novo estado. Desta forma, os valores da frequência dos genótipos Est^S/Est^S , heterozigotos e Est^F/Est^F e dos alelos Est^S e Est^F ao longo das 30 gerações (10 transições), para as três réplicas das cinco populações experimentais foram agrupados em estados com intervalo de 20% e de 10%, que variaram de 0-20% a 80-100% e de 0-10% a 90-100%, respectivamente. Por exemplo, se a frequência de um genótipo apresentar na transição da primeira para a terceira geração, uma redução de 35% para 15%, ocorreu a mudança do segundo (20-40%) para o primeiro estado (0-20%) ou do quarto (30-40%) para o segundo estado (10-20%), respectivamente para os dois tipos de agrupamento.

Assim, e sucessivamente, para a construção das cinco matrizes iniciais dos dois estudos foram analisadas as 150 transições de cada um dos três genótipos ou dos dois alelos, utilizando-se o software MATHCAD® for WINDOWS®, v. 5.0 (MathSoft, 1994). As matrizes foram utilizadas para a verificação do número de transições no tempo necessárias para que as frequências dos genótipos ou alelos atingissem a estabilidade, que foi considerada como três vezes a potência imposta à matriz inicial para que as proporções nas colunas de cada linha da matriz de transição permanecessem as mesmas, com precisão de um centésimo.

E. Análise de Tendência de Séries Temporais

As três réplicas de cada população foram comparadas pela diagramação gráfica das retas da Análise de Tendência de Séries Temporais utilizando-se o MINITAB®. A média das três réplicas foi utilizada como um padrão.



F. Composição dos valores adaptativos

Os valores adaptativos dos genótipos foram estimados de duas maneiras e utilizados em simulação computacional:

c) Simulações computacionais.

- a) Cálculo a partir das freqüências genotípicas obtidas nas análises eletroforéticas.

Em cada uma das três réplicas, das cinco populações, os valores percentuais de cada genótipo, obtidos em cada geração estudada, foram divididos pelos respectivos valores na geração anterior e o resultado dividido pelo maior dos três resultados. Desta forma, para cada uma das gerações foram obtidos três valores adaptativos referentes a cada um dos genótipos nas dez gerações amostradas a partir da primeira. Destes dez valores adaptativos do genótipo **Est^S/Est^S** foi calculada uma média e o respectivo erro, o mesmo sendo feito para os outros dois genótipos. As médias de cada réplica foram utilizadas para a obtenção da média das médias, que foi considerada como o valor adaptativo médio, que divididas pela maior das três, originaram os valores adaptativos líquidos (**W'**).

- b) Cálculo do valor adaptativo a partir das médias dos componentes estudados.

Os valores adaptativos calculados a partir dos valores médios dos componentes foram obtidos segundo Carareto (1989), utilizando-se o modelo aditivo. Foram utilizadas as médias das médias dos seguintes componentes: longevidade de machos (**LMA**) e de fêmeas acasaladas (**LFA**); produtividade de imagos (**PI**); viabilidade ovo-larva (**VOL**), ovo-pupa (**VOP**) e pupa-imago (**VPI**); e, tempos de desenvolvimento ovo-pupa (**TDOP**) e pupa-imago (**TDPI**). Para cada componente foi calculada uma média dos valores médios dos quatro genótipos e, em seguida, cada média foi dividida por esta média das médias e, o quociente, multiplicado por 100. Desta forma, para cada genótipo foram encontrados valores relativos de cada componente em relação à média dos valores dos quatro genótipos que, somados,

compuseram o valor adaptativo. Os quatro valores foram divididos pelo maior deles para a obtenção dos valores adaptativos estimado ($W'e$).

c) Simulações computacionais.

Utilizando-se o programa POPULUS® v.3.21 (Don Alstad - Universidade de Minnesota) e a partir dos valores adaptativos calculados das populações (W'), e dos componentes ($W'e$), foram simuladas cinco populações com as mesmas frequências iniciais utilizadas nos experimentos até a 30ª geração. Os valores obtidos foram comparados através dos testes de χ^2 ou G. Outras comparações foram feitas através da análise gráfica das curvas resultantes.

III.1. Análise das populações experimentais

Com o objetivo de analisar os fatores evolutivos atuantes no polimerismo da loca do β -galactosidase de *D. melanogaster*, foram submetidos para a proposição de um modelo que se adequasse às variações das frequências gênicas e genotípicas, foram fundadas cinco populações experimentais (populações A a E) com frequências iniciais diferentes e mantidas através da técnica de variação serializada. Neste tópico serão apresentadas as resultados obtidos em 11 gerações amostradas, em intervalos de três gerações. Indivíduos amostrados nas gerações de número 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 foram submetidos à análise eletroforética. Os resultados permitiram comparar as frequências observadas e as esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, bem como, calcular os valores adaptativos de cada genótipo.

A. Frequências gênicas e genotípicas

As Tabelas 1 a 5 e a Figura 1 mostram os resultados obtidos a partir das análises eletroforéticas, das três réplicas, de cinco populações experimentais, fundadas com frequências gênicas iniciais diferentes: população A - 50,00% Est^F : 50,00% Est^f ; população B - 25,00% Est^F : 75,00% Est^f ; população C - 75,00% Est^F : 25,00% Est^f ; população D - 12,50% Est^F : 87,50% Est^f ; e, população E - 87,50% Est^F : 12,50% Est^f . São apresentadas as frequências percentuais dos genótipos homocigotos Est^F/Est^F e Est^f/Est^f e heterocigotos (Est^F/Est^f e Est^f/Est^F), obtidas

em 11 gerações amostradas das 30 gerações estudadas. São apresentadas também as frequências dos alelos Est^S e Est^F , calculadas a partir de um total de 6780 indivíduos.

Os valores de χ^2 para homogeneidade das frequências gênicas e genotípicas e de G , que representa o logaritmo da razão de variação entre estas frequências, apresentadas nestas tabelas, foram calculadas a partir dos valores absolutos obtidos em cada geração que originaram as frequências gênicas e genotípicas. O número de indivíduos amostrados nas gerações de número 1, 3 e 6 foi de 44 (22 machos e 22 fêmeas) e, para as demais gerações, a amostra contou com 40 indivíduos (20 machos e 20 fêmeas). Quanto às frequências gênicas, nas três primeiras gerações amostradas foi considerado um total de 88 alelos amostrados e, a partir da 6ª geração, um total de 80 alelos. Nas situações em que o cálculo de χ^2 não foi possível devido às restrições de alelos em relação a números de indivíduos menores do que o necessário para o teste de homogeneidade, a significância dos valores para estas situações foi determinada pelo teste de Fisher.

III. RESULTADOS

III.1. Análise das populações experimentais

Com o objetivo de analisar os fatores evolutivos atuantes no polimorfismo do loco da β -esterase-8 de *D. mulleri* e, fornecer subsídios para a proposição de um modelo que se adequasse às variações das frequências gênicas e genotípicas, foram iniciadas cinco populações experimentais (populações **A** a **E**) com frequências iniciais diferentes e mantidas através da técnica da transferência seriada. Neste tópico serão apresentados os resultados obtidos em 11 gerações amostradas, em intervalos de três gerações. Indivíduos amostrados nas gerações de número 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 foram submetidos à análise eletroforética. Os resultados permitiram comparar as frequências observadas e as esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, bem como, computar os valores adaptativos de cada genótipo.

A. Frequências gênicas e genotípicas

As Tabelas 1 a 5 e a Figura 1 mostram os resultados obtidos a partir das análises eletroforéticas, das três réplicas, de cinco populações experimentais, fundadas com frequências gênicas iniciais diferentes: população **A** - 50,00% Est^S : 50,00% Est^F ; população **B** - 25,00% Est^S : 75,00% Est^F ; população **C** - 75,00% Est^S : 25,00% Est^F ; população **D** - 12,50% Est^S : 87,50% Est^F ; e, população **E** - 87,50% Est^S : 12,50% Est^F . São apresentadas as frequências percentuais dos genótipos homozigotos Est^S/Est^S e Est^F/Est^F e, heterozigotos (Est^S/Est^F e Est^F/Est^S), obtidas

em 11 gerações amostradas, das 30 gerações estudadas. São apresentadas também as freqüências dos alelos **Est^S** e **Est^F**, calculadas da análise de um total de 6780 indivíduos.

Os valores de χ^2 para homogeneidade das freqüências gênicas e genotípicas e de **G**, que representa o logaritmo da razão de verossimilhança entre estas freqüências, apresentados nestas cinco tabelas, foram calculados a partir dos valores absolutos obtidos em cada gel que originaram as freqüências gênicas e genotípicas. O número de indivíduos amostrados nas gerações de número 1, 3 e 6 foi de 44 (22 machos e 22 fêmeas) e, para as demais gerações, a amostra contou com 40 indivíduos (20 machos e 20 fêmeas). Quanto às freqüências gênicas, nas três primeiras gerações amostradas, foi considerado um total de 88 alelos amostrados e, nas demais gerações, um total de 80 alelos. Nas situações em que o cálculo de χ^2 não foi possível devido às restrições do teste em relação a números de indivíduos menores do que 5, os valores de **G** são apresentados sublinhados. A significância dos valores para estes dois testes é obtida na mesma tabela de χ^2 , para os mesmos graus de liberdade.

Dos valores percentuais de cada réplica, tanto para as freqüências genotípicas quanto para as freqüências gênicas, foram calculadas as médias e os respectivos erros padrões, para cada uma das cinco populações experimentais. De maneira geral, observa-se que as freqüências genotípicas dos homozigotos e heterozigotos variaram ao longo das gerações estudadas, tendendo a valores médios maiores para o genótipo **Est^S/Est^S** (52,50% na população **B** a 95,00% na população **E**; Tabelas 2 e 5, respectivamente), intermediários para os genótipos heterozigotos (5,00% na população **E** a 36,67% na população **B**; Tabelas 5 e 2, respectivamente) e menores para o genótipo **Est^F/Est^F** (zero na população **E** a 10,83% nas populações **A**, **B** e **D**; Tabelas 5, 1, 2 e 4, respectivamente), na 30^a geração.

Quanto às freqüências gênicas, os valores médios calculados para as cinco populações para a relação entre os alelos **Est^S** e **Est^F** mantiveram-se próximos a 75,00%:25,00%, respectivamente, na última geração. Por exemplo, na população **A**, 76,25%:23,75% (Tabela 1); na população **B**, 70,83%:29,17% (Tabela 2); e, na população **D**, 72,08%:27,92% (Tabela 4). Todavia, nas populações **C** (82,50%:17,50%) e **E** (97,50%:2,50%), podem ser observadas nas Tabelas 3 e 5, respectivamente, freqüências do alelo **Est^S** muito maiores na 30^a geração. Estas duas populações foram fundadas com freqüências iniciais do alelo **Est^S** maiores que as do outro alelo, respectivamente, 75,00% e 87,50% para 25,00% e 12,50%.

Na Figura 1 estão representadas graficamente os valores médios das freqüências genotípicas e gênicas, ao longo das 11 gerações amostradas. Sem exceções, as freqüências do alelo **Est^S** foram maiores ao final das 30 gerações, independente da freqüência inicial deste alelo. Nas populações que foram fundadas com freqüências de **Est^S** inferiores às do alelo **Est^F** (gráficos B e D, à direita), por volta da 12^a e 15^a geração, respectivamente, as freqüências de **Est^S** tornaram-se maiores que aquelas do alelo **Est^F**, permanecendo assim deste ponto até a 30^a geração.

Ainda na Figura 1, observa-se que as freqüências médias do genótipo **Est^F/Est^F** apresentaram tendência ao declínio, principalmente após a 15^a geração, excetuando-se a população **E** (gráfico E, à esquerda), cujas freqüências foram muito baixas desde a fundação da população, chegando a zero na 30^a geração. Os baixos valores percentuais observados para o alelo **Est^F** nesta população, principalmente nas últimas gerações, foram devidos aos raros heterozigotos que mantinham este alelo na população (Tabela 5).

Para testar se as freqüências genotípicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, as freqüências observadas para o estudo da população **A** foram comparadas com as freqüências esperadas (Material e Métodos), assumindo-se que sobre os alelos não estivessem atuando qualquer fator que modificasse as freqüências gênicas (Tabela 1). Foi observado um número maior de valores de χ^2 e de **G** significantes a partir de aproximadamente a metade do experimento (12^a geração), o que também pode ser observado nas médias das três réplicas. Também para as freqüências gênicas, os valores significantes ocorreram preferencialmente a partir da 12^a geração, refletindo o aumento significativo nas freqüências dos genótipos **Est^S/Est^S** com conseqüente redução nas freqüências de **Est^F/Est^F**.

Valores de χ^2 e de **G** altamente significantes foram observados nas comparações entre as freqüências observadas e esperadas da população **B** (Tabela 2), principalmente para as freqüências alélicas. As diferenças significantes entre os valores esperados (25,00% **Est^S**:75,00% **Est^F**) e observados para os alelos foram muito comuns (39 das 44 comparações), já a partir da 3^a geração. Por outro lado, para a população **C** (Tabela 3), a maioria das comparações realizadas para as freqüências alélicas (26 de 40) não foram significantes e nenhuma comparação entre as freqüências alélicas médias mostrou diferenças quanto ao esperado. Excetuando-se a réplica **c**, as comparações entre as freqüências genotípicas não puderam ser realizadas pelo teste de χ^2 devido às várias vezes que o número de indivíduos com genótipo **Est^F/Est^F** foi menor que cinco. Todavia, após o cálculo dos valores de **G**,

foram evidenciadas 21 diferenças significantes, dentre os 33 testes realizados. Em relação às médias, apenas três diferenças significantes foram observadas (gerações 12, 24 e 27), sendo duas delas ao nível de significância de 5% (gerações 12 e 24).

Quanto à população **D**, todas as comparações foram altamente significantes ($p < 0,01$). As frequências gênicas e genóticas esperadas não foram observadas desde a primeira geração. Finalmente, para a população **E**, não foi possível a realização de comparações entre os genótipos através do teste de χ^2 . As 44 comparações realizadas através do teste da razão de verossimilhança evidenciaram 33 diferenças significantes, das quais 20 ao nível de significância de 1%. Para os alelos, foram observadas 25 comparações significantes, 20 das quais ao nível de 1%.

Nas Figura 2 e 3 são apresentadas as imagens digitalizadas de cinco géis ilustrativos do padrão de bandas obtido para os genótipos homozigotos **Est^S/Est^S** e **Est^F/Est^F**, bem como para os heterozigotos. Foram escolhidos os géis que se apresentavam em melhores condições para a captura da imagem por meios eletrônicos. No gel 1 da Figura 2, representativo da análise da réplica **b** da população **A**, na primeira geração, podem ser observados as bandas de 27 indivíduos (61,36%) **Est^S/Est^S**, 14 (31,82%) heterozigotos e três (6,82%) **Est^F/Est^F**. O gel 2, desta mesma figura, ilustra a análise eletroforética da réplica **c** da população **B**, na primeira geração. Observa-se a ocorrência de dois indivíduos (4,54%) **Est^S/Est^S**, 16 (36,36%) heterozigotos e 26 (59,10%) **Est^F/Est^F**. No gel 3, são apresentados os resultados obtidos para a primeira geração da réplica **a** da população **C**, para a qual observam-se as bandas de 37 moscas (84,09%) **Est^S/Est^S**, seis (13,64%) heterozigotas e uma (2,27%) **Est^F/Est^F**. As correspondentes frequências alélicas foram 77,27% : 22,73% (gel 1), 22,73% : 77,27% (gel 2) e 90,91% : 9,09% (gel 3), respectivamente para a relação **Est^S : Est^F**.

A Figura 3 apresenta as imagens de dois géis: no primeiro (gel 1) são apresentados os resultados obtidos da análise da réplica **a** da população **D** à 12^a geração, ou seja, a ocorrência de quatro moscas (10,00%) **Est^S/Est^S**, 21 (52,50%) heterozigotas e 15 (37,50%) **Est^F/Est^F**, resultando na proporção 36,25% **Est^S : 63,75% Est^F**. No gel 2, representativo da réplica **a** da população **E**, na terceira geração, podem ser visualizados 34 indivíduos (77,28%) de genótipo **Est^S/Est^S**, oito (18,18%) heterozigotos e dois (4,54%) homozigotos **Est^F/Est^F**, o que resultou na proporção 86,36% **Est^S : 13,64% Est^F**.

Tabela 1. Frequências genotípicas e gênicas, observadas para as três réplicas da população A, fundadas com 50,00% Est^S :50,00% Est^F ($\bar{x} \pm s_x$: média $\pm$ erro padrão; χ^2 e G para homogeneidade das frequências; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; valores de G sublinhados).

Réplica	Geração	Frequências genotípicas (%)				Frequências gênicas (%)		
		Est^S/Est^S	Heterozigoto	Est^F/Est^F	χ^2 / G	Est^S	Est^F	χ^2
a	1	34,09	63,64	2,27	<u>18,01</u> **	65,91	34,09	8,92**
	3	15,91	72,73	11,36	9,27**	52,27	47,73	0,19
	6	36,36	40,91	22,73	3,09	56,82	43,18	1,65
	9	35,00	30,00	35,00	6,40*	50,00	50,00	0,01
	12	50,00	35,00	15,00	13,40**	67,50	32,50	9,81**
	15	45,00	37,50	17,50	8,55**	63,75	36,25	6,06**
	18	55,00	30,00	15,00	19,20**	70,00	30,00	12,81**
	21	55,00	30,00	15,00	19,20**	70,00	30,00	12,81**
	24	62,50	25,00	12,50	30,00**	75,00	25,00	20,01**
	27	67,50	20,00	12,50	38,60**	77,50	22,50	24,21**
	30	70,00	17,50	12,50	43,35**	78,75	21,25	26,46**
b	1	61,36	31,82	6,82	<u>28,04</u> **	77,27	22,73	26,19**
	3	47,73	36,36	15,91	12,18**	65,91	34,09	8,92**
	6	40,91	45,45	13,64	6,91*	53,64	46,36	6,56*
	9	40,00	40,00	20,00	4,80	60,00	40,00	3,21
	12	50,00	40,00	10,00	<u>13,26</u> **	70,00	30,00	12,81**
	15	45,00	40,00	15,00	8,80*	65,00	35,00	7,21**
	18	47,50	37,50	15,00	10,95**	66,25	33,75	8,46**
	21	50,00	35,00	15,00	13,40**	67,50	32,50	9,81**
	24	60,00	22,50	12,50	28,15**	71,25	28,75	18,36**
	27	60,00	30,00	10,00	<u>22,43</u> **	75,00	25,00	20,01**
	30	67,50	27,50	5,00	<u>34,04</u> **	81,25	18,75	31,26**
c	1	29,54	59,10	11,36	4,36	59,10	40,90	2,92
	3	27,27	61,37	11,36	4,50	57,96	42,04	2,24
	6	25,00	54,55	20,45	0,55	52,27	47,73	0,19
	9	30,00	50,00	20,00	0,80	57,50	42,50	0,81
	12	37,50	42,50	20,00	3,35	58,75	41,25	2,46
	15	47,50	37,50	15,00	10,95**	66,25	33,75	8,46**
	18	40,00	45,00	15,00	5,40	62,50	37,50	5,01*
	21	47,50	37,50	15,00	10,95**	66,25	33,75	8,46**
	24	52,50	32,50	15,00	16,15**	68,75	31,25	11,26**
	27	65,00	17,50	17,50	34,95**	73,75	26,25	18,06**
	30	52,50	32,50	15,00	16,15**	68,75	31,25	11,26**
$\bar{x} \pm s_x$	1	41,66 $\pm$ 9,94	51,52 $\pm$ 9,94	6,82 $\pm$ 2,62	<u>12,28</u> **	67,43 $\pm$ 5,30	32,57 $\pm$ 5,30	10,69**
	3	30,30 $\pm$ 9,31	56,82 $\pm$ 10,74	12,88 $\pm$ 1,52	3,49	58,71 $\pm$ 3,96	41,29 $\pm$ 3,96	2,68
	6	34,09 $\pm$ 4,73	46,97 $\pm$ 4,01	18,94 $\pm$ 2,73	2,18	54,28 $\pm$ 1,38	45,72 $\pm$ 1,38	2,03
	9	35,00 $\pm$ 2,89	40,00 $\pm$ 5,97	25,00 $\pm$ 5,00	2,40	55,83 $\pm$ 3,00	44,17 $\pm$ 3,00	0,81
	12	45,83 $\pm$ 4,17	39,17 $\pm$ 2,20	15,00 $\pm$ 2,89	9,48**	65,42 $\pm$ 3,41	34,58 $\pm$ 3,41	7,62**
	15	45,83 $\pm$ 0,83	38,33 $\pm$ 0,83	15,83 $\pm$ 0,83	9,38**	65,00 $\pm$ 0,72	35,00 $\pm$ 0,72	7,21**
	18	47,50 $\pm$ 4,33	37,50 $\pm$ 4,33	15,00 $\pm$ 0,00	10,95**	66,25 $\pm$ 2,16	33,75 $\pm$ 2,16	8,46**
	21	50,83 $\pm$ 2,20	34,17 $\pm$ 2,20	15,00 $\pm$ 0,00	14,28**	67,92 $\pm$ 1,91	32,08 $\pm$ 1,91	10,28**
	24	58,33 $\pm$ 3,00	26,67 $\pm$ 3,00	13,33 $\pm$ 0,83	24,31**	71,67 $\pm$ 3,15	28,33 $\pm$ 3,15	16,27**
	27	64,17 $\pm$ 2,20	22,50 $\pm$ 3,82	13,33 $\pm$ 2,20	32,78**	75,42 $\pm$ 1,91	24,58 $\pm$ 1,91	20,69**
	30	63,33 $\pm$ 5,46	25,83 $\pm$ 4,41	10,83 $\pm$ 3,00	31,39**	76,25 $\pm$ 6,61	23,75 $\pm$ 6,61	22,06**

Tabela 2. Frequências genotípicas e gênicas, observadas para as três réplicas da população **B**, fundadas com 25,00% Est^S :75,00% Est^F ($\bar{x} \pm s_x$: média $\pm$ erro padrão; χ^2 e **G** para homogeneidade das frequências; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; valores de **G** sublinhados).

Réplica	Geração	Frequências genotípicas (%)				Frequências gênicas (%)		
		Est^S/Est^S	Heterozigoto	Est^F/Est^F	χ^2 / G	Est^S	Est^F	χ^2
a	1	2,27	56,82	40,91	<u>7,29*</u>	30,68	69,32	1,38
	3	22,73	47,73	29,54	25,92**	46,59	53,41	21,32**
	6	15,91	68,18	15,91	33,13**	50,00	50,00	28,68**
	9	7,50	65,00	27,50	<u>13,95**</u>	40,00	60,00	9,22**
	12	37,50	42,50	20,00	72,11**	58,75	41,25	47,72**
	15	47,50	42,50	10,00	124,39**	68,75	31,25	80,52**
	18	37,50	42,50	20,00	72,11**	58,75	41,25	47,72**
	21	42,50	37,50	20,00	93,44**	61,25	38,75	55,12**
	24	52,50	35,00	12,50	150,58**	70,00	30,00	85,22**
	27	47,50	32,50	20,00	118,51**	63,75	36,25	63,05**
	30	52,50	32,50	15,00	149,27**	68,75	31,25	80,52**
b	1	6,82	54,54	38,64	<u>5,74</u>	34,09	65,91	3,65
	3	22,73	52,27	25,00	29,31**	48,86	51,14	26,11**
	6	29,54	52,28	18,18	54,82**	55,68	44,32	43,37**
	9	45,00	42,50	12,50	109,98**	66,25	33,75	71,52**
	12	45,00	45,00	10,00	<u>63,81**</u>	67,50	32,50	75,95**
	15	65,00	27,50	7,50	<u>102,86**</u>	78,75	21,25	121,85**
	18	52,50	32,50	15,00	149,27**	68,75	31,25	80,52**
	21	50,00	35,00	15,00	134,67**	67,50	32,50	75,95**
	24	47,50	40,00	12,50	122,58**	67,50	32,50	75,95**
	27	57,50	30,00	12,50	182,31**	72,50	27,50	95,02**
	30	47,50	40,00	12,50	122,58**	67,50	32,50	75,95**
c	1	4,54	36,36	59,10	<u>0,30</u>	22,73	77,27	0,32
	3	2,27	36,36	61,37	<u>1,69</u>	20,46	79,54	1,11
	6	22,73	27,27	50,00	21,53**	36,36	63,64	5,77*
	9	15,00	35,00	50,00	5,24	30,00	70,00	2,22
	12	32,50	35,00	32,50	48,18**	47,50	52,50	26,02**
	15	27,50	32,50	40,00	31,04**	43,75	56,25	14,52**
	18	30,00	52,50	17,50	49,18**	56,25	43,75	40,85**
	21	32,50	45,00	22,50	52,80**	55,00	45,00	37,62**
	24	50,00	40,00	10,00	<u>71,42**</u>	70,00	30,00	82,22**
	27	67,50	25,00	7,50	<u>108,30**</u>	80,00	20,00	127,62**
	30	57,50	37,50	5,00	<u>92,40**</u>	76,25	23,75	110,72**
$\bar{x} \pm s_x$	1	4,54 $\pm$ 1,31	49,24 $\pm$ 6,47	46,22 $\pm$ 6,47	<u>2,66</u>	29,16 $\pm$ 3,37	70,84 $\pm$ 3,37	0,72**
	3	15,91 $\pm$ 6,82	45,45 $\pm$ 4,73	38,64 $\pm$ 11,44	9,74**	38,64 $\pm$ 9,11	61,36 $\pm$ 9,11	8,38**
	6	22,73 $\pm$ 3,93	49,24 $\pm$ 11,91	28,03 $\pm$ 11,00	29,30**	47,35 $\pm$ 5,73	52,65 $\pm$ 5,73	22,86**
	9	22,50 $\pm$ 11,46	47,50 $\pm$ 9,01	30,00 $\pm$ 10,90	22,87**	45,42 $\pm$ 10,81	54,58 $\pm$ 10,81	18,72**
	12	38,33 $\pm$ 3,63	40,83 $\pm$ 3,00	20,83 $\pm$ 6,51	74,90**	57,92 $\pm$ 5,79	42,08 $\pm$ 5,79	47,71**
	15	46,67 $\pm$ 10,83	34,17 $\pm$ 4,41	19,17 $\pm$ 10,44	114,46**	63,75 $\pm$ 10,41	36,25 $\pm$ 10,41	63,06**
	18	40,00 $\pm$ 6,61	42,50 $\pm$ 5,77	17,50 $\pm$ 1,44	83,84**	61,25 $\pm$ 3,82	38,75 $\pm$ 3,82	55,12**
	21	41,67 $\pm$ 5,07	39,17 $\pm$ 3,00	19,17 $\pm$ 2,20	90,10**	61,25 $\pm$ 3,61	38,75 $\pm$ 3,61	55,12**
	24	50,00 $\pm$ 1,44	38,33 $\pm$ 1,67	11,67 $\pm$ 0,83	<u>69,14**</u>	69,17 $\pm$ 0,83	30,83 $\pm$ 0,83	82,06**
	27	57,50 $\pm$ 5,77	29,17 $\pm$ 2,20	13,33 $\pm$ 3,63	181,94**	72,08 $\pm$ 4,70	27,92 $\pm$ 4,70	93,35**
	30	52,50 $\pm$ 2,89	36,67 $\pm$ 2,20	10,83 $\pm$ 3,00	<u>74,46**</u>	70,83 $\pm$ 2,73	29,17 $\pm$ 2,73	88,43**

Tabela 3. Frequências genotípicas e gênicas, observadas para as três réplicas da população **C**, fundadas com 75,00% Est^S :25,00% Est^F ($\bar{x} \pm s_x$: média $\pm$ erro padrão; χ^2 e **G** para homogeneidade das frequências; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; valores de **G** sublinhados).

Réplica	Geração	Frequências genotípicas (%)				Frequências gênicas (%)		
		Est^S/Est^S	Heterozigoto	Est^F/Est^F	χ^2 / G	Est^S	Est^F	χ^2
a	1	84,09	13,64	2,27	<u>15,59</u> **	90,91	9,09	12,32**
	3	72,73	27,27	0,00	<u>8,80</u> *	86,36	13,64	6,38*
	6	52,28	36,36	11,36	1,98	70,45	29,55	0,86
	9	20,00	67,50	12,50	21,44**	53,75	46,25	18,72**
	12	72,50	20,00	7,50	<u>5,76</u>	82,50	17,50	2,62
	15	60,00	37,50	2,50	<u>1,26</u>	73,75	26,25	0,72
	18	52,50	40,00	7,50	<u>0,26</u>	72,50	27,50	0,22
	21	60,00	35,00	5,00	<u>0,27</u>	77,50	22,50	0,35
	24	75,00	17,50	7,50	<u>7,68</u> *	83,75	16,25	3,52
	27	77,50	17,50	5,00	<u>8,31</u> *	86,25	13,75	5,72*
	30	67,50	27,50	5,00	<u>2,13</u>	81,25	18,75	1,85
b	1	47,73	52,27	0,00	<u>8,38</u> *	73,86	26,14	0,05
	3	59,09	34,09	6,82	<u>0,22</u>	76,14	23,86	0,11
	6	52,27	47,73	0,00	<u>6,76</u> *	76,14	23,86	0,11
	9	90,00	10,00	0,00	<u>23,27</u> **	95,00	5,00	<u>23,06</u> **
	12	72,50	20,00	7,50	<u>5,76</u>	82,50	17,50	2,62
	15	70,00	30,00	0,00	<u>6,89</u> *	85,00	15,00	4,55*
	18	70,00	20,00	10,00	<u>5,95</u>	80,00	20,00	1,22
	21	75,00	20,00	5,00	<u>6,31</u> *	85,00	15,00	4,55*
	24	70,00	17,50	12,50	8,11*	78,75	21,25	0,72
	27	85,00	7,50	7,50	<u>19,51</u> **	88,75	11,25	8,45**
	30	72,50	20,00	7,50	<u>10,46</u> **	82,50	17,50	2,62
c	1	38,64	52,27	9,09	<u>5,50</u>	64,77	35,23	4,65*
	3	31,82	45,45	22,73	24,53**	54,54	45,46	19,11**
	6	34,04	52,27	13,64	10,26**	60,22	39,78	9,88**
	9	32,50	55,00	12,50	9,78**	60,00	40,00	9,22**
	12	27,50	37,50	35,00	58,78**	46,25	53,75	34,52**
	15	45,00	35,00	20,00	13,07**	61,25	38,75	6,35*
	18	50,00	35,00	15,00	5,24	67,50	32,50	2,22
	21	72,50	17,50	10,00	<u>7,81</u> *	81,25	18,75	1,85
	24	77,50	20,00	2,50	<u>7,98</u> *	87,50	12,50	7,02**
	27	72,50	15,00	12,50	9,78**	87,50	12,50	1,22
	30	72,50	22,50	5,00	<u>4,63</u>	83,75	16,25	3,52
$\bar{x} \pm s_x$	1	56,82 $\pm$ 13,88	39,39 $\pm$ 12,88	3,79 $\pm$ 2,73	<u>0,54</u>	76,51 $\pm$ 7,66	23,49 $\pm$ 7,66	0,16
	3	54,55 $\pm$ 12,03	35,60 $\pm$ 5,30	9,85 $\pm$ 6,73	<u>0,82</u>	72,35 $\pm$ 9,38	27,65 $\pm$ 9,38	0,27
	6	46,20 $\pm$ 6,08	45,45 $\pm$ 4,73	8,33 $\pm$ 4,22	<u>1,81</u>	68,94 $\pm$ 4,66	31,06 $\pm$ 4,66	1,58
	9	48,50 $\pm$ 21,27	44,17 $\pm$ 17,46	8,33 $\pm$ 4,17	<u>1,95</u>	69,58 $\pm$ 12,84	30,42 $\pm$ 12,84	1,00
	12	57,50 $\pm$ 15,00	25,83 $\pm$ 5,83	16,67 $\pm$ 9,17	8,41*	70,42 $\pm$ 12,08	29,58 $\pm$ 12,08	0,79
	15	58,33 $\pm$ 7,26	34,17 $\pm$ 2,20	7,50 $\pm$ 6,29	<u>0,26</u>	73,33 $\pm$ 6,86	26,67 $\pm$ 6,86	0,04
	18	57,50 $\pm$ 6,29	31,67 $\pm$ 6,01	10,83 $\pm$ 2,20	<u>1,49</u>	73,33 $\pm$ 3,63	26,67 $\pm$ 3,63	0,09
	21	69,16 $\pm$ 4,64	24,17 $\pm$ 5,46	6,67 $\pm$ 1,67	<u>3,28</u>	81,25 $\pm$ 2,16	18,75 $\pm$ 2,16	1,85
	24	74,17 $\pm$ 2,20	18,33 $\pm$ 0,83	7,50 $\pm$ 2,89	<u>7,01</u> *	83,33 $\pm$ 2,53	16,67 $\pm$ 2,53	3,20
	27	78,33 $\pm$ 3,63	13,33 $\pm$ 3,00	8,33 $\pm$ 2,20	<u>11,62</u> **	87,50 $\pm$ 0,72	12,50 $\pm$ 0,72	4,55
	30	70,83 $\pm$ 1,67	23,33 $\pm$ 2,20	5,83 $\pm$ 1,59	<u>3,89</u>	82,50 $\pm$ 0,72	17,50 $\pm$ 0,72	2,62

Tabela 4. Frequências genotípicas e gênicas, observadas para as três réplicas da população D, fundadas com 12,50% Est^S :87,50% Est^F ($\bar{x} \pm S_x$: média $\pm$ erro padrão; χ^2 e G para homogeneidade das frequências; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; valores de G sublinhados).

Réplica	Geração	Frequências genotípicas (%)				Frequências gênicas (%)		
		Est^S/Est^S	Heterozigoto	Est^F/Est^F	χ^2 / G	Est^S	Est^F	χ^2
a	1	29,54	29,54	40,92	228,99**	44,32	55,68	79,30**
	3	25,00	59,09	15,91	203,69**	54,54	45,46	139,38**
	6	11,90	45,24	42,86	44,64**	34,52	65,48	36,05**
	9	7,50	37,50	55,00	<u>11,07</u> **	26,25	73,75	12,92**
	12	10,00	52,50	37,50	<u>30,27</u> **	36,25	63,75	39,66**
	15	30,00	45,00	25,00	230,69**	52,50	47,50	114,31**
	18	40,00	45,00	15,00	407,80**	62,50	37,50	179,46**
	21	35,00	45,00	20,00	312,72**	57,50	42,50	145,06**
	24	37,50	47,50	15,00	362,43**	61,25	38,75	170,51**
	27	47,50	35,00	17,50	561,60**	65,00	35,00	198,03**
	30	55,00	35,00	10,00	<u>153,91</u> **	72,50	28,50	259,23**
b	1	11,36	54,55	34,09	58,89**	50,00	50,00	53,20**
	3	36,36	43,19	20,45	368,28**	57,95	42,05	163,14**
	6	31,82	47,73	20,45	289,31**	55,68	44,32	147,09**
	9	32,50	50,00	17,50	277,71**	60,00	40,00	145,06**
	12	15,00	65,00	20,00	96,95**	47,50	52,50	87,23**
	15	35,00	52,50	12,50	324,82**	63,75	36,25	170,51**
	18	32,50	50,00	17,50	277,71**	57,50	42,50	145,06**
	21	40,00	45,00	15,00	407,80**	62,50	37,50	179,46**
	24	40,00	42,50	17,50	404,23**	61,25	38,75	170,51**
	27	52,50	35,00	12,50	688,82**	70,00	30,00	237,91**
	30	57,50	30,00	12,50	823,67**	72,50	27,50	259,23**
c	1	15,91	54,55	29,54	92,13**	43,18	56,82	73,66**
	3	18,18	50,00	31,82	105,19**	43,18	56,82	73,66**
	6	9,09	52,27	38,64	42,81**	35,22	64,78	40,03**
	9	45,00	40,00	15,00	508,83**	65,00	35,00	198,03**
	12	22,50	67,50	10,00	<u>92,72</u> **	56,25	43,75	137,03**
	15	30,00	40,00	30,00	224,36**	50,00	50,00	100,31**
	18	30,00	50,00	20,00	238,20**	55,00	45,00	129,23**
	21	35,00	45,00	20,00	312,72**	57,50	42,50	145,06**
	24	45,00	40,00	15,00	508,83**	65,00	35,00	198,03**
	27	65,00	25,00	10,00	<u>180,66</u> **	77,50	22,50	304,60**
	30	52,50	37,50	10,00	<u>147,83</u> **	71,25	28,75	248,46**
$\bar{x} \pm S_x$	1	18,94 $\pm$ 5,46	46,21 $\pm$ 8,34	34,85 $\pm$ 3,30	106,95**	45,83 $\pm$ 2,11	54,17 $\pm$ 2,11	68,24**
	3	26,51 $\pm$ 5,30	50,76 $\pm$ 4,61	22,73 $\pm$ 4,73	208,70**	51,89 $\pm$ 4,46	48,11 $\pm$ 4,46	122,16**
	6	17,60 $\pm$ 7,16	48,41 $\pm$ 2,06	33,98 $\pm$ 6,88	97,01**	41,81 $\pm$ 6,95	58,19 $\pm$ 6,95	67,12**
	9	28,33 $\pm$ 11,02	42,50 $\pm$ 3,82	29,17 $\pm$ 12,94	202,94**	50,42 $\pm$ 12,17	49,58 $\pm$ 12,17	98,05**
	12	15,83 $\pm$ 3,63	61,67 $\pm$ 4,64	22,50 $\pm$ 8,04	96,64**	46,67 $\pm$ 5,79	53,33 $\pm$ 5,79	83,06**
	15	31,67 $\pm$ 1,67	45,83 $\pm$ 3,63	22,50 $\pm$ 5,20	257,82**	55,42 $\pm$ 4,23	44,58 $\pm$ 4,23	126,69**
	18	34,17 $\pm$ 3,00	48,33 $\pm$ 1,67	17,50 $\pm$ 1,44	303,21**	58,33 $\pm$ 2,20	41,67 $\pm$ 2,20	150,55**
	21	36,67 $\pm$ 1,67	45,00 $\pm$ 0,00	18,33 $\pm$ 1,67	343,02**	59,17 $\pm$ 1,67	40,83 $\pm$ 1,67	156,14**
	24	40,83 $\pm$ 2,20	43,33 $\pm$ 2,20	15,83 $\pm$ 0,83	422,42**	62,50 $\pm$ 1,25	37,50 $\pm$ 1,25	179,43**
	27	55,00 $\pm$ 5,20	31,67 $\pm$ 3,33	13,33 $\pm$ 2,20	753,67**	70,83 $\pm$ 3,63	29,17 $\pm$ 3,63	244,93**
	30	55,00 $\pm$ 1,44	34,17 $\pm$ 2,20	10,83 $\pm$ 0,83	<u>152,30</u> **	72,08 $\pm$ 0,42	27,92 $\pm$ 0,42	255,63**

Tabela 5. Frequências genotípicas e gênicas, observadas para as três réplicas da população **E**, fundadas com 87,50% **Est^S**:12,50% **Est^F** ($\bar{x} \pm s_x$: média $\pm$ erro padrão; χ^2 e **G** para homogeneidade das frequências; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; valores de **G** sublinhados).

Réplica	Geração	Frequências genotípicas (%)				Frequências gênicas (%)		
		Est^S/Est^S	Heterozigoto	Est^F/Est^F	χ^2 / G	Est^S	Est^F	χ^2
a	1	70,45	29,55	0,00	<u>2,66</u>	85,22	14,78	0,29
	3	77,28	18,18	4,54	<u>1,93</u>	86,36	13,64	0,05
	6	79,55	15,91	4,54	<u>2,48</u>	87,50	12,50	0,03
	9	97,50	2,50	0,00	<u>14,51**</u>	98,75	1,25	<u>14,51**</u>
	12	95,00	5,00	0,00	<u>10,48**</u>	97,50	2,50	<u>10,44**</u>
	15	82,50	15,00	2,50	<u>1,35</u>	90,00	10,00	0,66
	18	95,00	5,00	0,00	<u>10,48**</u>	97,50	2,50	<u>10,44**</u>
	21	92,50	5,00	2,50	<u>9,03*</u>	95,00	5,00	<u>5,17*</u>
	24	90,00	7,50	2,50	<u>6,16*</u>	93,75	6,25	3,31
	27	90,00	7,50	2,50	<u>6,16*</u>	93,75	6,25	3,31
	30	95,00	5,00	0,00	<u>10,48**</u>	97,50	2,50	<u>10,44**</u>
b	1	75,00	25,00	0,00	<u>1,58</u>	87,50	12,50	0,03
	3	100,00	0,00	0,00	<u>23,52**</u>	100,00	0,00	<u>23,50**</u>
	6	77,27	20,45	2,27	<u>0,16</u>	87,50	12,50	0,03
	9	70,00	30,00	0,00	<u>2,55</u>	85,00	15,00	0,31
	12	97,50	2,50	0,00	<u>14,51**</u>	98,25	1,25	<u>13,61**</u>
	15	92,50	7,50	0,00	<u>7,56*</u>	92,50	7,50	<u>2,09</u>
	18	97,50	2,50	0,00	<u>14,51**</u>	98,75	1,25	<u>14,51**</u>
	21	97,50	2,50	0,00	<u>14,51**</u>	98,75	1,25	<u>14,51**</u>
	24	95,00	5,00	0,00	<u>10,48**</u>	97,50	2,50	<u>10,44**</u>
	27	95,00	2,50	2,50	<u>13,00**</u>	96,25	3,75	<u>7,45**</u>
	30	95,00	5,00	0,00	<u>10,48**</u>	97,50	2,50	<u>10,44**</u>
c	1	59,09	38,64	2,27	<u>6,61**</u>	78,40	21,60	6,05*
	3	63,64	34,09	2,27	<u>3,69</u>	80,68	19,32	3,30
	6	60,00	40,00	0,00	<u>8,37*</u>	85,00	15,00	4,57*
	9	60,00	32,50	7,50	<u>8,04*</u>	76,25	23,75	8,51**
	12	100,00	0,00	0,00	<u>21,35**</u>	100,00	0,00	<u>21,36**</u>
	15	87,50	7,50	5,00	<u>7,60*</u>	91,25	8,75	1,31
	18	92,50	7,50	0,00	<u>7,56*</u>	92,50	7,50	<u>2,09**</u>
	21	92,50	2,50	5,00	<u>14,33**</u>	93,75	6,25	3,31
	24	90,00	5,00	5,00	<u>10,41**</u>	92,50	7,50	2,09
	27	92,50	7,50	0,00	<u>7,56*</u>	96,25	3,75	<u>7,45**</u>
	30	95,00	5,00	0,00	<u>10,48**</u>	97,50	2,50	<u>10,44**</u>
$\bar{x} \pm s_x$	1	68,18 $\pm$ 4,73	31,06 $\pm$ 4,01	0,76 $\pm$ 0,76	<u>2,14</u>	83,71 $\pm$ 2,73	16,29 $\pm$ 2,73	0,92
	3	80,31 $\pm$ 10,60	17,42 $\pm$ 9,85	2,27 $\pm$ 1,31	<u>0,63</u>	89,01 $\pm$ 5,73	10,99 $\pm$ 5,73	0,32
	6	72,27 $\pm$ 6,17	25,45 $\pm$ 7,39	2,27 $\pm$ 1,31	<u>0,46</u>	86,67 $\pm$ 0,83	13,33 $\pm$ 0,83	0,36
	9	75,83 $\pm$ 11,21	21,67 $\pm$ 9,61	2,50 $\pm$ 2,50	<u>0,20</u>	86,67 $\pm$ 6,55	13,33 $\pm$ 6,55	0,02
	12	97,50 $\pm$ 1,44	2,50 $\pm$ 1,44	0,00 $\pm$ 0,00	<u>14,51**</u>	98,58 $\pm$ 0,74	1,42 $\pm$ 0,74	<u>13,86**</u>
	15	87,50 $\pm$ 2,89	10,00 $\pm$ 2,50	2,50 $\pm$ 1,44	<u>4,03</u>	91,25 $\pm$ 0,72	8,75 $\pm$ 0,72	2,20
	18	95,00 $\pm$ 1,44	5,00 $\pm$ 1,44	0,00 $\pm$ 0,00	<u>10,48**</u>	96,08 $\pm$ 1,91	3,92 $\pm$ 1,91	<u>7,11**</u>
	21	94,17 $\pm$ 1,67	3,33 $\pm$ 0,83	2,50 $\pm$ 1,44	<u>11,52**</u>	95,83 $\pm$ 1,50	4,17 $\pm$ 1,50	<u>6,62**</u>
	24	91,67 $\pm$ 1,67	5,83 $\pm$ 0,83	2,50 $\pm$ 1,44	<u>7,98*</u>	94,58 $\pm$ 1,50	5,42 $\pm$ 1,50	<u>4,53*</u>
	27	92,50 $\pm$ 1,44	5,83 $\pm$ 1,67	1,67 $\pm$ 0,83	<u>7,91*</u>	95,42 $\pm$ 0,83	4,58 $\pm$ 0,83	<u>5,87*</u>
	30	95,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	<u>10,48**</u>	97,50 $\pm$ 0,00	2,50 $\pm$ 0,00	<u>10,44**</u>

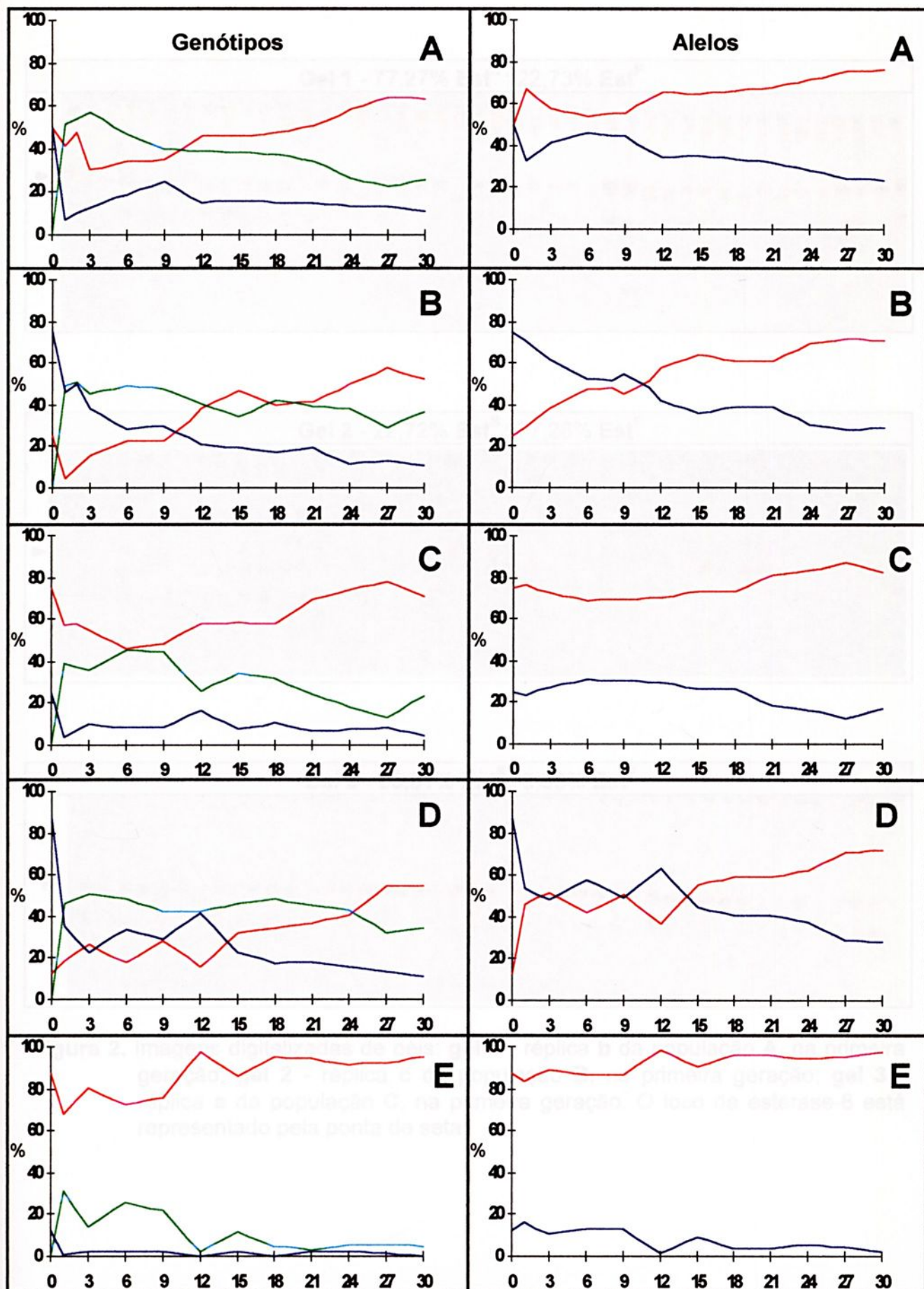


Figura 1. Variações das freqüências (%) gênicas (à direita) e genotípicas (à esquerda) médias das cinco populações experimentais (A, B, C, D e E) ao longo das 30 gerações estudadas (♦ Est^S/Est^S , ♦ heterozigotos, ♦ Est^S/Est^S , ♦ Est^S , ♦ Est^F).

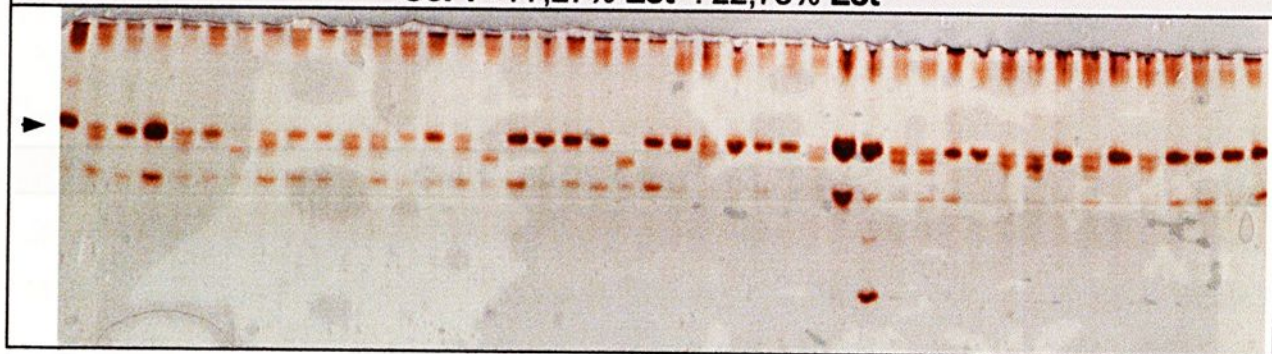
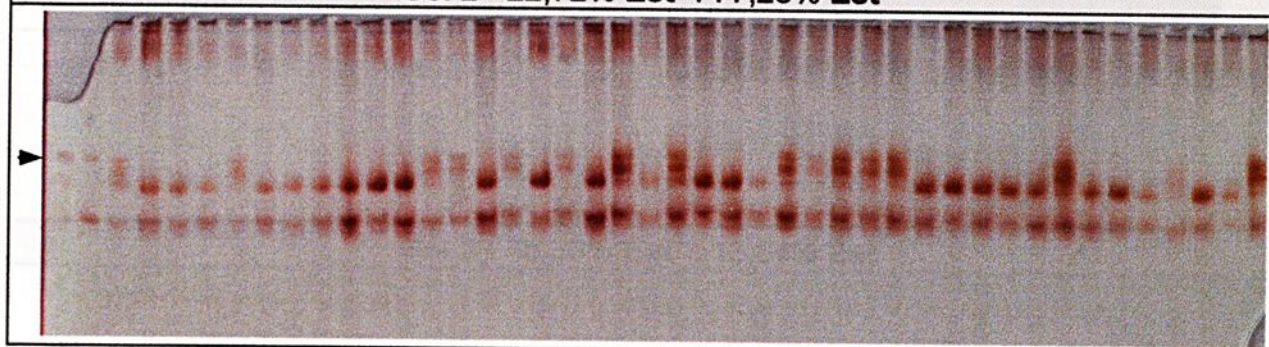
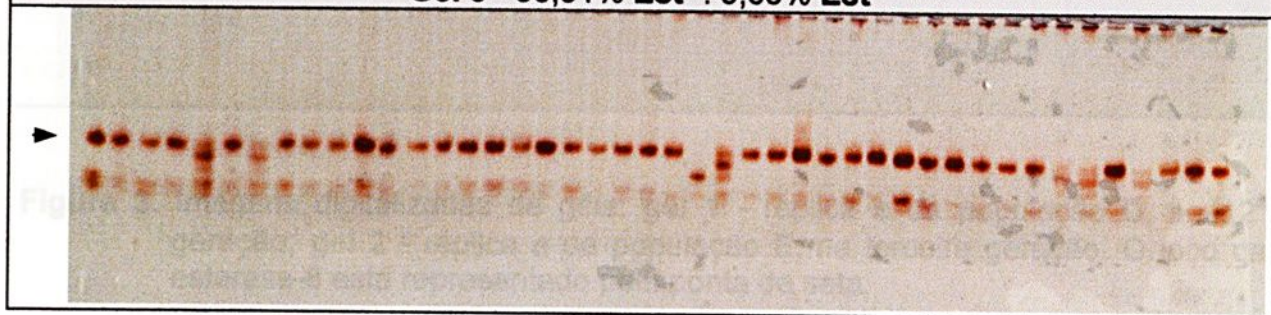
Gel 1 - 77,27% Est^S : 22,73% Est^FGel 2 - 22,72% Est^S : 77,28% Est^FGel 3 - 90,91% Est^S : 9,09% Est^F

Figura 2. Imagens digitalizadas de géis: **gel 1** - réplica **b** da população **A**, na primeira geração; **gel 2** - réplica **c** da população **B**, na primeira geração; **gel 3** - réplica **a** da população **C**, na primeira geração. O loco da esterase-8 está representado pela ponta de seta.

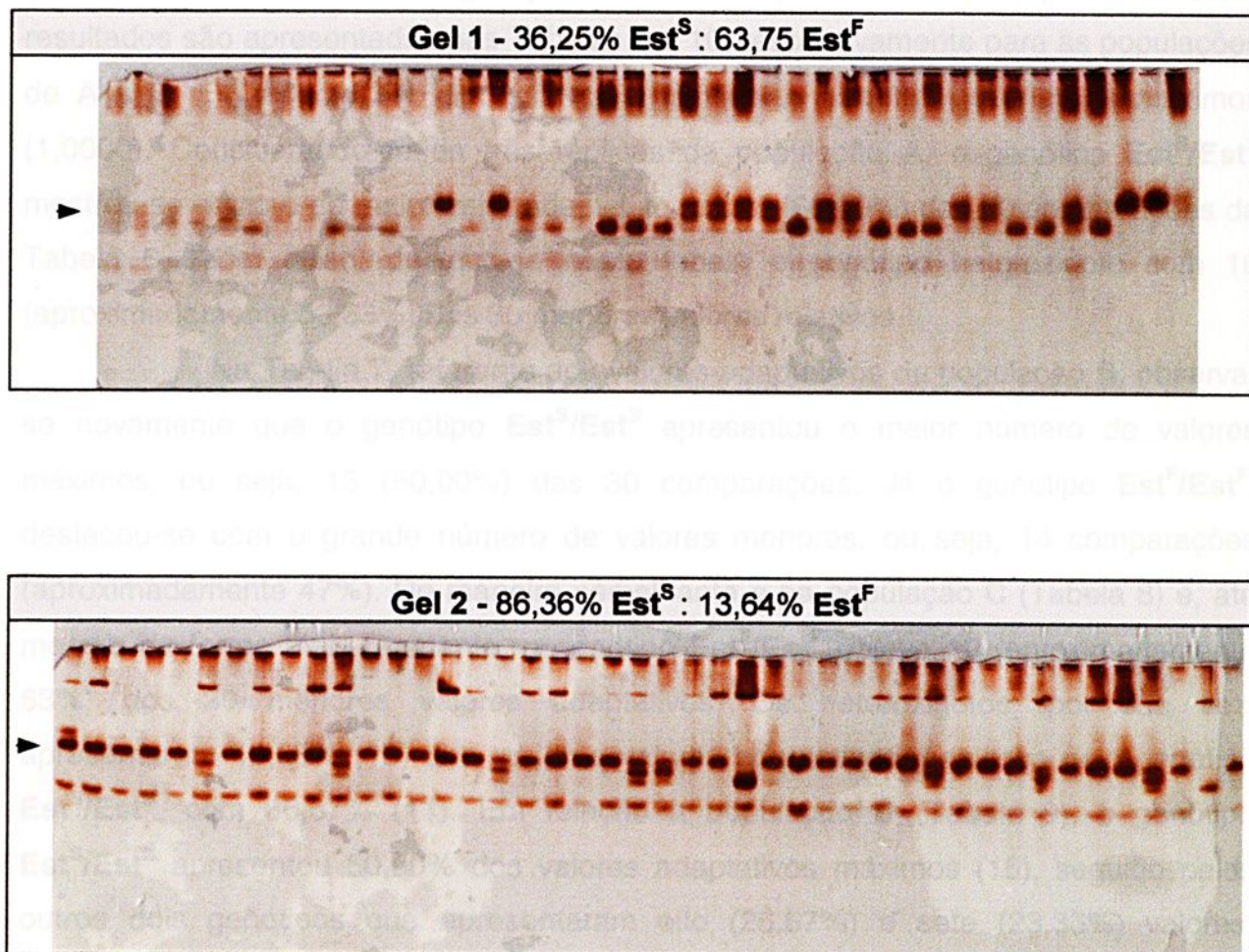


Figura 3. Imagens digitalizadas de géis: **gel 1** - réplica a da população D, na 12^a geração; **gel 2** - réplica a da população E, na terceira geração. O loco da esterase-8 está representado pela ponta de seta.

B. Valor adaptativo líquido das populações

Os valores adaptativos líquidos foram calculados a partir das frequências genotípicas obtidas nas 11 gerações amostradas, excluindo-se a primeira. Estes resultados são apresentados nas Tabelas 6 a 10, respectivamente para as populações de **A** a **E**. Em negrito são apresentados os valores adaptativos relativos máximos (1,0000). Considerando-se as três réplicas da população **A**, o genótipo **Est^S/Est^S** mostrou-se como o de maior valor adaptativo em 18 (60,00%) das 30 comparações da Tabela 6. Além disso, destaca-se nesta tabela o genótipo heterozigoto com 16 (aproximadamente 53,33%) dos 30 menores valores relativos.

Na Tabela 7, referente aos valores adaptativos da população **B**, observa-se novamente que o genótipo **Est^S/Est^S** apresentou o maior número de valores máximos, ou seja, 15 (50,00%) das 30 comparações. Já o genótipo **Est^F/Est^F**, destacou-se com o grande número de valores menores, ou seja, 14 comparações (aproximadamente 47%). De maneira semelhante e na população **C** (Tabela 8) e, até mesmo de forma mais marcante, o genótipo **Est^F/Est^F** obteve 19 (aproximadamente 63%) dos 30 menores valores adaptativos. Os heterozigotos, por sua vez, apresentaram 43,33% (13) dos maiores valores adaptativos, seguidos pelo genótipo **Est^S/Est^S**, com 36,67% (11). Em relação à população **D** (Tabela 9), o genótipo **Est^S/Est^S** apresentou 50,00% dos valores adaptativos máximos (15), seguido pelos outros dois genótipos que apresentaram oito (26,67%) e sete (23,33%) valores, respectivamente para os heterozigotos e os homozigotos **Est^F/Est^F**. Este último genótipo destacou-se por apresentar 13 (43,33%) dos menores valores.

Como reflexo do grande número de ausências do genótipo **Est^F/Est^F** ao longo das gerações da população **E** (Tabela 5), na Tabela 10 podem ser observados muitos valores adaptativos iguais a zero para este genótipo, ocasionando a maior incidência dos menores valores (25 de 30). Dentre os maiores valores, o genótipo **Est^S/Est^S** apresentou-se 19 vezes (63,33%).

Na Tabela 11, são apresentados os valores adaptativos líquidos médios, de cada uma das três réplicas, das cinco populações, calculados a partir dos valores das Tabelas 6 a 10, juntamente com as médias das médias das três réplicas. Nesta tabela, pode ser observado que os valores adaptativos médios do genótipo **Est^S/Est^S** foram superiores em todos os casos de comparações entre as réplicas, excetuando-se a réplica **a** da população **C**, para a qual o genótipo heterozigoto apresentou o maior



valor (0,7504). De maneira geral, os valores dos genótipos heterozigotos foram intermediários entre os dos outros genótipos, com exceção das réplicas da população **A**, para a qual os valores dos heterozigotos foram os menores.

Em relação às médias das três réplicas, o genótipo **Est^S/Est^S** apresentou os maiores valores (1,0000) em todas as populações, excetuando-se, novamente, a população **C**, pela razão já relatada. Todavia, os dois valores observados diferem em apenas 0,4% (1,0000 para **Est^S/Est^F** e 0,9960 para **Est^S/Est^S**). Para as populações **B**, **D** e **E**, os valores médios do genótipo **Est^S/Est^S** foram superiores aos dos heterozigotos em cerca de 17%, 11% e 22%, respectivamente. Para a população **A**, a diferença entre estes dois genótipos foi de 13%; entretanto, o valor para o homozigoto **Est^F/Est^F** (0,9727) foi intermediário aos anteriores, suplantando em cerca de 10% o valor do heterozigoto. Este último genótipo apresentou para todas as demais populações, os menores valores relativos, que variaram de 0,1608 (população **E**) a 0,8474 (população **D**).

a	3	1,0000	0,7407	0,9259
	6	1,0000	0,8438	0,9043
	9	0,3334	0,1898	1,0000
	12	0,6857	1,0000	0,6659
	15	0,6668	0,6902	1,0000
	18	1,0000	0,8040	0,8000
	21	0,6000	0,6667	1,0000
	24	1,0000	0,8382	0,8474
	27	1,0000	0,8567	0,9300
	30	1,0000	0,9357	0,9944
b	3	0,7504	1,0000	0,6000
	6	1,0000	0,8148	0,4444
	9	0,8290	1,0000	0,9630
	12	0,5093	0,4928	1,0000
	15	1,0000	0,7628	0,8150
	18	1,0000	0,6800	0,8000
	21	1,0000	0,6906	0,5921
	24	0,7018	1,0000	0,8333
	27	1,0000	0,7018	0,8421
	30	1,0000	0,7841	0,9648
c	3	1,0000	0,4349	0,9423
	6	1,0000	1,0000	0,4615
	9	0,8290	1,0000	0,9630
	12	0,5093	0,4928	1,0000
	15	1,0000	0,7628	0,8150
	18	1,0000	0,6800	0,8000
	21	1,0000	0,6906	0,5921
	24	0,7018	1,0000	0,8333
	27	1,0000	0,7018	0,8421
	30	1,0000	0,7841	0,9648

Tabela 6. Valores adaptativos líquidos dos três genótipos para cada réplica da população **A**, calculados a partir das frequências genotípicas das 11 gerações estudadas.

Réplica	Geração	Frequências genotípicas (%)		
		Est ^S /Est ^S	Heterozigoto	Est ^F /Est ^F
a	3	0,0933	0,2284	1,0000
	6	1,0000	0,2461	0,8755
	9	0,6251	0,4762	1,0000
	12	1,0000	0,8167	0,3000
	15	0,7714	0,9184	1,0000
	18	1,0000	0,6546	0,7013
	21	1,0000	1,0000	1,0000
	24	1,0000	0,7333	0,7333
	27	1,0000	0,7407	0,9259
	30	1,0000	0,8438	0,9643
b	3	0,3334	0,4898	1,0000
	6	0,6857	1,0000	0,6859
	9	0,6668	0,6002	1,0000
	12	1,0000	0,8000	0,4000
	15	0,6000	0,6667	1,0000
	18	1,0000	0,8882	0,9474
	21	1,0000	0,8867	0,9500
	24	1,0000	0,5357	0,6944
	27	0,7500	1,0000	0,6000
	30	1,0000	0,8148	0,4444
c	3	0,8890	1,0000	0,9630
	6	0,5093	0,4938	1,0000
	9	1,0000	0,7638	0,8150
	12	1,0000	0,6800	0,8000
	15	1,0000	0,6966	0,5921
	18	0,7018	1,0000	0,8333
	21	1,0000	0,7018	0,8421
	24	1,0000	0,7841	0,9048
	27	1,0000	0,4349	0,9423
	30	0,4349	1,0000	0,4615

Tabela 7. Valores adaptativos líquidos dos três genótipos para cada réplica da população **B**, calculados a partir das frequências genóticas das 11 gerações estudadas.

Réplica	Geração	Frequências genóticas (%)		
		Est ^S /Est ^S	Heterozigoto	Est ^F /Est ^F
a	3	1,0000	0,0839	0,0721
	6	0,4900	1,0000	0,3770
	9	0,2727	0,5516	1,0000
	12	1,0000	0,1308	0,1454
	15	1,0000	0,7895	0,3947
	18	0,3947	0,5000	1,0000
	21	1,0000	0,7786	0,8824
	24	1,0000	0,7556	0,5060
	27	0,5655	0,5804	1,0000
	30	1,0000	0,9048	0,6786
b	3	1,0000	0,2876	0,1942
	6	1,0000	0,7696	0,5596
	9	1,0000	0,5336	0,4514
	12	0,9444	1,0000	0,7556
	15	1,0000	0,4231	0,5192
	18	0,4038	0,5909	1,0000
	21	0,8844	1,0000	0,9286
	24	0,8312	1,0000	0,7292
	27	1,0000	0,6196	0,8261
	30	0,6196	1,0000	0,7500
c	3	0,4815	0,9630	1,0000
	6	1,0000	0,0749	0,0814
	9	0,5142	1,0000	0,7791
	12	1,0000	0,4615	0,3000
	15	0,6875	0,7545	1,0000
	18	0,6753	1,0000	0,2708
	21	0,8426	0,6667	1,0000
	24	1,0000	0,5778	0,2889
	27	1,0000	0,4630	0,5556
	30	0,56790	1,0000	0,4444

Tabela 8 Valores adaptativos líquidos dos três genótipos para cada réplica da população **C**, calculados a partir das freqüências genotípicas das 11 gerações estudadas.

Réplica	Geração	Freqüências genotípicas (%)		
		Est ^S /Est ^S	Heterozigoto	Est ^F /Est ^F
a	3	0,4326	1,0000	0,0000
	6	0,5391	1,0000	0,0000
	9	0,2061	1,0000	0,5927
	12	1,0000	0,0817	0,1655
	15	0,4414	1,0000	0,1778
	18	0,2917	0,3556	1,0000
	21	1,0000	0,7656	0,5833
	24	0,8333	0,3333	1,0000
	27	1,0000	0,9677	0,6452
	30	0,5542	1,0000	0,2546
b	3	1,0000	0,5268	0,0000
	6	0,6318	1,0000	0,0000
	9	1,0000	0,1217	0,0000
	12	0,4028	1,0000	0,0000
	15	0,6437	1,0000	0,0000
	18	1,0000	0,6667	0,0000
	21	1,0000	0,9333	0,4667
	24	0,3733	0,3500	1,0000
	27	1,0000	0,3529	0,4941
	30	0,3198	1,0000	0,3750
c	3	0,3293	0,3477	1,0000
	6	0,9302	1,0000	0,5218
	9	0,9074	1,0000	0,8709
	12	0,3022	0,2435	1,0000
	15	1,0000	0,5704	0,3492
	18	1,0000	0,9000	0,6750
	21	1,0000	0,3448	0,4598
	24	0,9353	1,0000	0,2188
	27	0,1871	0,1500	1,0000
	30	0,6667	1,0000	0,2667

Tabela 9. Valores adaptativos líquidos dos três genótipos para cada réplica da população **D**, calculados a partir das frequências genotípicas das 11 gerações estudadas.

Réplica	Geração	Frequências genotípicas (%)		
		Est ^S /Est ^S	Heterozigoto	Est ^F /Est ^F
a	3	0,4231	1,0000	0,1944
	6	0,1767	0,2842	1,0000
	9	0,4911	0,6460	1,0000
	12	0,9524	1,0000	0,4870
	15	1,0000	0,2857	0,2222
	18	1,0000	0,7500	0,4500
	21	0,6562	0,7500	1,0000
	24	1,0000	0,9852	0,7000
	27	1,0000	0,5817	0,9210
	30	1,0000	0,8636	0,4935
b	3	1,0000	0,2474	0,1874
	6	0,7919	1,0000	0,9049
	9	0,9750	1,0000	0,8169
	12	0,3550	1,0000	0,8791
	15	1,0000	0,3462	0,2679
	18	0,6633	0,6803	1,0000
	21	1,0000	0,7312	0,6964
	24	0,8571	0,8095	1,0000
	27	1,0000	0,6274	0,5442
	30	1,0000	0,7826	0,9130
c	3	1,0000	0,8022	0,9427
	6	0,4118	0,8609	1,0000
	9	1,0000	0,1546	0,0784
	12	0,2963	1,0000	0,3951
	15	0,4444	0,1975	1,0000
	18	0,8000	1,0000	0,5333
	21	1,0000	0,7714	0,8571
	24	1,0000	0,6914	0,5833
	27	1,0000	0,4327	0,4615
	30	0,5385	1,0000	0,6667

Tabela 10. Valores adaptativos líquidos dos três genótipos para cada réplica da população E, calculados a partir das frequências genóticas das 11 gerações estudadas.

Réplica	Geração	Frequências genóticas (%)		
		Est ^S /Est ^S	Heterozigoto	Est ^F /Est ^F
a	3	1,0000	0,5608	0,0000
	6	1,0000	0,8502	0,9715
	9	1,0000	0,1282	0,0000
	12	0,4872	1,0000	0,0000
	15	0,2895	1,0000	0,0000
	18	1,0000	0,2895	0,0000
	21	0,9737	1,0000	0,0000
	24	0,6486	1,0000	0,6667
	27	1,0000	1,0000	1,0000
	30	1,0000	0,6316	0,0000
b	3	1,0000	0,0000	0,0000
	6	1,0000	0,0000	0,0000
	9	0,6175	1,0000	0,0000
	12	1,0000	0,0598	0,0000
	15	0,3162	1,0000	0,0000
	18	1,0000	0,3162	0,0000
	21	1,0000	1,0000	0,0000
	24	0,4872	1,0000	0,0000
	27	1,0000	0,5000	0,0000
	30	0,5000	1,0000	0,0000
c	3	1,0000	0,8192	0,9285
	6	0,8035	1,0000	0,0000
	9	1,0000	0,8125	0,0000
	12	1,0000	0,0000	0,0000
	15	1,0000	0,0000	0,0000
	18	1,0000	0,9460	0,0000
	21	1,0000	0,3333	0,0000
	24	0,4865	1,0000	0,5000
	27	0,6852	1,0000	0,0000
	30	1,0000	0,6491	0,0000

C. Análise de Dependência

Tabela 11. Médias e erros padrões dos valores adaptativos líquidos médios de cada réplica e da média das médias das três réplicas (W'), calculados a partir das freqüências genótípicas das réplicas, das cinco populações, nas 10 gerações estudadas (os maiores valores adaptativos são destacados em negrito).

População/ Genótipo	Valores adaptativos médios						Médias						
	Réplica a			Réplica b			Réplica c			W'		W' relativo	
	$\bar{x}$	$\pm$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$\pm$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$\pm$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$\pm$		$S_{\bar{x}}$
A													
Est ^S /Est ^S	0,8490		0,0935	0,8036		0,0738	0,8535		0,0705	0,8354		0,0159	1,0000
Heterozigoto	0,6658		0,0846	0,7682		0,0586	0,7555		0,0636	0,7298		0,0322	0,8736
Est ^F /Est ^F	0,8500		0,0705	0,7722		0,0751	0,8154		0,0534	0,8126		0,0225	0,9727
B													
Est ^S /Est ^S	0,7723		0,0958	0,8683		0,0643	0,7769		0,0684	0,8058		0,0313	1,0000
Heterozigoto	0,6075		0,0968	0,7224		0,0852	0,6961		0,0979	0,6754		0,0348	0,8382
Est ^F /Est ^F	0,6056		0,1131	0,6714		0,0765	0,5720		0,1103	0,6163		0,0292	0,7648
C													
Est ^S /Est ^S	0,6298		0,0963	0,7371		0,0933	0,7258		0,1041	0,6976		0,0340	0,9960
Heterozigoto	0,7504		0,1123	0,6951		0,1066	0,6556		0,1134	0,7004		0,0275	1,0000
Est ^F /Est ^F	0,4419		0,1192	0,2336		0,1084	0,6362		0,0995	0,4372		0,1163	0,6242
D													
Est ^S /Est ^S	0,7700		0,0978	0,8642		0,0674	0,7491		0,0927	0,7944		0,0354	1,0000
Heterozigoto	0,7146		0,0851	0,7225		0,0830	0,6911		0,1018	0,7094		0,0094	0,8930
Est ^F /Est ^F	0,6468		0,1014	0,7210		0,0932	0,6518		0,0954	0,6732		0,0239	0,8474
E													
Est ^S /Est ^S	0,8399		0,0840	0,7921		0,0878	0,8975		0,0574	0,8432		0,0305	1,0000
Heterozigoto	0,7460		0,1039	0,5876		0,1453	0,6560		0,1271	0,6632		0,0459	0,7865
Est ^F /Est ^F	0,2638		0,1371	0,0000		0,0000	0,1428		0,1004	0,1356		0,0762	0,1608



C. Análise de Dependência

Foi aplicada a Análise de Dependência (ANADEP) para o estudo das possíveis interações entre genótipos e gerações, nas cinco populações experimentais fundadas. Para tanto, as médias das três réplicas, nas 11 gerações amostradas, foram submetidas à ANADEP e os resultados são apresentados nas Figuras 4 a 8. Os diagramas foram divididos em quatro quadrantes, segundo os dois principais fatores de dependência, que explicam a maior porcentagem da inércia total da distribuição. Desta forma, o diagrama ortogonal representa o primeiro plano de dependência (**FD1** x **FD2**). Cada fator de dependência também pode ser estudado separadamente se os valores das gerações ou dos genótipos forem projetados sobre os eixos ou vértices centrais. Os pontos localizados do lado direito e esquerdo da figura foram separados de acordo com o primeiro fator (**FD1**) e, aqueles localizados acima e abaixo do vértice central, distribuem-se de acordo com o segundo fator (**FD2**).

Na Figura 4 é apresentado o primeiro plano de dependência entre gerações e genótipos da população **A**, fundada com as frequências alélicas iniciais de 50% **Est^S** para 50% **Est^F**. O primeiro fator de dependência (vértice horizontal), que explica 78,10% da dependência total, associa as gerações G1, G3, G6 e G9 com os genótipos **Est^F/Est^F** e principalmente o heterozigoto, em contraposição ao genótipo homozigoto **Est^S/Est^S**, estando este muito associado com as gerações posteriores. Um segundo fator de dependência (vértice vertical), com 21,20% de explicação, contrapõe o genótipo **Est^F/Est^F** aos demais, associando-o particularmente à geração G9 que, como pode ser observado na Figura 1, mostrou um aumento considerável na frequência deste genótipo. Este segundo fator, é fortemente influenciado (86,17%) pelo genótipo **Est^F/Est^F**, ou seja, este fator pode ser considerado como um “fator homozigoto **Est^F/Est^F**. Todavia, para compor a explicação de 78,10% da inércia total, o primeiro fator de dependência contou com a forte influência das gerações G3 (24,52%) e G6 (10,78%), por um lado e, por outro, das gerações G27 (23,49%) e G30 (17,84%), evidenciando este fator como um “fator tempo”.

A análise de dependência (Figura 5) para as frequências genotípicas médias da população **B**, fundada a partir das frequências iniciais de 25% **Est^S** para 75% **Est^F**, destaca, segundo o primeiro e muito forte fator de dependência (95,70%), a contraposição dos genótipos homozigotos e uma significativa associação do genótipo **Est^S/Est^S** com as gerações de G12 a G30, contrapondo-se às gerações iniciais (G1 a

G9), associadas principalmente ao genótipo **Est^F/Est^F**. A grande força de explicação deste primeiro fator, praticamente a totalidade da inércia do primeiro plano de dependência, deve-se principalmente ao genótipo **Est^S/Est^S** (66,41%) no espaço das 11 gerações (com 11 dimensões) e, das gerações G1 (44,60%) e G3 (14,18%) em contraposição a G27 (11,07%) e G30 (8,94%), no espaço tridimensional dos genótipos. O segundo fator de dependência que contribui com apenas 2,70% de explicação, não tem importância analítica e, desta forma, qualquer interpretação não deve ser considerada.

Na Figura 6 observa-se o estudo da dependência entre gerações e genótipos para a população **C**, fundada com 75% de alelos **Est^S** e com 25% de alelos **Est^F**. O plano bidimensional **FD1xFD2** explica 99,40% da inércia total, sendo que o primeiro fator, com 79,80% de explicação, mostra a contraposição entre os genótipos **Est^S/Est^S** e os heterozigotos, associando-os às gerações G21 a G30 e G1 a G18, excetuando-se a G12, respectivamente. Este fato pode ser interpretado como sendo o genótipo heterozigoto o principal agente do primeiro fator de dependência, com um peso de aproximadamente 70% de sua composição. Aliada a esta interpretação, encontra-se a forte contraposição entre este genótipo e a 27^a geração, ou seja, nas gerações em que os heterozigotos foram mais abundantes, pode ser observada uma maior dependência, como por exemplo, as gerações G6 e G9, com frequências percentuais médias próximas a 45,00%. Por outro lado, as gerações G24 e G27, muito contrapostas às anteriores, apresentaram as menores frequências deste genótipo, respectivamente, de 18,33 % e 13,33% (Tabela 3; Figura 1).

Quando se considera o segundo fator de dependência da análise da população **C**, com a considerável marca de 19,60% de explicação, observa-se o claro envolvimento do genótipo **Est^F/Est^F** na configuração da inércia visualizada ortogonalmente. Este fator pode ser interpretado como um Fator **Est^F/Est^F**, com uma importância relativa de 91,85% e forte associação à geração G12, que mostrou a maior frequência média deste genótipo (16,67%) em comparação às outras gerações estudadas. Não obstante, as gerações G1 e G30, traduzem-se como um ótimo exemplo de contraposição e de associação, segundo o fator de dependência em análise. Desta forma, são consideradas contrapostas, segundo a influência do primeiro fator de dependência (fator “heterozigoto”) e, são consideradas em associação quando analisadas à luz do segundo fator (fator **Est^F/Est^F**).

A análise da população **D** (Figura 7), fundada com frequência inicial de 12,5% **Est^S** : 87,5% **Est^F**, evidencia como o principal fator de explicação (92,90%) a

contraposição entre os genótipos homozigotos, com peso de 96,81% sobre o primeiro fator. Desta forma, a associação das gerações G1 a G15 com o genótipo **Est^F/Est^F** e, das gerações G18 a G30 com o genótipo **Est^S/Est^S**, é claramente observada e traduzida também em um fator “tempo”, ou seja, o número de gerações necessárias para que as freqüências dos genótipos **Est^S/Est^S** e **Est^F/Est^F** sofressem modificação significativa. A partir da análise da Figura 1 e da Tabela 4, observa-se que a freqüência do genótipo **Est^S/Est^S** tornou-se maior que a do genótipo **Est^F/Est^F** a partir da 15^a geração. Esta geração apresenta-se muito associada aos genótipos heterozigotos na apresentação bidimensional da inércia, o que evidencia ser o segundo fator de dependência, com 6,10%, um fator de contraposição entre os genótipos homozigotos e heterozigotos, apesar de pequena a importância relativa deste fator.

Finalmente, da análise da população **E** (Figura 8), fundada com freqüência inicial de 87,5% **Est^S** para 12,5% **Est^F**, observa-se o agrupamento das gerações G12 a G30, associadas ao genótipo **Est^S/Est^S**, em contraposição às gerações G1 a G9. Estas últimas, mostram-se associadas pelo primeiro fator de dependência, com 85,40% de explicação, aos genótipos heterozigotos e **Est^F/Est^F**. Paralelamente, observa-se na Figura 1 e na Tabela 5, que as gerações G1 a G9 apresentaram as maiores freqüências médias dos genótipos heterozigotos, o que explica a grande dependência deste genótipo a estas gerações. Todavia, na 12^a geração, com a raridade deste genótipo, chegando a níveis tão baixos ao ponto de não ter sido amostrado, a contraposição é claramente visualizada no diagrama, tendo esta geração contribuído sozinha com 20,32% da explicação do primeiro fator.

O segundo fator de dependência, que explica 14,00% da inércia total (99,40%), é muito influenciado pelo genótipo **Est^F/Est^F** (93,74%), fato este que pode ser observado na representação ortogonal do primeiro plano de explicação, como um ponto isolado que não interagiu com nenhuma das gerações segundo este fator.

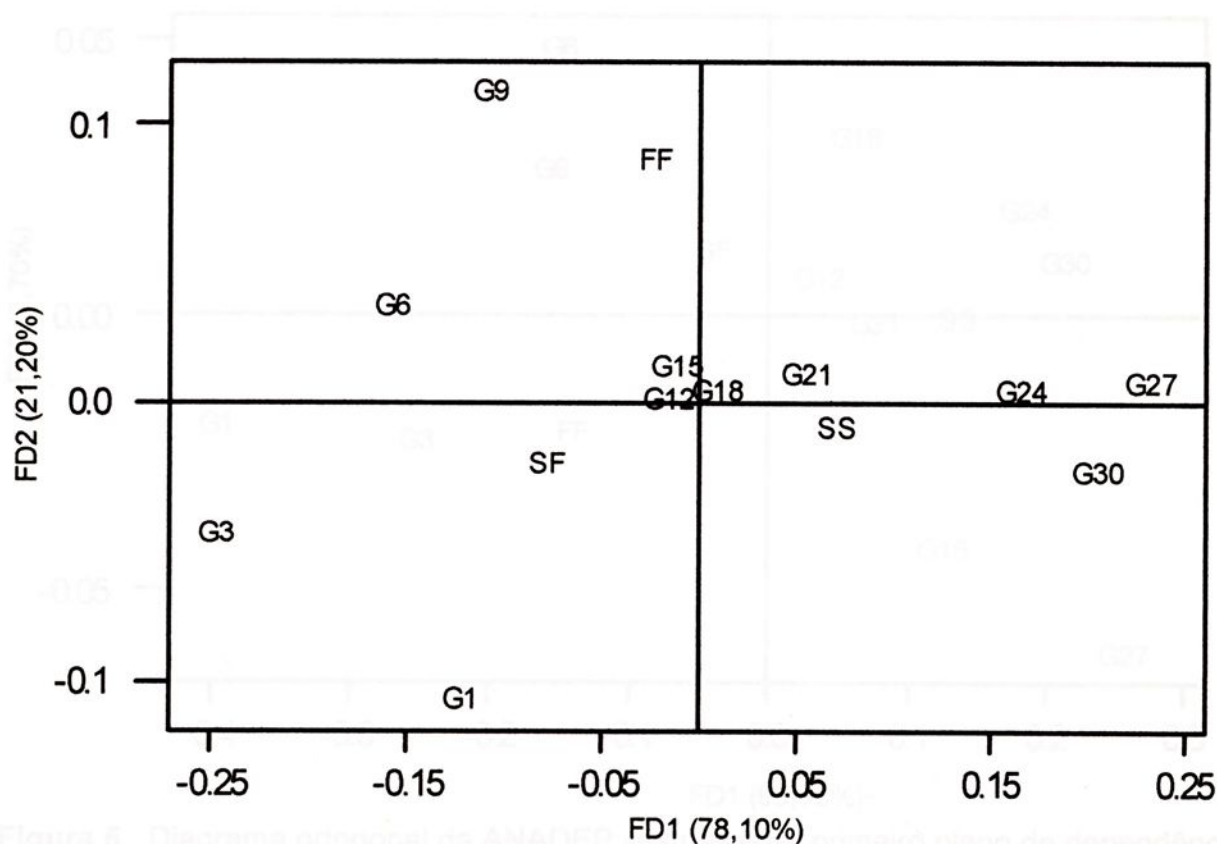


Figura 4. Diagrama ortogonal da ANADEP ilustrativo do primeiro plano de dependência (FD1xFD2), obtido a partir da análise da população A (inércia total explicada: 99,30%).

Figura 4. Diagrama ortogonal da ANADEP ilustrativo do primeiro plano de dependência (FD1xFD2), obtido a partir da análise da população A (inércia total explicada: 99,30%).

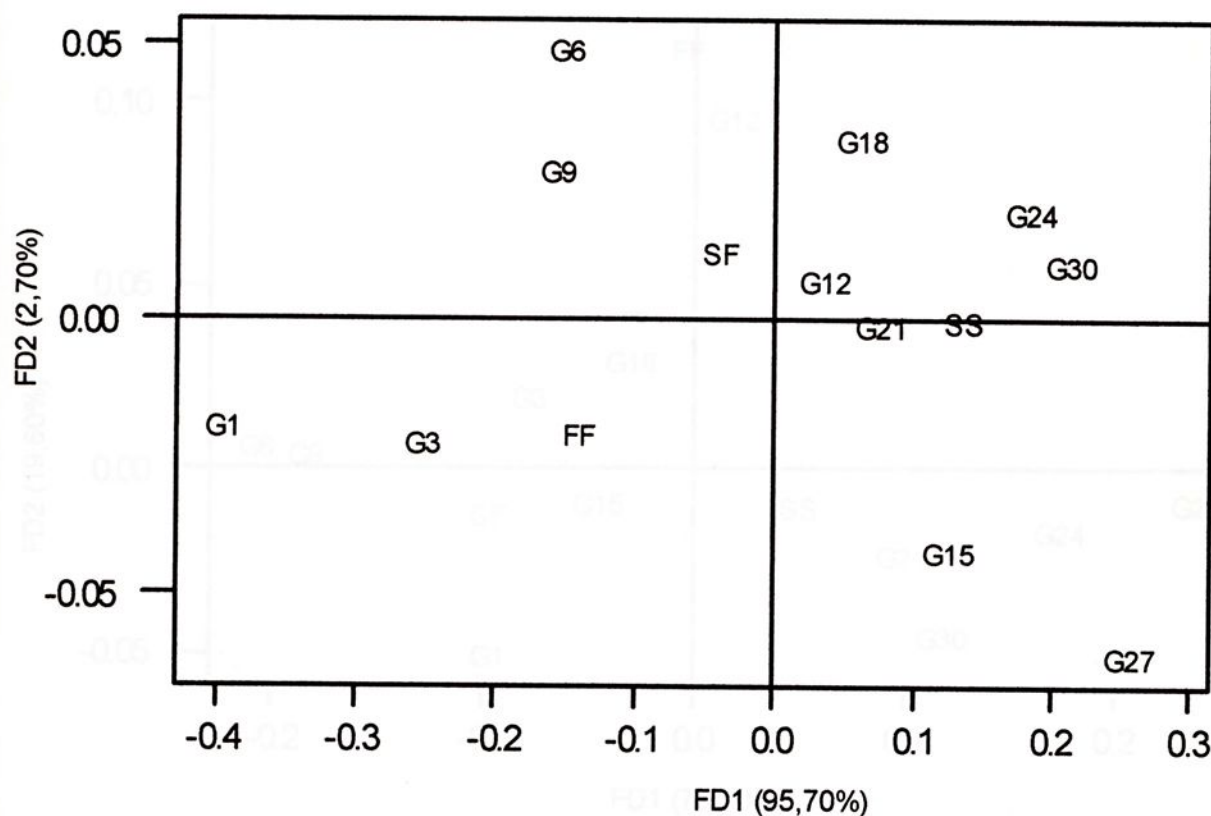


Figura 5. Diagrama ortogonal da ANADEP ilustrativo do primeiro plano de dependência (FD1xFD2), obtido a partir da análise da população B (inércia total explicada: 98,40%).

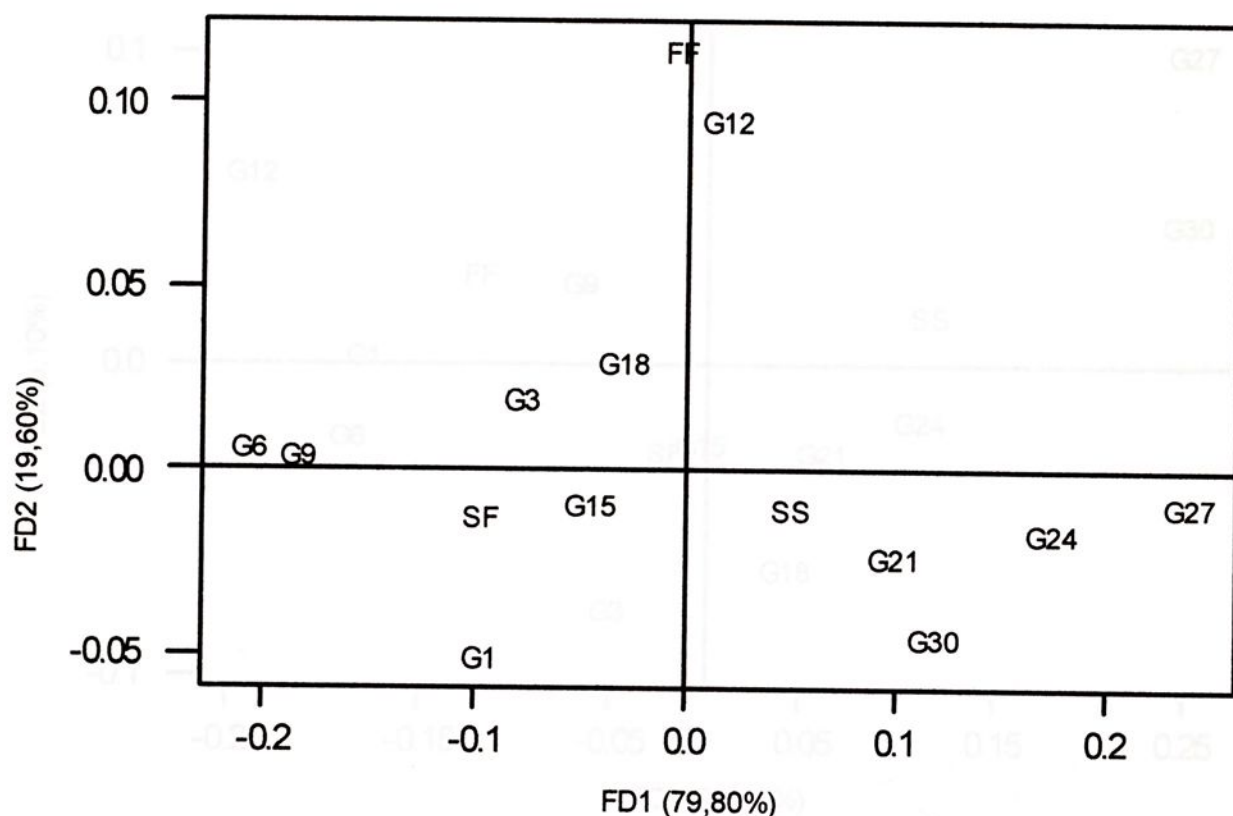


Figura 6. Diagrama ortogonal da ANADEP ilustrativo do primeiro plano de dependência (FD1xFD2), obtido a partir da análise da população C (inércia total explicada: 99,40%).

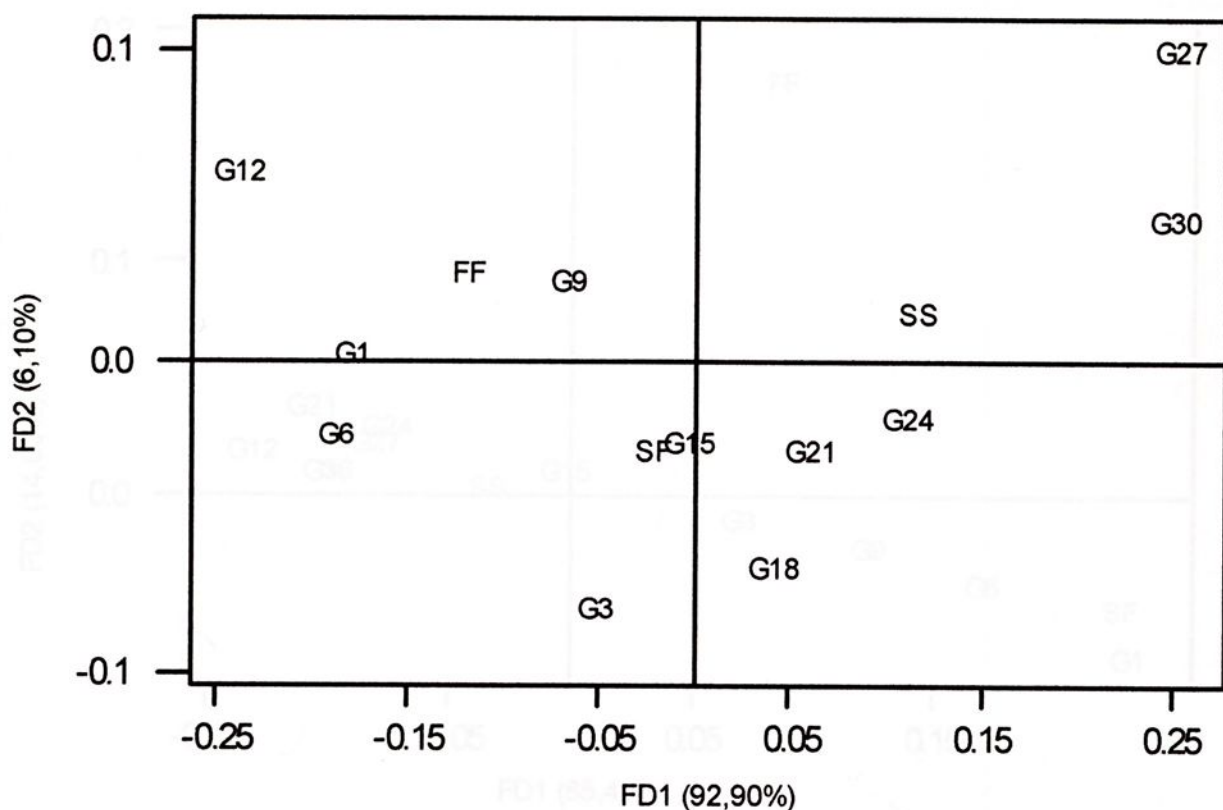


Figura 7. Diagrama ortogonal da ANADEP ilustrativo do primeiro plano de dependência (FD1xFD2), obtido a partir da análise da população D (inércia total explicada: 99,00%).

D. Análise dos Estados de Manov

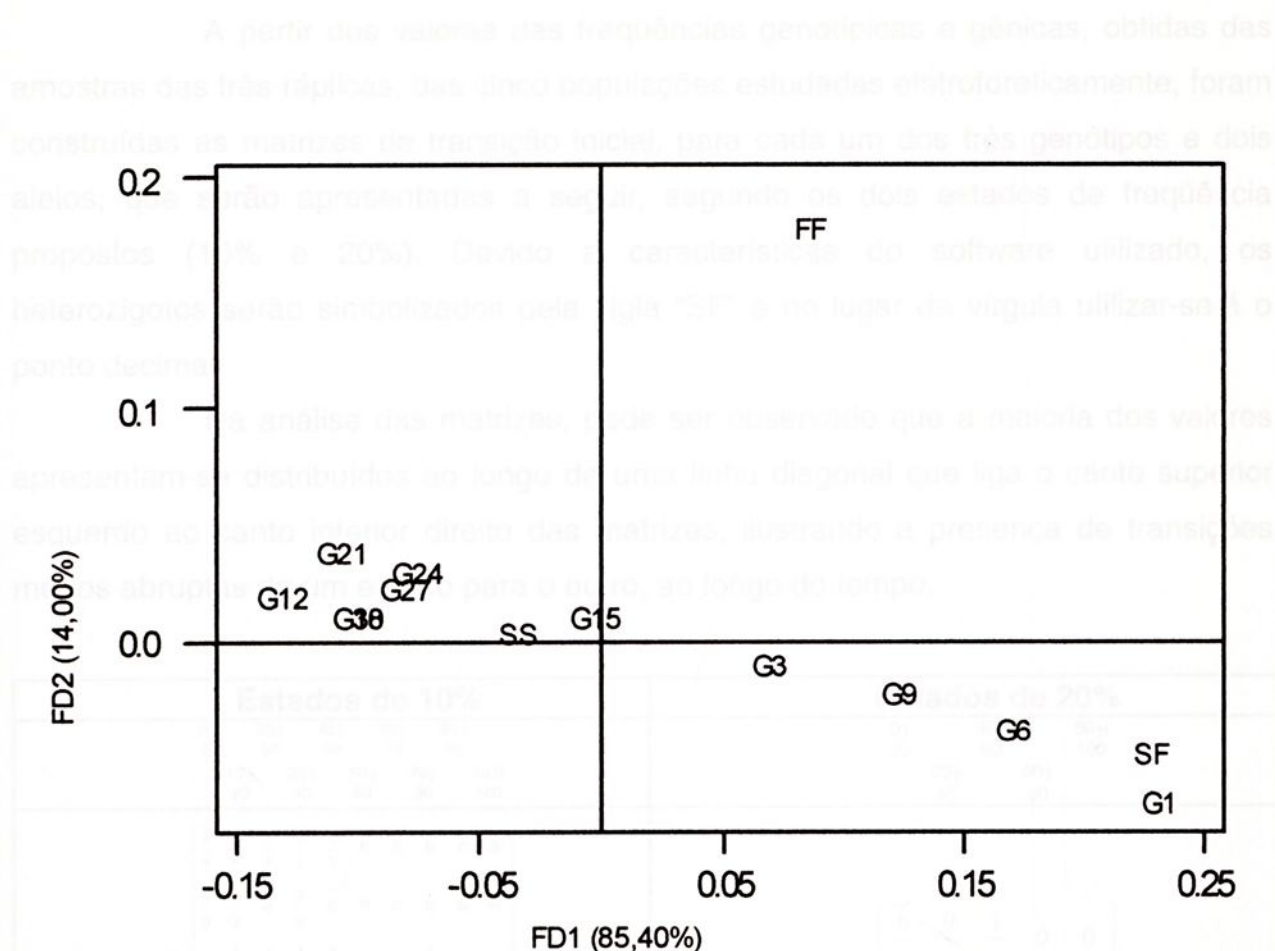


Figura 8. Diagrama ortogonal da ANADEP ilustrativo do primeiro plano de dependência (FD1xFD2), obtido a partir da análise da população E (inércia total explicada: 99,40%).

D. Análise das Cadeias de Markov

A partir dos valores das freqüências genotípicas e gênicas, obtidas das amostras das três réplicas, das cinco populações estudadas eletroforeticamente, foram construídas as matrizes de transição inicial, para cada um dos três genótipos e dois alelos, que serão apresentadas a seguir, segundo os dois estados de freqüência propostos (10% e 20%). Devido a características do software utilizado, os heterozigotos serão simbolizados pela sigla "SF" e no lugar da vírgula utilizar-se-á o ponto decimal.

Da análise das matrizes, pode ser observado que a maioria dos valores apresentam-se distribuídos ao longo de uma linha diagonal que liga o canto superior esquerdo ao canto inferior direito das matrizes, ilustrando a presença de transições menos abruptas de um estado para o outro, ao longo do tempo.

Estados de 10%										Estados de 20%				
0† 20† 40† 60† 80† 10 30 50 70 90 10† 30† 50† 70† 90† 20 40 60 80 100										0† 40† 80† 20 60 100 20† 60† 40 80				
$SS := \begin{bmatrix} \frac{1}{7} & \frac{1}{7} & \frac{3}{7} & \frac{1}{7} & \frac{1}{7} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \frac{3}{9} & \frac{1}{9} & 0 & \frac{5}{9} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \frac{3}{13} & \frac{4}{13} & \frac{3}{13} & \frac{2}{13} & 0 & 0 & \frac{1}{13} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{2}{25} & \frac{2}{25} & \frac{12}{25} & \frac{7}{25} & \frac{2}{25} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{23} & \frac{2}{23} & \frac{7}{23} & \frac{11}{23} & \frac{2}{23} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{18} & 0 & \frac{5}{18} & \frac{4}{18} & \frac{6}{18} & \frac{1}{18} & 0 & \frac{1}{18} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1}{14} & \frac{5}{14} & \frac{5}{14} & \frac{2}{14} & 0 & \frac{1}{14} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1}{18} & \frac{2}{18} & \frac{11}{18} & \frac{1}{18} & \frac{3}{18} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{2}{4} & 0 & \frac{2}{4} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{2}{19} & \frac{2}{19} & \frac{15}{19} \end{bmatrix}$										$SS := \begin{bmatrix} \frac{6}{16} & \frac{9}{16} & \frac{1}{16} & 0 & 0 \\ \frac{5}{38} & \frac{21}{38} & \frac{11}{38} & \frac{1}{38} & 0 \\ 0 & \frac{4}{41} & \frac{27}{41} & \frac{9}{41} & \frac{1}{41} \\ 0 & 0 & \frac{7}{32} & \frac{20}{32} & \frac{5}{32} \\ 0 & 0 & 0 & \frac{4}{23} & \frac{19}{23} \end{bmatrix}$				

Estados de 10%										Estados de 20%				
0 20 40 60 80 10 30 50 70 90 10 30 50 70 90 20 40 60 80 100										0 40 80 20 60 100 20 60 40 80				
$SF := \begin{bmatrix} \frac{17}{20} & \frac{1}{20} & \frac{2}{20} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \frac{3}{11} & \frac{2}{11} & \frac{5}{11} & \frac{1}{11} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \frac{1}{17} & \frac{4}{17} & \frac{2}{17} & \frac{9}{17} & 0 & \frac{1}{17} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \frac{2}{39} & \frac{3}{39} & \frac{5}{39} & \frac{19}{39} & \frac{7}{39} & \frac{2}{39} & \frac{1}{39} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{33} & \frac{3}{33} & \frac{11}{33} & \frac{13}{33} & \frac{3}{33} & \frac{2}{33} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{2}{22} & \frac{11}{22} & \frac{7}{22} & \frac{2}{22} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{7} & 0 & \frac{2}{7} & \frac{2}{7} & \frac{1}{7} & \frac{1}{7} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1}{1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$										$SF := \begin{bmatrix} \frac{23}{31} & \frac{8}{31} & 0 & 0 & 0 \\ \frac{10}{56} & \frac{35}{56} & \frac{10}{56} & \frac{1}{56} & 0 \\ \frac{1}{55} & \frac{16}{55} & \frac{34}{55} & \frac{4}{55} & 0 \\ \frac{0}{55} & \frac{1}{55} & \frac{5}{55} & \frac{2}{55} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$				
$FF := \begin{bmatrix} \frac{44}{52} & \frac{7}{52} & \frac{1}{52} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \frac{8}{57} & \frac{37}{57} & \frac{9}{57} & \frac{2}{57} & \frac{1}{57} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \frac{15}{23} & \frac{6}{23} & \frac{2}{23} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \frac{2}{9} & \frac{5}{9} & \frac{1}{9} & \frac{1}{9} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \frac{2}{4} & \frac{1}{4} & 0 & 0 & \frac{1}{4} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{2}{4} & 0 & \frac{1}{4} & \frac{1}{4} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1}{1} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$										$FF := \begin{bmatrix} \frac{96}{109} & \frac{12}{109} & \frac{1}{109} & 0 & 0 \\ \frac{17}{32} & \frac{14}{32} & \frac{1}{32} & 0 & 0 \\ \frac{2}{8} & \frac{3}{8} & \frac{2}{8} & \frac{1}{8} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{1} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$				
$S := \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{3} & \frac{2}{3} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{7} & \frac{1}{7} & \frac{3}{7} & \frac{1}{7} & \frac{1}{7} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{1}{10} & \frac{2}{10} & \frac{5}{10} & \frac{2}{10} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{1}{28} & \frac{1}{28} & \frac{12}{28} & \frac{12}{28} & \frac{1}{28} & \frac{1}{28} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{2}{34} & \frac{7}{34} & \frac{14}{34} & \frac{10}{34} & \frac{1}{34} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1}{25} & \frac{6}{25} & \frac{11}{25} & \frac{5}{25} & \frac{2}{25} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{5}{21} & \frac{13}{21} & \frac{3}{21} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{3}{22} & \frac{19}{22} \end{bmatrix}$										$S := \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \frac{5}{10} & \frac{4}{10} & \frac{1}{10} & 0 \\ 0 & \frac{2}{38} & \frac{20}{38} & \frac{15}{38} & \frac{1}{38} \\ 0 & 0 & \frac{10}{59} & \frac{41}{59} & \frac{8}{59} \\ 0 & 0 & 0 & \frac{5}{43} & \frac{38}{43} \end{bmatrix}$				

Estados de 10%										Estados de 20%					
0 20 40 60 80 10 30 50 70 90 10 30 50 70 90 20 40 60 80 100										0 40 80 20 60 100 20 60 40 80					
F :=	$\begin{bmatrix} \frac{17}{20} & \frac{3}{20} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \frac{4}{20} & \frac{11}{20} & \frac{5}{20} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \frac{1}{21} & \frac{5}{21} & \frac{9}{21} & \frac{4}{21} & \frac{1}{21} & \frac{1}{21} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{37} & \frac{9}{37} & \frac{19}{37} & \frac{8}{37} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{27} & 0 & \frac{11}{27} & \frac{10}{27} & \frac{4}{27} & \frac{1}{27} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{14} & 0 & \frac{3}{14} & \frac{5}{14} & \frac{3}{14} & \frac{2}{14} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{1}{7} & \frac{2}{7} & \frac{2}{7} & 0 & \frac{2}{7} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1}{4} & \frac{2}{4} & \frac{1}{4} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$										$F := \begin{bmatrix} \frac{35}{40} & \frac{5}{40} & 0 & 0 & 0 \\ \frac{7}{58} & \frac{41}{58} & \frac{10}{58} & 0 & 0 \\ \frac{2}{41} & \frac{14}{41} & \frac{22}{41} & \frac{3}{41} & 0 \\ 0 & \frac{1}{11} & \frac{5}{11} & \frac{5}{11} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$				

As matrizes de transição inicial foram utilizadas para a análise do número de transições no tempo necessárias para alcançar a estabilidade probabilística, originando uma “matriz estável” para cada genótipo ou alelo. Esta estabilidade foi identificada após a verificação da igualdade de todos os valores entre as 10 linhas, coluna por coluna, com precisão de até um centésimo, ou seja, que após esta transição as alterações nas freqüências do alelo ou do genótipo seriam menores do que 1,00%. Para a identificação das “matrizes estáveis” foi utilizado, na frente das letras que simbolizam os genótipos ou os alelos, a letra “E”.

Observa-se da análise das matrizes de estabilidade que existe um acúmulo das freqüências do genótipo **Est^S/Est^S** e do alelo **Est^S** nos estados mais à direita, ou seja, nos estados acima de 50%|60% (estados de 10%) ou 40%|60% (estados de 20%). Para os genótipos heterozigotos, a faixa de ocorrência das maiores freqüências encontra-se abaixo destes dois estados. Todavia, para o genótipo **Est^F/Est^F** e para o alelo **Est^F**, a faixa de ocorrência preferencial é mais deslocada para o lado esquerdo das duas matrizes de estabilidade, ou seja, nos estados iguais ou inferiores a 30%|40% ou 20%|40%.

A Tabela 12 ilustra as freqüências médias ponderadas obtidas a partir do ponto médio de cada estado dos genótipos e dos alelos, para os dois estudos, além do número de transições no tempo e do número de gerações necessárias para, a partir da matriz de transição inicial, obter-se a estabilidade probabilística da matriz de

estabilidade. Pode ser observado que a frequência média para o alelo **Est^S** para estados de 10% e de 20%, são muito próximas (81,25% e 76,30%, respectivamente). Todavia, o número de gerações necessárias para se alcançar estas frequências e que não fossem observadas variações maiores do que 1% entre cada transição foi muito maior para o estudo com os estados de frequência de 10% (132 gerações) do que para o estudo com estados de 20% (87 gerações).

Em relação aos genótipos da Tabela 12, no estudo dos estados de 10% foi observado para o genótipo **Est^S/Est^S** maior número de gerações (177) para que a sua frequência média ponderada não sofresse alterações maiores do que 1%. Porém, para o genótipo **Est^F/Est^F** observa-se que 39 gerações seriam suficientes para que sua frequência não sofresse alterações maiores do que 1% a cada transição, a partir dos 14,20% obtidos.

Estados de 10%											Estados de 20%										
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100											0 20 40 60 80 100										
$SSE = \begin{bmatrix} 0 & 0.01 & 0.02 & 0.03 & 0.07 & 0.11 & 0.11 & 0.22 & 0.05 & 0.37 \\ 0 & 0.01 & 0.02 & 0.03 & 0.07 & 0.11 & 0.11 & 0.22 & 0.05 & 0.37 \\ 0 & 0.01 & 0.02 & 0.03 & 0.07 & 0.11 & 0.11 & 0.22 & 0.05 & 0.37 \\ 0 & 0.01 & 0.02 & 0.03 & 0.07 & 0.11 & 0.11 & 0.22 & 0.05 & 0.37 \\ 0 & 0.01 & 0.02 & 0.03 & 0.07 & 0.11 & 0.11 & 0.22 & 0.05 & 0.37 \\ 0 & 0.01 & 0.02 & 0.03 & 0.07 & 0.11 & 0.11 & 0.22 & 0.05 & 0.37 \\ 0 & 0.01 & 0.02 & 0.03 & 0.07 & 0.11 & 0.11 & 0.22 & 0.05 & 0.37 \\ 0 & 0.01 & 0.02 & 0.03 & 0.07 & 0.11 & 0.11 & 0.22 & 0.05 & 0.37 \\ 0 & 0.01 & 0.02 & 0.03 & 0.07 & 0.11 & 0.11 & 0.22 & 0.05 & 0.37 \\ 0 & 0.01 & 0.02 & 0.03 & 0.07 & 0.11 & 0.11 & 0.22 & 0.05 & 0.37 \end{bmatrix}$											$SSE = \begin{bmatrix} 0.02 & 0.08 & 0.27 & 0.31 & 0.32 \\ 0.02 & 0.08 & 0.27 & 0.31 & 0.32 \\ 0.02 & 0.08 & 0.27 & 0.31 & 0.32 \\ 0.02 & 0.08 & 0.27 & 0.31 & 0.32 \\ 0.02 & 0.08 & 0.27 & 0.31 & 0.32 \end{bmatrix}$										
$SFE = \begin{bmatrix} 0.3 & 0.09 & 0.13 & 0.26 & 0.14 & 0.06 & 0.02 & 0 & 0 & 0 \\ 0.3 & 0.09 & 0.13 & 0.26 & 0.14 & 0.06 & 0.02 & 0 & 0 & 0 \\ 0.3 & 0.09 & 0.13 & 0.26 & 0.14 & 0.06 & 0.02 & 0 & 0 & 0 \\ 0.3 & 0.09 & 0.13 & 0.26 & 0.14 & 0.06 & 0.02 & 0 & 0 & 0 \\ 0.3 & 0.09 & 0.13 & 0.26 & 0.14 & 0.06 & 0.02 & 0 & 0 & 0 \\ 0.3 & 0.09 & 0.13 & 0.26 & 0.14 & 0.06 & 0.02 & 0 & 0 & 0 \\ 0.3 & 0.09 & 0.13 & 0.26 & 0.14 & 0.06 & 0.02 & 0 & 0 & 0 \\ 0.3 & 0.09 & 0.13 & 0.26 & 0.14 & 0.06 & 0.02 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$											$SFE = \begin{bmatrix} 0.3 & 0.41 & 0.25 & 0.03 & 0 \\ 0.3 & 0.41 & 0.25 & 0.03 & 0 \\ 0.3 & 0.41 & 0.25 & 0.03 & 0 \\ 0.3 & 0.41 & 0.25 & 0.03 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$										

E. Análise da Tendência Linear de Séries Temporais

Foi realizada a Análise da Tendência Linear de Séries Temporais para as frequências do alelo Est^S ao longo das gerações, considerando-se separadamente cada uma das três réplicas das cinco populações, com o objetivo de se verificar as tendências. As análises foram realizadas considerando-se as frequências médias ponderadas das 30 gerações, segundo o modelo das Cadeias de Markov, para os três genótipos e os dois alelos, de acordo com os estados de frequência de 10% e de 20%.

Estado	Genótipo /Alelo	Número de transições	Número de gerações	Frequência média ponderada (%)
10%	Est^S/Est^S	59	177	73,95
	Heterozigotos	37	111	26,10
	Est^F/Est^F	23	69	13,70
	Est^S	44	132	81,25
	Est^F	49	147	20,15
20%	Est^S/Est^S	31	93	66,60
	Heterozigotos	19	57	29,90
	Est^F/Est^F	13	39	14,20
	Est^S	29	87	76,30
	Est^F	25	75	25,10

E. Análise de Tendência Linear de Séries Temporais

Foi realizada a Análise de Tendência Linear de Séries Temporais para as freqüências do alelo **Est^S** ao longo das gerações, considerando-se separadamente cada uma das três réplicas das cinco populações, com o objetivo de se verificar as semelhanças na dispersão das freqüências deste alelo entre as três réplicas, ao longo das 30 gerações estudadas. As Figuras 9 a 13 ilustram estas análises, juntamente com a tendência linear média, calculada como a média das tendências lineares das réplicas. As equações das retas são apresentadas na Tabela 13.

De maneira geral, quando considerados os valores de cada réplica de uma mesma população, as retas de tendência linear apresentaram uma inclinação muito semelhante, excetuando-se a réplica **c** da população **C** (Figura 11), que apresentou um valor inicial bem diferente das outras duas réplicas. Além disso, em todos os casos, as retas convergiram para uma pequena região de valores percentuais, com aproximadamente apenas 5% de amplitude nas populações **A** e **C** (Figuras 9 e 11) e, menor ainda nas outras populações (Figuras 10, 12 e 13).

D	a	$Y_t = 32,3747 + 3,19709t$
	b	$Y_t = 49,3804 + 1,74818t$
	c	$Y_t = 37,1498 + 5,18836t$
E	a	$Y_t = 57,4095 + 0,82918t$
	b	$Y_t = 63,4273 + 0,84546t$
	c	$Y_t = 75,1284 + 1,88891t$

Tabela 13. Equações das retas das análises de Tendência Linear para as réplicas das populações A a E.

População	Réplica	Equação da Reta
A	a	$Y_t = 51,8367 + 2,38327t$
	b	$Y_t = 61,9005 + 1,09355t$
	c	$Y_t = 52,9609 + 1,65545t$
B	a	$Y_t = 36,3978 + 3,28627t$
	b	$Y_t = 46,7625 + 2,73473t$
	c	$Y_t = 12,6365 + 6,04982t$
C	a	$Y_t = 76,5249 + 0,26054t$
	b	$Y_t = 77,8416 + 0,71791t$
	c	$Y_t = 48,2847 + 3,38482t$
D	a	$Y_t = 32,3747 + 3,19709t$
	b	$Y_t = 49,3804 + 1,74918t$
	c	$Y_t = 37,1498 + 3,18836t$
E	a	$Y_t = 87,4095 + 0,92918t$
	b	$Y_t = 89,4273 + 0,84546t$
	c	$Y_t = 78,1284 + 1,88891t$

Figura 9

das gerações, segundo a Análise de Tendência Linear, para as três réplicas (a, b e c) da população A (a reta vermelha foi traçada a partir da tendência linear média e os valores de $t=1, 3, 5, 7, 9$, e 11 , representariam respectivamente, as gerações 3, 6, 12, 18, 24 e 30).

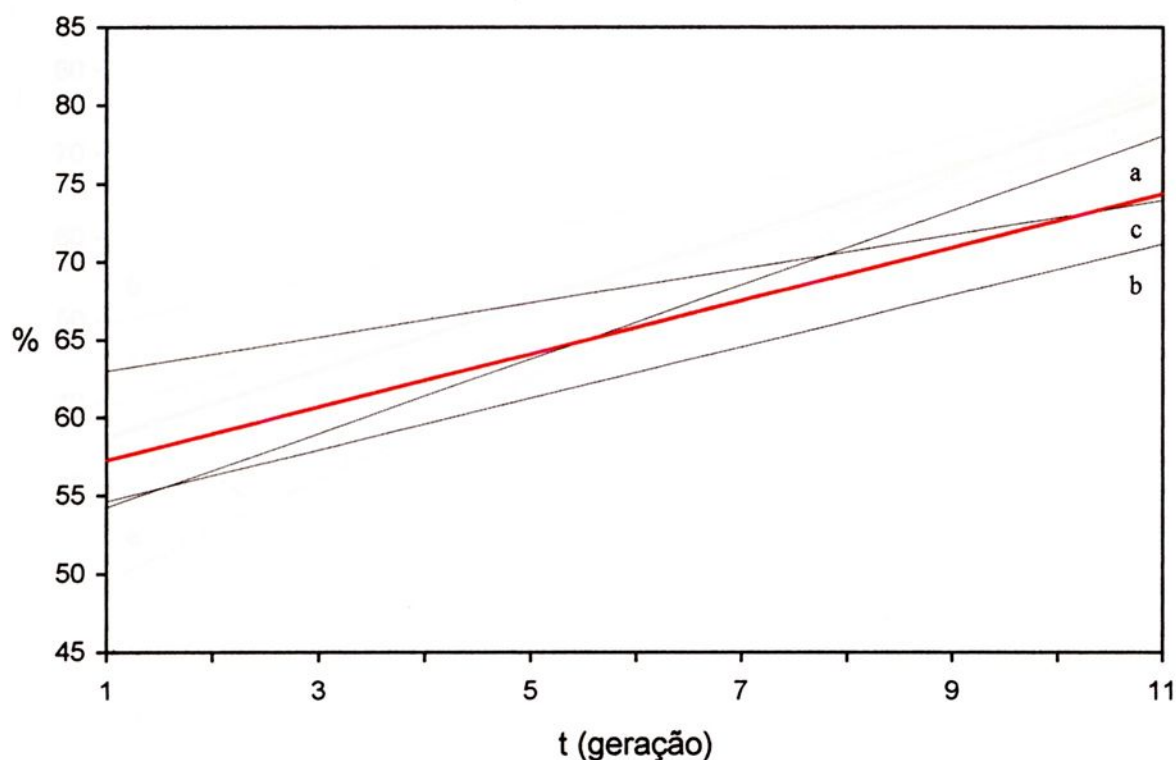


Figura 9. Variação dos valores percentuais do alelo Est^S ao longo das gerações, segundo a Análise de Tendência Linear, para as três réplicas (a, b e c) da população A (a reta vermelha foi traçada a partir da tendência linear média e os valores de $t=1, 3, 5, 7, 9$, e 11 , representam respectivamente, as gerações 3, 6, 12, 18, 24 e 30).

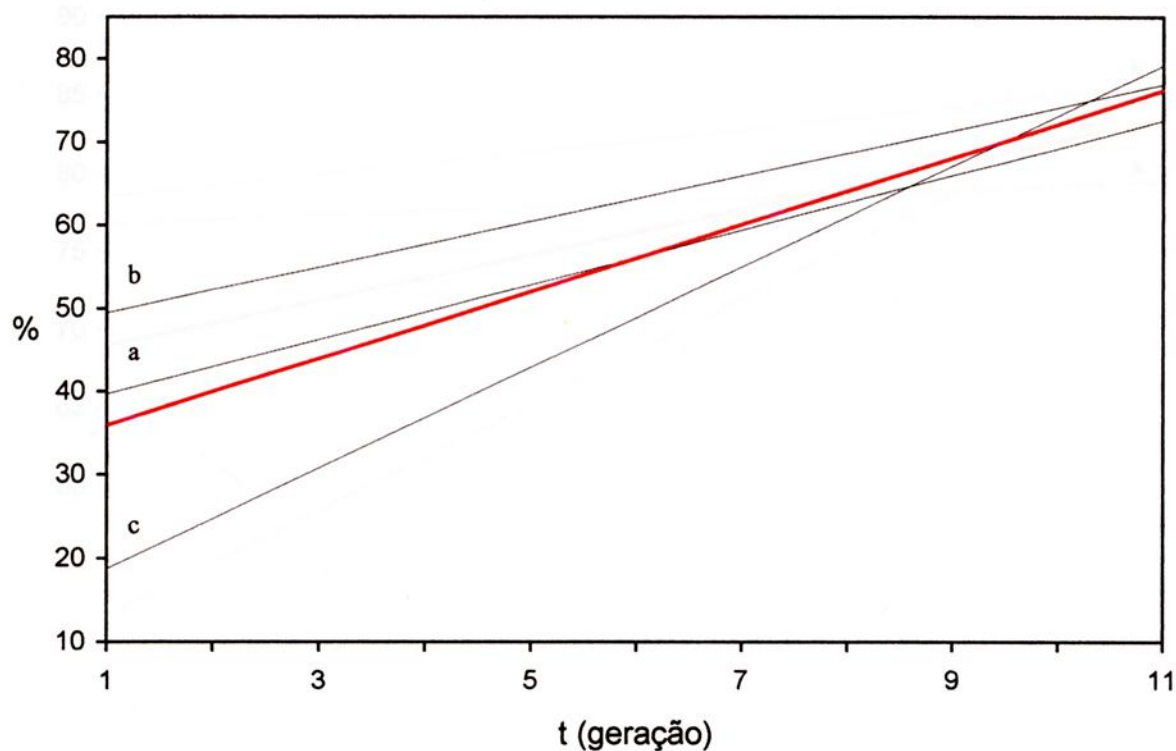


Figura 10. Variação dos valores percentuais do alelo Est^s ao longo das gerações, segundo a Análise de Tendência Linear, para as três réplicas (a, b e c) da população B (a reta vermelha foi traçada a partir da tendência linear média e os valores de $t=1, 3, 5, 7, 9$, e 11 , representam respectivamente, as gerações 3, 6, 12, 18, 24 e 30).

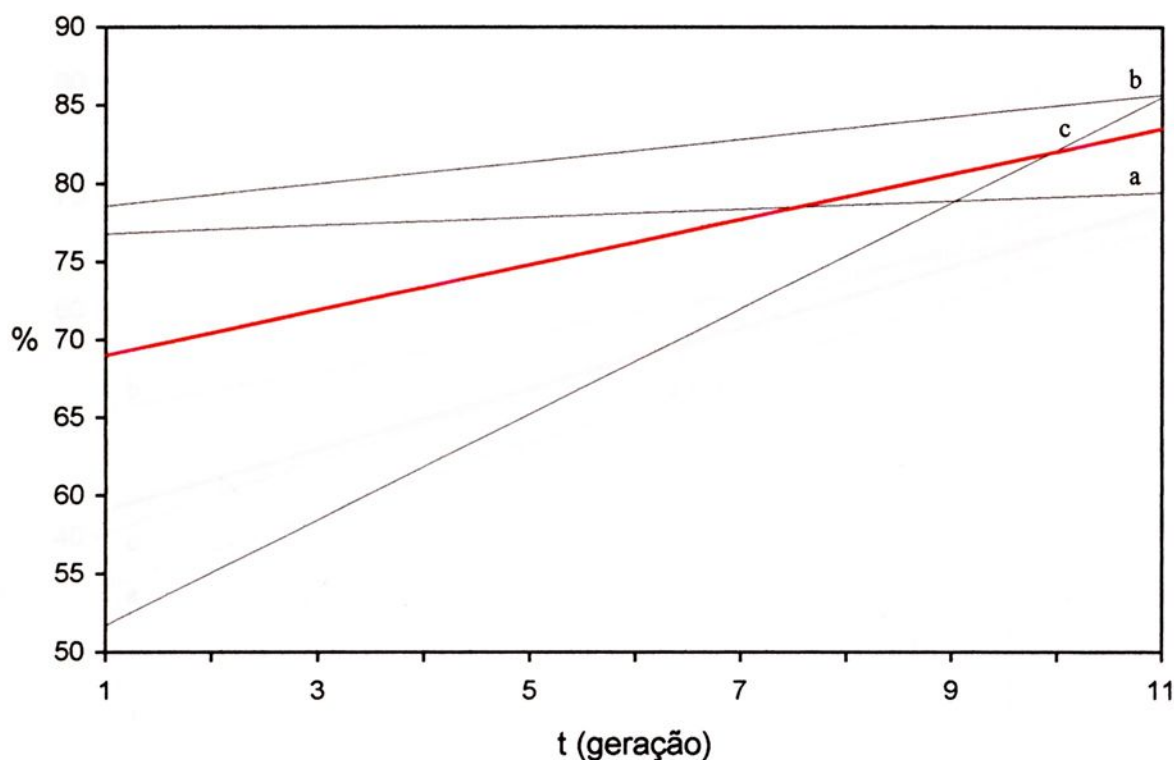


Figura 11. Variação dos valores percentuais do alelo Est^S ao longo das gerações, segundo a Análise de Tendência Linear, para as três réplicas (a, b e c) da população C (a reta vermelha foi traçada a partir da tendência linear média e os valores de $t=1, 3, 5, 7, 9$, e 11 , representam respectivamente, as gerações 3, 6, 12, 18, 24 e 30).

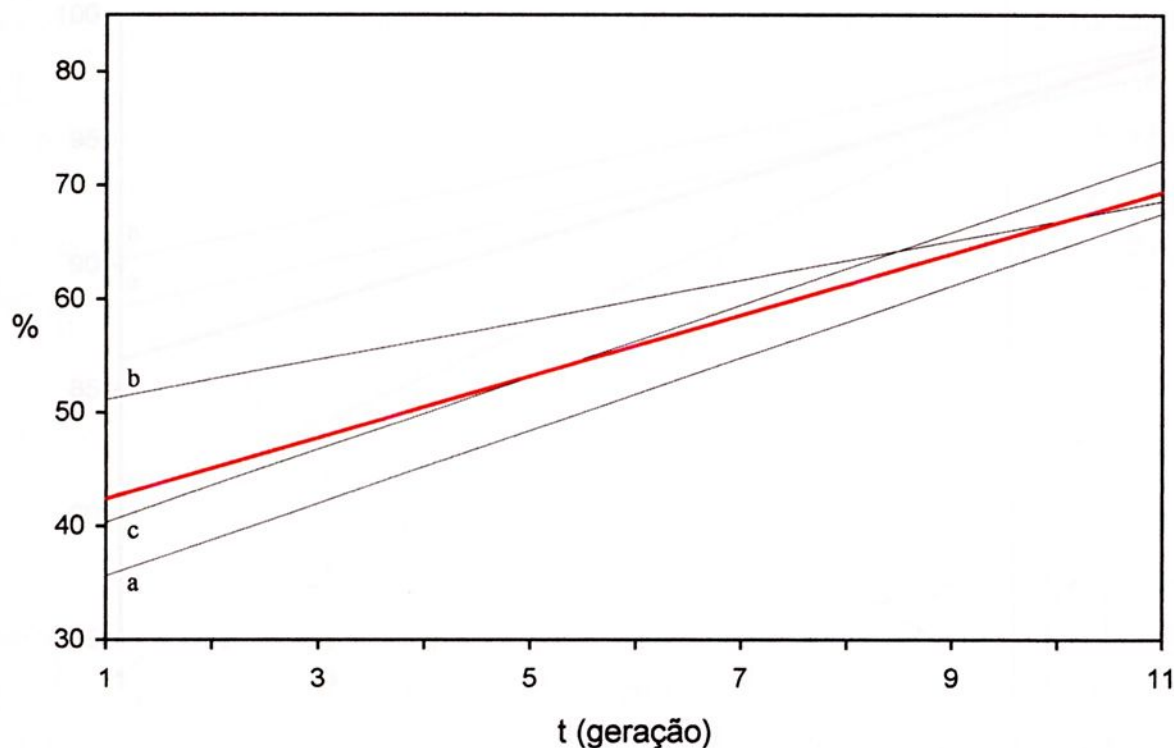


Figura 12. Variação dos valores percentuais do alelo Est^S ao longo das gerações, segundo a Análise de Tendência Linear, para as três réplicas (a, b e c) da população D (a reta vermelha foi traçada a partir da tendência linear média e os valores de $t=1, 3, 5, 7, 9$, e 11 , representam respectivamente, as gerações 3, 6, 12, 18, 24 e 30).

III.2. Componentes de valor adaptativo

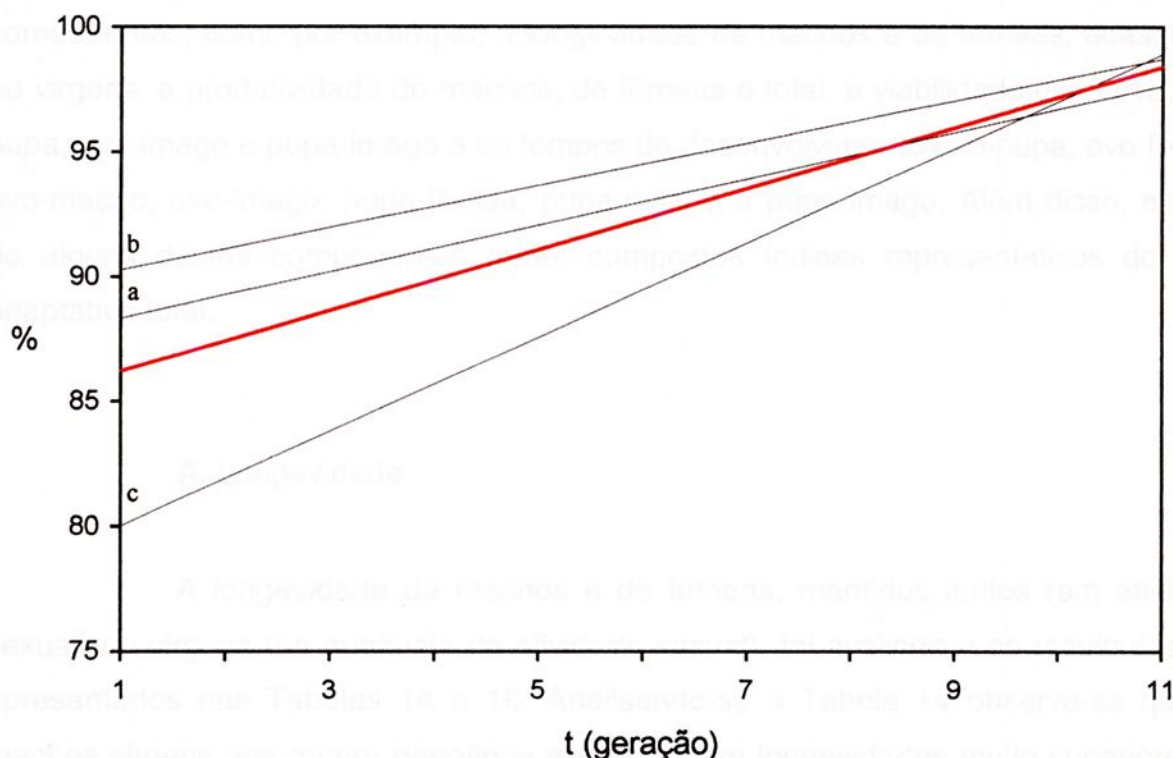


Figura 13. Variação dos valores percentuais do alelo Est^S ao longo das gerações, segundo a Análise de Tendência Linear, para as três réplicas (a, b e c) da população E (a reta vermelha foi traçada a partir da tendência linear média e os valores de $t=1, 3, 5, 7, 9$, e 11 , representam respectivamente, as gerações 3, 6, 12, 18, 24 e 30).

III.2. Componentes do valor adaptativo

Foram estudados componentes do valor adaptativo dos indivíduos dos quatro genótipos, com o intuito de verificar a existência de diferenças significativas entre eles que pudessem auxiliar a interpretação dos resultados das populações experimentais, principalmente em relação à manutenção ou não do polimorfismo no loco da esterase-8. Para isto, o ciclo biológico foi decomposto em alguns componentes, como por exemplo, a longevidade de machos e de fêmeas, acasalados ou virgens, a produtividade de machos, de fêmeas e total, a viabilidade ovo-larva, ovo-pupa, ovo-imago e pupa-imago e os tempos de desenvolvimento ovo-pupa, ovo-fêmea, ovo-macho, ovo-imago, pupa-fêmea, pupa-macho e pupa-imago. Além disso, a partir de alguns destes componentes foram compostos índices representativos do valor adaptativo total.

A. Longevidade

A longevidade de machos e de fêmeas, mantidos juntos (em atividade sexual) ou virgens (na ausência de atividade sexual), foi avaliada e os resultados são apresentados nas Tabelas 14 a 16. Analisando-se a Tabela 14 observa-se que os machos virgens dos quatro genótipos apresentaram longevidades muito superiores às fêmeas virgens, variando de aproximadamente 66 a 81 dias, para os machos e, também aproximadamente, de 55 a 62 dias, para as fêmeas. As longevidades médias dos dois sexos foram estatisticamente diferentes ao nível de significância de 1%, com exceção do genótipo **Est^F/Est^S** (com o alelo **Est^S** de origem materna), para o qual a significância do teste *t* de Student atingiu o nível de 5%. Quando a homogeneidade das médias de cada sexo foi comparada pela análise de variância, observou-se diferença significativa apenas para os machos ($F=3,04$, $p<0,05$), sendo que o teste para comparações múltiplas de Tukey ($Q_{0,05}=14,09$) indicou como única a diferença entre os genótipos **Est^S/Est^S** ($\bar{x}=80,62$ dias) e **Est^F/Est^S** ($\bar{x}=65,54$ dias).

Na Tabela 15 são apresentados os valores obtidos para o estudo da longevidade dos indivíduos dos dois sexos mantidos juntos. Os machos apresentaram valores que variaram de 78 a 91 dias e, as fêmeas, de 55 a 63 dias, aproximadamente. Todas as diferenças entre as médias dos dois sexos foram significantes, com os

valores relativos ao sexo masculino sempre maiores. De modo semelhante aos resultados observados para as moscas virgens, as comparações entre os genótipos através da análise de variância, mostrou diferença significativa apenas para a longevidade do sexo masculino. O teste de Tukey ($Q_{0,05}=11,16$) indicou como diferentes as médias dos genótipos **Est^S/Est^S** (91,14 dias) e **Est^F/Est^F** (78,24 dias).

Na Tabela 16, as médias são reapresentadas, com a finalidade de compará-las quanto ao estado de acasalamento. Com exceção dos machos dos genótipos **Est^S/Est^S** e **Est^F/Est^S**, todas as diferenças entre as longevidades médias de indivíduos mantidos juntos e virgens não foram significantes. Entretanto, de maneira geral, a longevidade dos indivíduos mantidos em atividade sexual foi superior àquela dos indivíduos virgens, excetuando-se as fêmeas de genótipo **Est^F/Est^F** e **Est^S/Est^F**, para as quais os valores dos indivíduos acasalados foram um pouco menores que os dos indivíduos virgens.

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

Genótipo ¹⁾	Machos	Fêmeas	t _{cas}
Est ^S /Est ^S	80,62 ± 31,39	57,52 ± 18,07	4,63**
Est ^F /Est ^F	78,26 ± 22,94	61,52 ± 18,14	4,05**
Est ^F /Est ^S	65,54 ± 27,85	54,88 ± 14,92	2,30*
Est ^S /Est ^F	73,34 ± 25,22	58,06 ± 20,37	3,33**
F _{cas}	3,04*	1,22	-
Q _{cas}	14,09	-	-

1) o sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

Tabela 14. Médias e erros padrões ($\bar{x} \pm s_x$) da longevidade (em dias) de 50 machos e de 50 fêmeas virgens (t para diferença entre médias; F para homogeneidade das médias; Q para comparações múltiplas entre as médias; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Genótipo ⁽¹⁾	Machos	Fêmeas	t ₍₄₉₎
Est ^S /Est ^S	80,62 ± 31,39	57,52 ± 16,07	4,63**
Est ^F /Est ^F	78,26 ± 22,94	61,52 ± 18,14	4,05**
Est ^F /Est ^S	65,54 ± 27,85	54,88 ± 14,92	2,30*
Est ^S /Est ^F	73,34 ± 25,22	58,06 ± 20,37	3,33**
F _(3;199)	3,04*	1,22	-
Q _{0,05}	14,09	-	-

⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

Tabela 15. Médias e erros padrões ($\bar{x} \pm s_x$) da longevidade (em dias) de 50 machos e de 50 fêmeas mantidos juntos (**t** para diferença entre médias; **F** para homogeneidade das médias; **Q** para comparações múltiplas entre as médias; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Genótipo ⁽¹⁾	Machos	Fêmeas	t ₍₄₉₎
Est ^S /Est ^S	91,14 ± 17,20	63,10 ± 15,86	8,47**
Est ^F /Est ^F	78,24 ± 21,43	56,34 ± 15,56	5,85**
Est ^F /Est ^S	82,48 ± 23,05	57,60 ± 17,45	6,09**
Est ^S /Est ^F	82,38 ± 23,47	54,96 ± 20,09	6,28**
F _(3;199)	3,20*	2,12	-
Q _{0,05}	11,16	-	-

⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

B. Produtividade

A produtividade média por casal em número de machos, de fêmeas e de imagos, foi avaliada nas 16 combinações de cruzamentos entre os quatro genótipos e os resultados são apresentados nas Tabelas de 17 a 20. O número médio de machos (Tabela 17) variou de 10,85 (machos $Est^S/Est^F \times$ fêmeas Est^S/Est^F) a 25,70 (machos $Est^S/Est^S \times$ fêmeas Est^F/Est^S). De maneira geral, as maiores produtividades médias de machos foram observadas para os cruzamentos envolvendo fêmeas Est^F/Est^S , a

Tabela 16. Teste *t* de Student para diferença entre as longevidades médias (em dias) de 50 machos e de 50 fêmeas mantidos juntos (em atividade sexual - AS) ou virgens (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Genótipo ⁽¹⁾	Machos			Fêmeas		
	AS	Virgens	$t_{(49)}$	AS	Virgens	$t_{(49)}$
Est^S/Est^S	91,14	80,62	2,08*	63,10	57,52	1,75
Est^F/Est^F	78,24	78,26	0,00	56,34	61,52	1,53
Est^F/Est^S	82,48	65,54	3,31**	57,60	54,88	0,84
Est^S/Est^F	82,38	73,34	1,86	54,96	58,06	0,45

⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

B. Produtividade

A produtividade média por casal em números de machos, de fêmeas e de imagos, foi avaliada nas 16 combinações de cruzamentos entre os quatro genótipos e os resultados são apresentados nas Tabelas de 17 a 20. O número médio de machos (Tabela 17) variou de 10,85 (machos Est^S/Est^F X fêmeas Est^S/Est^F) a 25,70 (machos Est^S/Est^S X fêmeas Est^F/Est^S). De maneira geral, as maiores produtividades médias de machos foram observadas para os cruzamentos envolvendo fêmeas Est^S/Est^S ; a análise de variância não mostrou diferença significativa entre estas quatro médias ($F=2,62$; $p>0,05$). Já para os cruzamentos com fêmeas Est^S/Est^F foram observados os menores valores médios, que também não diferiram segundo a análise de variância ($F=1,00$; $p>0,05$). Diferença significativa entre as médias foi observada apenas nos cruzamentos com fêmeas Est^F/Est^F ($F=6,76$; $p<0,01$), refletindo o maior valor médio observado (20,05 machos) no cruzamento entre machos Est^S/Est^S e fêmeas Est^F/Est^F , significativamente diferente daqueles obtidos para os cruzamentos entre estas fêmeas com machos Est^F/Est^F (11,60 machos) e Est^F/Est^F (11,50 machos), segundo o teste de Tukey, ao nível de significância de 1% ($Q_{0,01}=7,09$).

A homogeneidade das médias também foi testada considerando-se os cruzamentos de machos de um determinado genótipo com as fêmeas dos quatro genótipos, observando-se diferenças altamente significantes em todas as comparações ($p<0,01$). Em relação aos cruzamentos envolvendo machos do genótipo Est^S/Est^S , as médias estatisticamente diferentes ($F=5,57$; $p<0,01$) correspondem aos cruzamentos com fêmeas Est^F/Est^F (14,35 machos) e Est^F/Est^S (25,70 machos), de acordo com o teste de Tukey ($Q_{0,01}=10,08$). As comparações múltiplas de Tukey ($Q_{0,01}=8,31$) para as médias dos cruzamentos com machos Est^F/Est^F , revelaram diferenças altamente significantes ($F=11,22$; $p<0,01$) entre cruzamentos com fêmeas Est^F/Est^F (11,60 machos) e Est^S/Est^S (24,80 machos). O mesmo foi observado para as comparações múltiplas dos cruzamentos envolvendo machos Est^F/Est^S e fêmeas Est^S/Est^F (13,90 machos) e estes machos com fêmeas Est^S/Est^S (23,30 machos) ($F=8,10$; $p<0,01$; $Q_{0,01}=7,37$). Todavia, neste nível de significância, pode ser observada também a diferença significativa com a média obtida no cruzamento com fêmeas Est^F/Est^F (14,85 machos). Finalmente, em se tratando dos cruzamentos envolvendo machos Est^S/Est^F , diferenças altamente significantes ($F=6,61$; $p<0,01$; $Q_{0,01}=6,98$) foram observadas entre as médias daqueles que envolveram fêmeas Est^S/Est^F (10,85

machos) com os outros que envolveram fêmeas **Est^S/Est^S** (17,90 machos) e fêmeas **Est^F/Est^S** (17,95 machos).

Na Tabela 18 são apresentadas as médias do número de fêmeas produzidas no estudo da produtividade, com variação de 14,55 (*machos Est^S/Est^F X fêmeas Est^S/Est^F*) a 43,60 (*machos Est^S/Est^S X fêmeas Est^S/Est^S*). Da mesma forma que para os machos, as maiores produtividades médias de fêmeas foram observadas para os cruzamentos envolvendo fêmeas **Est^S/Est^S** sendo que, neste caso, a análise de variância mostrou diferença significativa ($F=6,71$; $p<0,01$) entre estas quatro médias, principalmente devido ao valor médio muito superior alcançado nos cruzamentos entre indivíduos **Est^S** homozigotos (43,60 fêmeas), significativamente diferente das 29,85 fêmeas produzidas, em média, no cruzamento com machos **Est^F/Est^F** ($Q_{0,01}=10,48$). Nos cruzamentos com fêmeas **Est^S/Est^F** foram observados os menores valores médios, que também não diferiram segundo a análise de variância semelhantemente ao estudo dos machos. Diferença significativa entre as médias foi observada nos cruzamentos com as fêmeas **Est^F/Est^S** ($F=5,64$; $p<0,01$; $Q_{0,01}=8,74$), refletindo o maior valor médio obtido no cruzamento com os machos **Est^S/Est^S** (26,05 fêmeas), significativamente diferente das médias observadas nos cruzamentos envolvendo machos **Est^S/Est^F** (16,25 fêmeas) e **Est^F/Est^F** (16,80 fêmeas).

As análises da homogeneidade das médias, considerando-se os cruzamentos de machos de um determinado genótipo com as fêmeas dos quatro diferentes genótipos, mostraram diferenças altamente significantes em todas as comparações ($p<0,01$). De modo diverso do estudo da produtividade de machos, o teste de Tukey para comparações múltiplas indicou como significativamente diferentes as médias dos cruzamentos com fêmeas de genótipos **Est^S/Est^S** dos demais, independente do genótipo dos machos. A única exceção está relacionada com a produtividade média dos cruzamentos *machos Est^F/Est^F X fêmeas Est^S/Est^S* (29,85 fêmeas) com *machos Est^F/Est^F X fêmeas Est^F/Est^F* (21,60 fêmeas) que não podem ser consideradas significativamente diferentes ao nível de significância de 1% ($Q_{0,01}=9,17$).

Na Figura 14 é apresentado um diagrama ortogonal de dispersão das médias do número de machos (abscissa) e de fêmeas (ordenada) dos 16 cruzamentos realizados. Para facilitar a visualização, os alelos foram representados por “S” e “F”. De maneira geral, pode ser observada a formação de três grupos: um primeiro grupo, com menores produtividades de machos e de fêmeas, composto por sete cruzamentos: quatro envolvendo fêmeas **Est^S/Est^F**, dois envolvendo fêmeas **Est^F/Est^F** e um

envolvendo fêmeas $\text{Est}^S/\text{Est}^S$. O cruzamento envolvendo fêmeas $\text{Est}^F/\text{Est}^F$ (fêmeas $\text{Est}^F/\text{Est}^F \times$ machos $\text{Est}^S/\text{Est}^S$), que produziu em média 20,05 machos e 18,65 fêmeas, aparece como parte de um segundo grupo composto pelos quatro cruzamentos que apresentaram baixa produtividade de fêmeas e mediana de machos. Dentre eles, destacam-se três cruzamentos envolvendo fêmeas $\text{Est}^F/\text{Est}^S$. Um terceiro grupo é composto por quatro cruzamentos que apresentaram as maiores produtividades de machos e de fêmeas: três envolvendo fêmeas $\text{Est}^S/\text{Est}^S$ e um cruzamento com fêmeas $\text{Est}^F/\text{Est}^S$ (fêmeas $\text{Est}^F/\text{Est}^S \times$ machos $\text{Est}^S/\text{Est}^S$). O cruzamento envolvendo fêmeas $\text{Est}^S/\text{Est}^S \times$ machos $\text{Est}^S/\text{Est}^F$, que produziu 34,30 fêmeas e 17,90 machos, em média, destacou-se dois demais, não associando-se a nenhum dos três grupos apresentados. Segundo a sua produtividade média de fêmeas ele poderia ser considerado como pertencente ao grupo três (das maiores produtividades de fêmeas) e, segundo o número médio de machos produzidos, como integrante do grupo dois (das produtividades medianas de machos).

Os valores da produtividade média de imagos, nas 16 combinações de cruzamento, entre os quatro genótipos, são apresentados na Tabela 19. O número médio de imagos produzidos variou de 25,40 (machos $\text{Est}^S/\text{Est}^F \times$ fêmeas $\text{Est}^S/\text{Est}^F$) a 68,25 (machos $\text{Est}^S/\text{Est}^S \times$ fêmeas $\text{Est}^S/\text{Est}^S$). Em consequência do observado no estudo das produtividades de cada sexo, as maiores produtividades médias foram obtidas para os cruzamentos envolvendo fêmeas $\text{Est}^S/\text{Est}^S$ e, entre estes, foram observadas diferenças significantes ($F=6,49$; $p<0,01$; $Q_{0,01}=13,20$) entre a produtividade dos que tinham machos de genótipo $\text{Est}^S/\text{Est}^S$ (68,25 imagos) em relação àqueles de machos $\text{Est}^S/\text{Est}^F$ e $\text{Est}^F/\text{Est}^F$ (52,20 e 54,65 imagos, respectivamente). Também foi observada, a partir da análise de variância, a ocorrência de diferenças significantes entre as médias dos cruzamentos com fêmeas $\text{Est}^F/\text{Est}^S$, ou seja, foram observadas diferenças significantes ($F=7,54$; $p<0,01$; $Q_{0,01}=13,04$) entre a produtividade dos que tinham machos de genótipo $\text{Est}^S/\text{Est}^S$ (51,75 imagos) em relação àqueles de machos $\text{Est}^S/\text{Est}^F$ e $\text{Est}^F/\text{Est}^F$ (34,20 e 36,60 imagos, respectivamente).

Quando a homogeneidade das médias foi testada em relação aos cruzamentos de machos de um determinado genótipo com as fêmeas dos quatro diferentes genótipos, foram observadas diferenças altamente significantes em todas as comparações ($p<0,01$). De maneira geral, estas diferenças deveram-se às produtividades médias de imagos muito superiores obtidas para os cruzamentos que envolveram fêmeas $\text{Est}^S/\text{Est}^S$. Nesta tabela verifica-se que os valores de $Q_{0,01}$ indicam



a superioridade estatística destes cruzamentos, diferenciando-os dos três demais. Estes últimos, foram agrupados em todos os casos, ou seja, não foram observadas diferenças significantes entre as produtividades médias, com exceção dos cruzamentos com machos **Est^S/Est^S**, um agrupamento formado pelas médias 31,45 e 38,70 imagos, respectivamente para fêmeas **Est^S/Est^F** e **Est^F/Est^F**, que diferiu dos outros dois independentemente ($F=34,14$; $p<0,01$; $Q_{0,01}=12,71$).

Tabela 17. Médias e erros padrões ($\bar{x} \pm s_x$) do número de machos produzidos nos 20 cruzamentos individuais entre os quatro genótipos (F para homogeneidade das médias; Q para comparações múltiplas entre médias; **: $p<0,01$).

Genótipos ⁽¹⁾	Machos				$F_{0,01}$	$Q_{0,01}$
	Fêmeas	Est ^S /Est ^S	Est ^F /Est ^F	Est ^F /Est ^S	Est ^S /Est ^F	
Est ^S /Est ^S		24,65 $\pm$ 2,48	24,80 $\pm$ 2,30	23,30 $\pm$ 1,51	17,90 $\pm$ 1,53	2,52
Est ^F /Est ^F		20,05 $\pm$ 1,95	11,60 $\pm$ 0,91	14,85 $\pm$ 1,69	11,50 $\pm$ 1,43	6,76**
Est ^S /Est ^F		25,70 $\pm$ 2,40	19,80 $\pm$ 2,08	20,60 $\pm$ 1,85	17,95 $\pm$ 1,71	2,67
Est ^F /Est ^S		14,35 $\pm$ 1,88	13,40 $\pm$ 1,65	13,90 $\pm$ 1,27	10,85 $\pm$ 1,40	1,00
$F_{0,01}$		5,57**	11,22**	6,10**	5,61**	-
$Q_{0,01}$		10,08	8,31	7,37	6,98	-

(1) a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

Tabela 17. Médias e erros padrões ($\bar{x} \pm s_x$) do número de machos produzidos nos 20 cruzamentos individuais entre os quatro genótipos (**F** para homogeneidade das médias; **Q** para comparações múltiplas entre médias; **: $p < 0,01$).

Genótipos ⁽¹⁾		Machos				$F_{(3;79)}$	$Q_{0,01}$
Fêmeas		Est^S/Est^S	Est^F/Est^F	Est^F/Est^S	Est^S/Est^F		
Est^S/Est^S		$24,65 \pm 2,48$	$24,80 \pm 2,30$	$23,30 \pm 1,51$	$17,90 \pm 1,53$	2,62	-
Est^F/Est^F		$20,05 \pm 1,95$	$11,60 \pm 0,91$	$14,85 \pm 1,69$	$11,50 \pm 1,43$	6,76**	7,09
Est^F/Est^S		$25,70 \pm 2,40$	$19,80 \pm 2,06$	$20,80 \pm 1,88$	$17,95 \pm 1,71$	2,67	-
Est^S/Est^F		$14,35 \pm 1,88$	$13,40 \pm 1,65$	$13,90 \pm 1,27$	$10,85 \pm 1,40$	1,00	-
$F_{(3;79)}$		5,57**	11,22**	8,10**	6,61**	-	-
$Q_{0,01}$		10,08	8,31	7,37	6,98	-	-

⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

Tabela 18. Médias e erros padrões ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) do número de fêmeas produzidas nos 20 cruzamentos individuais entre os quatro genótipos (F para homogeneidade das médias; Q para comparações múltiplas entre médias; **: $p < 0,01$).

Genótipos ⁽¹⁾	Machos						
Fêmeas	Est ^S /Est ^S	Est ^F /Est ^F	Est ^F /Est ^S	Est ^S /Est ^F	F _(3;79)	Q _{0,01}	
Est ^S /Est ^S	43,60 ± 3,01	29,85 ± 2,16	38,90 ± 1,74	34,30 ± 2,02	6,71**	10,48	
Est ^F /Est ^F	18,65 ± 1,31	21,60 ± 2,12	20,65 ± 2,30	17,85 ± 2,11	0,76	-	
Est ^F /Est ^S	26,05 ± 2,41	16,80 ± 2,03	18,75 ± 1,71	16,25 ± 1,27	5,64**	8,74	
Est ^S /Est ^F	17,10 ± 1,50	14,60 ± 1,63	15,80 ± 1,25	14,55 ± 1,93	0,57	-	
F _(3;79)	31,21**	11,46**	34,05**	24,15**	-	-	
Q _{0,01}	9,99	9,17	8,22	8,55	-	-	

⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

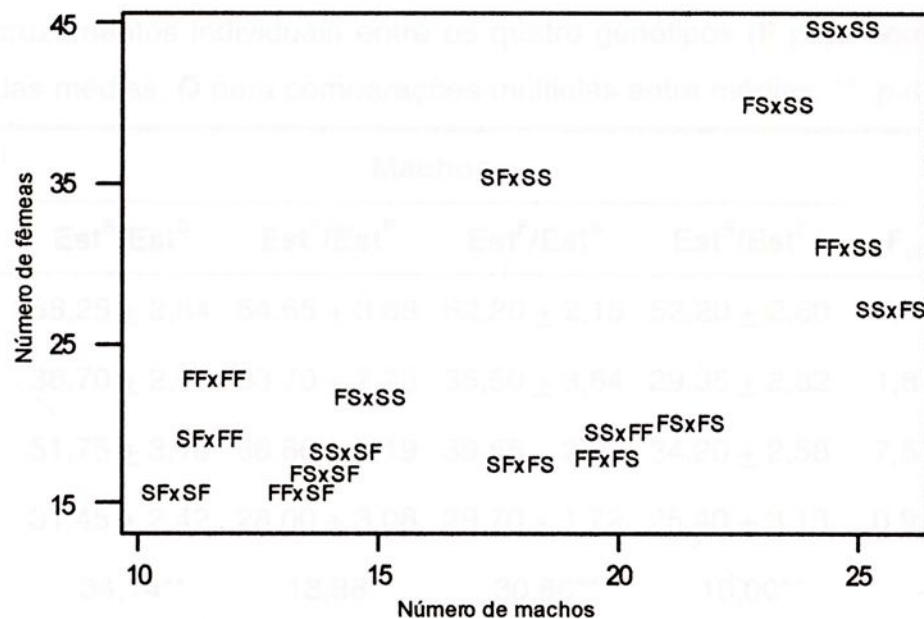


Figura 14. Diagrama ortogonal de dispersão das médias da produtividade de machos e de fêmeas nos 16 cruzamentos realizados (machos X fêmeas).

C. Viabilidade

Tabela 19. Médias e erros padrões ($\bar{x} \pm s_x$) do número de imagos produzidos nos 20 cruzamentos individuais entre os quatro genótipos (**F** para homogeneidade das médias; **Q** para comparações múltiplas entre médias; **: $p < 0,01$).

Genótipos ⁽¹⁾	Machos				F _(3;79)	Q _{0,01}	
	Fêmeas	Est ^S /Est ^S	Est ^F /Est ^F	Est ^F /Est ^S			Est ^S /Est ^F
Est ^S /Est ^S		68,25 ± 2,84	54,65 ± 3,68	62,20 ± 2,15	52,20 ± 2,60	6,49**	13,20
Est ^F /Est ^F		38,70 ± 2,58	33,70 ± 2,23	35,50 ± 3,64	29,35 ± 2,82	1,85	-
Est ^F /Est ^S		51,75 ± 3,16	36,60 ± 3,19	39,55 ± 2,32	34,20 ± 2,58	7,54**	13,04
Est ^S /Est ^F		31,45 ± 2,42	28,00 ± 3,08	29,70 ± 1,72	25,40 ± 3,13	0,95	-
F _(3;79)		34,14**	13,88**	30,86**	18,00**	-	-
Q _{0,01}		12,71	14,20	11,76	12,83	-	-

⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

C. Viabilidade

A viabilidade, em termos percentuais, foi estimada em diversas etapas do desenvolvimento, ou seja, viabilidade ovo-larva, ovo-pupa, ovo-imago e pupa-imago e, os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 20 e 21. A partir do número de ovos eclodidos dos quatro genótipos, após 48 horas da ovoposição, em grupos de 100 ovos em cada uma das cinco placas, foram obtidos os valores da Tabela 20, onde pode ser observado que a viabilidade média ovo-larva variou de 90,20% a 95,20%, de acordo com o genótipo dos embriões. Os valores de $F(3;19)$ da análise de variância e de $Q_{0,01}$ do teste de Tukey ($F=23,34$; $p<0,01$; $Q_{0,01}=2,77$) mostraram a heterogeneidade entre as médias, que podem ser reunidas em dois grupos: um grupo, com a maior viabilidade média (aproximadamente 95%), formado pelos embriões de genótipos **Est^S/Est^S** e **Est^F/Est^S** e, um segundo grupo, formado pelos embriões de genótipos **Est^F/Est^F** e **Est^S/Est^F**, com os menores valores (aproximadamente 90%).

Na Tabela 21 podem ser observados os números absolutos de pupas e de imagos, obtidos a partir de 200 ovos (em 40 grupos de 5 ovos por tubo) e, as respectivas viabilidades ovo-pupa, ovo-imago, pupa-imago dos quatro genótipos estudados. As maiores viabilidades foram obtidas para os indivíduos portadores do genótipo **Est^S/Est^S**, seguidos pelos portadores do genótipo **Est^F/Est^S**, excetuando-se o valor da viabilidade ovo-pupa do genótipo **Est^F/Est^F** (86,50). Embora diferenças significativas não possam ser testadas, não foram detectados valores de viabilidade muito distantes, sendo que estas diferenças só ultrapassaram a barreira dos 10% nas comparações entre a viabilidade ovo-imago dos genótipos **Est^S/Est^S** (84,00%) e **Est^S/Est^F** (72,00%) e entre a viabilidade pupa-imago dos genótipos **Est^F/Est^S** (97,52%) e **Est^F/Est^F** (86,13%).



Tabela 20. Médias e erros padrões ($\bar{x} \pm s_x$) da viabilidade ovo-larva, após 48 horas da ovoposição, em cinco placas contendo 100 ovos, para cada um dos quatro genótipos (**F** para homogeneidade das médias; **Q** para comparações múltiplas entre médias; **: $p < 0,01$).

Genótipo ⁽¹⁾	Número de ovos	
	Eclodidos (%)	Não-Eclodidos(%)
Est^S/Est^S	95,20 $\pm$ 0,37	4,80 $\pm$ 0,37
Est^F/Est^F	90,80 $\pm$ 0,58	9,20 $\pm$ 0,58
Est^F/Est^S	95,00 $\pm$ 0,55	5,00 $\pm$ 0,55
Est^S/Est^F	90,20 $\pm$ 0,66	9,80 $\pm$ 0,58
F_(3;19)	23,34**	
Q_{0,01}	2,77	

⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

D. Tempos de desenvolvimento

As médias dos tempos de desenvolvimento (em dias) ovo-pupa e ovo-imago (machos e fêmeas) dos quatro genótipos são apresentadas na Tabela 22. As variações foram de 8,45 (Est^S/Est^S) a 9,14 dias (Est^S/Est^F) para o tempo ovo-pupa, de 13,24 (Est^S/Est^S) a 13,67 dias (Est^F/Est^F) para o tempo ovo-fêmea, de 13,03 (Est^S/Est^S) a 13,98 dias (Est^S/Est^F) para o tempo ovo-macho e de 13,15 (Est^F/Est^S) a 13,79 dias (Est^F/Est^F) para o tempo pupa-imago.

Tabela 21. Número absoluto de ovos, pupas e imagos e viabilidade ovo-pupa, ovo-imago e pupa-imago dos quatro genótipos, em 40 tubos com cinco ovos cada.

Genótipo ⁽¹⁾	Número absoluto de			Viabilidade (%)		
	ovos	pupas	imagos	ovo-pupa	pupa-imago	ovo-imago
Est^S/Est^S	200	173	168	86,50	97,11	84,00
Est^F/Est^F	200	173	149	86,50	86,13	74,50
Est^F/Est^S	200	161	157	80,50	97,52	78,50
Est^S/Est^F	200	159	144	79,50	90,57	72,00

⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

T.D. ovo-pupa	Est^S/Est^S 8,45	Est^S/Est^S 8,47	Est^S/Est^F 9,06	Est^F/Est^F 9,14
T.D. ovo-fêmea	Est^S/Est^S 13,24	Est^F/Est^S 13,25	Est^S/Est^F 13,64	Est^F/Est^F 13,67
T.D. ovo-macho	Est^S/Est^S 13,03	Est^F/Est^S 13,06	Est^S/Est^F 13,38	Est^F/Est^F 13,98
T.D. pupa-imago	Est^F/Est^S 13,15	Est^S/Est^F 13,16	Est^F/Est^F 13,55	Est^S/Est^F 13,79

Não foram observadas diferenças significativas entre as médias dos tempos de desenvolvimento ovo-fêmea e ovo-macho, com exceção do genótipo Est^F/Est^F que apresentou o tempo ovo-macho significativamente menor que o tempo ovo-fêmea, respectivamente 13,38 dias e 13,67 dias ($t=2,37$; $p<0,05$).

A Tabela 23 contém as médias dos tempos de desenvolvimento pupa-imago (macho e fêmea) dos quatro genótipos. Foi observada a variação de 4,66

D. Tempos de desenvolvimento

As médias dos tempos de desenvolvimento (em dias) ovo-pupa e ovo-imago (machos e fêmeas) dos quatro genótipos são apresentadas na Tabela 22. As variações foram de 8,45 (Est^S/Est^S) a 9,14 dias (Est^S/Est^F) para o tempo ovo-pupa, de 13,24 (Est^S/Est^S) a 13,67 dias (Est^F/Est^F) para o tempo ovo-fêmea, de 13,03 (Est^S/Est^S) a 13,98 dias (Est^S/Est^F) para o tempo ovo-macho e de 13,15 (Est^F/Est^S) a 13,79 dias (Est^S/Est^F) para o tempo ovo-imago.

A análise de variância para a homogeneidade das médias mostrou diferenças altamente significantes ($p < 0,01$) entre os genótipos. O teste para comparações múltiplas de Newman-Keuls não rejeitou a igualdade entre as médias dos genótipos Est^S/Est^S e Est^F/Est^S e entre as médias de Est^F/Est^F e Est^S/Est^F para os tempos de desenvolvimento ovo-pupa, ovo-fêmea e ovo-imago, ao nível de significância de 0,01. Todavia, para os tempos de desenvolvimento ovo-macho, não houve a rejeição da igualdade das médias dos genótipos Est^S/Est^S , Est^F/Est^S e Est^F/Est^F , diferenciando apenas o genótipo Est^S/Est^F . Estas comparações estão representadas no diagrama abaixo:

T.D. ovo-pupa	Est^S/Est^S 8,45	Est^F/Est^S 8,47	Est^F/Est^F 9,06	Est^S/Est^F 9,14
T.D. ovo-fêmea	Est^S/Est^S 13,24	Est^F/Est^S 13,25	Est^S/Est^F 13,64	Est^F/Est^F 13,67
T.D. ovo-macho	Est^S/Est^S 13,03	Est^F/Est^S 13,06	Est^F/Est^F 13,38	Est^S/Est^F 13,98
T.D. ovo-imago	Est^F/Est^S 13,15	Est^S/Est^S 13,16	Est^F/Est^F 13,55	Est^S/Est^F 13,79

Não foram observadas diferenças significantes entre as médias dos tempos de desenvolvimento ovo-fêmea e ovo-macho, com exceção do genótipo Est^F/Est^F que apresentou o tempo ovo-macho significativamente menor que o tempo ovo-fêmea, respectivamente 13,38 dias e 13,67 dias ($t=2,37$; $p < 0,05$).

A Tabela 23 contém as médias dos tempos de desenvolvimento pupa-imago (macho e fêmea) dos quatro genótipos. Foi observada a variação de 4,66

(Est^F/Est^F) a 4,88 dias (Est^F/Est^S) para os tempos pupa-fêmea, de 4,50 (Est^F/Est^S) a 4,60 dias (Est^F/Est^F) para os tempos pupa-macho e de 4,64 (Est^F/Est^F) a 4,73 dias (Est^S/Est^S e Est^S/Est^F) para os tempos pupa-imago. Não foram encontradas diferenças significantes entre as médias através da análise de variância ($p>0,05$).

Quando foram comparados os tempos de desenvolvimento entre os sexos, os tempos pupa-fêmea foram ligeiramente maiores que os pupa-macho, embora tenham sido observadas diferenças significantes ($p<0,01$) apenas para os genótipos Est^S/Est^S e Est^F/Est^S .

Genótipo ¹⁾	ovo-pupa n	ovo-fêmea n	ovo-macho n	t	glp	ovo-imago n
Est^S/Est^S	8,45 ± 0,06 172	13,24 ± 0,03 98	13,03 ± 0,10 70	1,94	153	13,15 ± 0,05 166
Est^F/Est^F	9,06 ± 0,06 173	13,57 ± 0,08 98	13,38 ± 0,10 63	2,37*	127	13,55 ± 0,06 149
Est^F/Est^S	8,47 ± 0,06 161	13,25 ± 0,07 77	13,08 ± 0,10 80	1,53	144	13,15 ± 0,06 157
Est^S/Est^F	9,14 ± 0,06 159	13,64 ± 0,11 81	13,36 ± 0,15 63	1,78	120	13,72 ± 0,08 144
F	33,15**	8,88**	15,15**			21,44**
gl _{1,0}	3,634	3,341	3,275			3,617

¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

Tabela 22. Médias e erros padrões ($\bar{x} \pm s_x$) do tempo de desenvolvimento (em dias) ovo-pupa, ovo-fêmea, ovo-macho e ovo-imago dos quatro genótipos (**t** para diferença entre médias de machos e de fêmeas; **F** para homogeneidade das médias; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; **glp**: graus de liberdade ponderados para variâncias desiguais; **gl_(e;t)**: graus de liberdade entre os fatores e total).

Genótipo ⁽¹⁾	ovo-pupa	n	ovo-fêmea	n	ovo-macho	n	t	glp	ovo-imago	n
Est^S/Est^S	8,45 ± 0,06	172	13,24 ± 0,05	98	13,03 ± 0,10	70	1,94	153	13,16 ± 0,05	168
Est^F/Est^F	9,06 ± 0,06	173	13,67 ± 0,08	86	13,38 ± 0,10	63	2,37*	127	13,55 ± 0,06	149
Est^F/Est^S	8,47 ± 0,05	161	13,25 ± 0,07	77	13,06 ± 0,10	80	1,53	144	13,15 ± 0,06	157
Est^S/Est^F	9,14 ± 0,08	159	13,64 ± 0,11	81	13,98 ± 0,15	63	1,78	120	13,79 ± 0,09	144
F	33,15**		8,86**		15,15**				21,44**	
gl_(e;t)	3;664		3;341		3;275				3;617	

⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

E. Estimativa do valor adaptativo

Com os valores médios de cada componente (Tabela 24) foram estimados índices de seleção (s) para cada alelo (a) para cada um dos quatro genótipos estudados. Estes valores já foram apresentados na Tabela 15 (longevidade de machos e de fêmeas juntas), na Tabela 19 (produtividade de imagos), na Tabela 20 (viabilidade ovo-lerva), na Tabela 21

Tabela 23. Médias e erros padrões ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) do tempo de desenvolvimento (em dias) pupa-fêmea, pupa-macho e pupa-imago dos quatro genótipos (**t** para diferença entre médias de machos e de fêmeas; **F** para homogeneidade das médias; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; **glp**: graus de liberdade ponderados para variâncias desiguais; **gl_(e;t)**: graus de liberdade entre os fatores e total).

Genótipo ⁽¹⁾	pupa-fêmea	n	pupa-macho	n	t	glp	pupa-imago	n
Est ^S /Est ^S	4,83 $\pm$ 0,05	98	4,59 $\pm$ 0,07	69	2,79**	136	4,73 $\pm$ 0,04	167
Est ^F /Est ^F	4,66 $\pm$ 0,06	86	4,60 $\pm$ 0,15	63	0,37	78	4,64 $\pm$ 0,07	149
Est ^F /Est ^S	4,88 $\pm$ 0,05	77	4,50 $\pm$ 0,07	80	4,34**	143	4,69 $\pm$ 0,05	157
Est ^S /Est ^F	4,84 $\pm$ 0,08	81	4,59 $\pm$ 0,10	63	1,94	123	4,73 $\pm$ 0,06	144
F	2,54		0,25				0,60	
gl_(e;t)	3;341		3;274				3;616	

⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

E. Estimativa do valor adaptativo

Com os valores médios de cada componente (Tabela 24) foram estimados índices representativos do valor adaptativo total (**W'e**) para cada um dos quatro genótipos estudados. Estes valores já foram apresentados anteriormente na Tabela 15 (longevidades de machos e de fêmeas mantidos juntos), na Tabela 19 (produtividade de imagos), na Tabela 20 (viabilidade ovo-larva), na Tabela 21 (viabilidades ovo-pupa e pupa-imago), na Tabela 22 (tempo de desenvolvimento ovo-pupa) e na Tabela 23 (tempo de desenvolvimento pupa-imago).

Os valores adaptativos, absolutos e relativos, calculados a partir dos valores percentuais de cada componente, para cada genótipo, em relação à média das médias dos componentes da Tabela 24, são apresentados na Tabela 25. Os maiores valores relativos de **W'e** foram observados para os genótipos **Est^S/Est^S** (1,000) e **Est^F/Est^S** (0,892) e, os menores, para os genótipos **Est^F/Est^F** (0,863) e **Est^S/Est^F** (0,842).

TDOP	8,45	9,06	8,47	9,14	8,78
TDPI	4,73	4,64	4,69	4,73	4,70

LMA: longevidade de machos mantidos com fêmeas; LFA: longevidade de fêmeas mantidas com machos; PI: produtividade de imagos; VOL: viabilidade ovo-larva; VOP: viabilidade ovo-pupa; VPI: viabilidade pupa-imago; TDOP: tempo de desenvolvimento ovo-pupa; TDPI: tempo de desenvolvimento pupa-imago; (*) a sigla à esquerda de cada linha indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

Tabela 24. Médias dos componentes do valor adaptativo dos quatro genótipos e médias das médias.

Componente	Genótipo ⁽¹⁾				Média das médias
	Est ^S /Est ^S	Est ^F /Est ^F	Est ^F /Est ^S	Est ^S /Est ^F	
LMA	91,14	78,24	82,48	82,38	83,56
LFA	63,10	56,34	57,60	54,96	58,00
PI	68,25	33,70	39,55	25,40	41,72
VOL	95,20	90,80	95,00	90,20	92,80
VOP	86,50	86,50	80,50	79,50	83,25
VPI	97,11	86,13	97,52	90,57	92,83
TDOP	8,45	9,06	8,47	9,14	8,78
TDPI	4,73	4,64	4,69	4,73	4,70

LMA: longevidade de machos mantidos com fêmeas; **LFA:** longevidade de fêmeas mantidas com machos; **PI:** produtividade de imagos; **VOL:** viabilidade ovo-larva; **VOP:** viabilidade ovo-pupa; **VPI:** viabilidade pupa-imago; **TDOP:** tempo de desenvolvimento ovo-pupa; **TDPI:** tempo de desenvolvimento pupa-imago; ⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

Tabela 25. Valores médios percentuais, em relação às médias das médias dos componentes, e valores adaptativos estimados (**W'e**), absoluto e relativo, para os quatro genótipos estudados.

Componente	Genótipo ⁽¹⁾			
	Est ^S /Est ^S	Est ^F /Est ^F	Est ^F /Est ^S	Est ^S /Est ^F
LMA	109,07	93,63	98,71	98,59
LFA	108,79	97,14	99,31	94,76
PI	163,57	80,77	94,79	60,86
VOL	102,59	97,84	102,37	97,20
VOP	103,90	103,90	96,70	95,50
VPI	104,61	92,78	105,05	97,56
TDOP	96,24	103,19	96,47	104,10
TDPI	100,69	98,78	99,84	100,69
W'e absoluto	889,46	768,03	793,24	749,26
W'e relativo	1,000	0,863	0,892	0,842

LMA: longevidade de machos mantidos com fêmeas; **LFA:** longevidade de fêmeas mantidas com machos; **PI:** produtividade de imagos; **VOL:** viabilidade ovo-larva; **VOP:** viabilidade ovo-pupa; **VPI:** viabilidade pupa-imago; **TDOP:** tempo de desenvolvimento ovo-pupa; **TDPI:** tempo de desenvolvimento pupa-imago; ⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.



III.3. Frequências genóticas e gênicas na descendência de cruzamentos individuais entre heterozigotos

A partir da análise eletroforética das amostras de indivíduos adultos recém-emergidos dos cruzamentos realizados para o estudo da longevidade de heterozigotos acasalados, foram obtidos os resultados das Tabelas 26 e 27. Na Tabela 26 são mostrados os valores percentuais dos genótipos ao longo dos sete períodos de ovoposição, para os dois cruzamentos. Observa-se diferença significativa do esperado teórico (25% **Est^S/Est^S** : 50% **Est^S/Est^F** : 25% **Est^F/Est^F**) apenas para a frequência genotípica média da descendência do cruzamento entre os heterozigotos **Est^F/Est^S** ($\chi^2=9,18$; $p<0,01$). Conseqüentemente, através da análise dos valores percentuais da Tabela 27, que trata das frequências dos alelos **Est^S** e **Est^F**, pode ser observada a desigualdade estatística entre os valores observados para o cruzamento entre os heterozigotos **Est^F/Est^S** e o esperado teórico de 50% para cada alelo ($\chi^2=4,53$; $p<0,01$).

Na Figura 15 é apresentada uma imagem digitalizada de um gel, ilustrativa da análise eletroforética da progênie dos cruzamentos entre híbridos **Est^F/Est^S**, onde podem ser visualizados os padrões de banda de cada genótipo. Das quinze moscas analisadas, seis tinham genótipo **Est^S/Est^S** (40,00%), oito eram heterozigotas (53,33%) e apenas uma tinha genótipo **Est^F/Est^F** (6,67%). As frequências alélicas calculadas foram de 66,66% e 33,34% para os alelos **Est^S** e **Est^F**, respectivamente.



Tabela 26. Frequências genótípicas da descendência dos cruzamentos entre heterozigotos, ao longo de sete períodos de quatro dias de ovoposição (χ^2 de igualdade; **: $p<0,01$).

Período	Genótipo ⁽¹⁾					
	Est ^F /Est ^S X Est ^F /Est ^S			Est ^S /Est ^F X Est ^S /Est ^F		
	Est ^S /Est ^S	Heterozigoto	Est ^F /Est ^F	Est ^S /Est ^S	Heterozigoto	Est ^F /Est ^F
1	36,67	46,67	16,67	26,67	36,67	36,67
2	33,33	60,00	6,67	30,00	46,67	23,33
3	36,67	50,00	13,33	23,33	63,33	13,33
4	46,67	40,00	13,33	29,63	48,15	22,22
5	37,04	51,85	11,11	17,67	50,00	33,33
6	30,00	53,33	16,67	33,33	50,00	16,67
7	33,33	40,00	26,67	26,67	36,67	36,67
$\bar{x} \pm S_x$	36,24 $\pm$ 5,25	48,24 $\pm$ 7,26	14,92 $\pm$ 6,21	26,61 $\pm$ 5,41	47,35 $\pm$ 9,12	26,03 $\pm$ 9,58
χ^2	9,18**			0,29		

⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

Tabela 27. Freqüências gênicas da descendência dos cruzamentos entre heterozigotos, ao longo de sete períodos de ovoposição (χ^2 de igualdade; **: $p < 0,01$).

Período	Genótipo ⁽¹⁾			
	Est ^F /Est ^S X Est ^F /Est ^S ⁽¹⁾		Est ^S /Est ^F X Est ^S /Est ^F ⁽²⁾	
	Est ^S	Est ^F	Est ^S	Est ^F
1	60,00	40,00	45,00	55,00
2	63,33	36,67	53,33	46,67
3	61,67	38,33	55,00	45,00
4	66,67	33,33	53,70	46,30
5	62,96	37,04	41,67	58,33
6	56,67	43,33	58,33	41,67
7	53,33	46,67	45,00	55,00
$\bar{x} \pm s_x$	60,66 $\pm$ 4,46	39,34 $\pm$ 4,46	50,29 $\pm$ 6,30	49,71 $\pm$ 6,30

χ^2 4,53** 0,02

⁽¹⁾ a sigla à esquerda da barra indica a origem paterna do alelo e, à direita, a origem materna.

III.4. Alterações nas frequências gênicas e genotípicas em populações

A. Simulação segundo os valores adaptativos

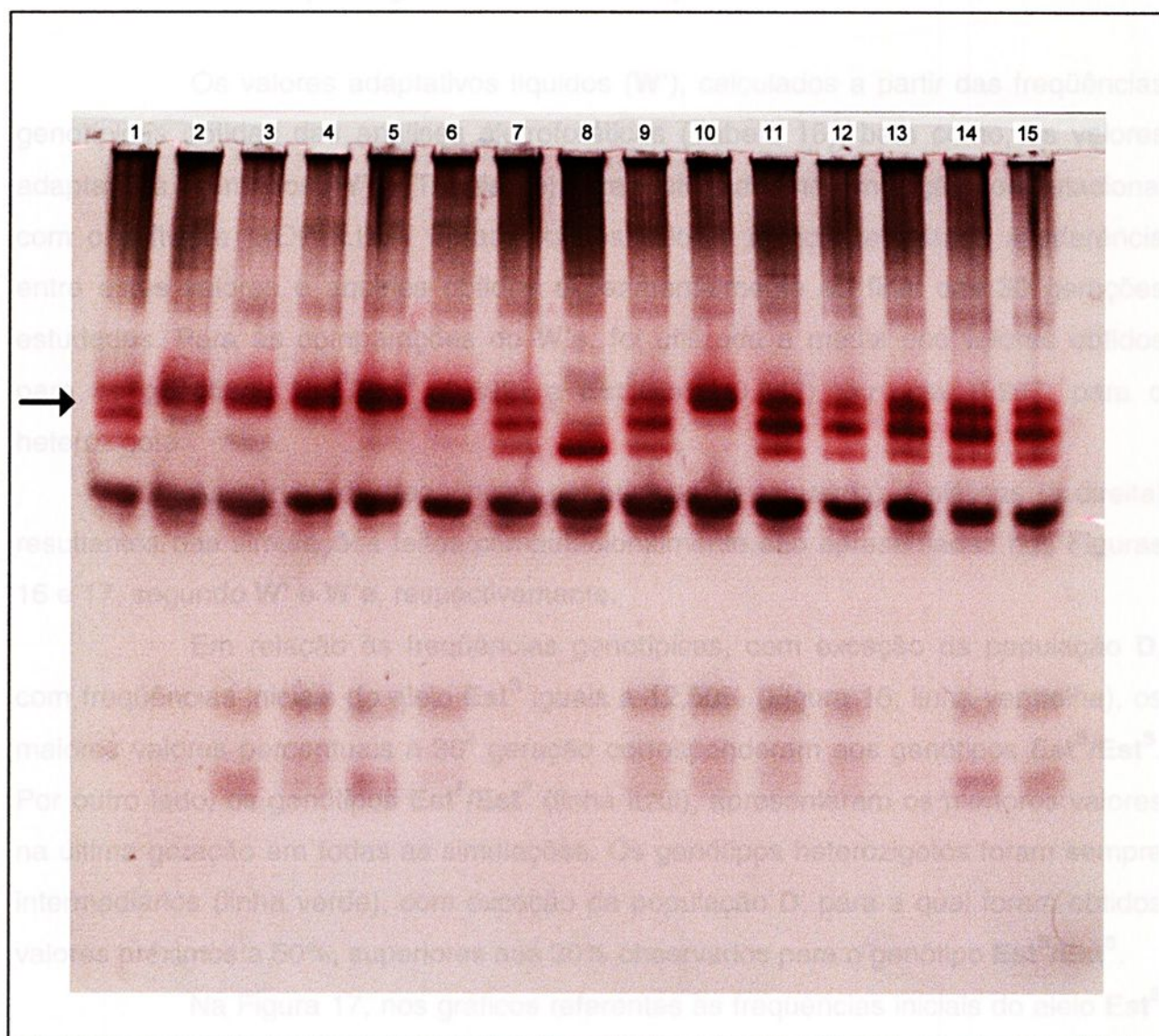


Figura 15. Imagem digitalizada de um gel ilustrativo do padrão de bandas obtido para os genótipos homozigotos Est^S/Est^S (eg. coluna 2) e Est^F/Est^F (eg. coluna 8) e, para os híbridos (eg. coluna 1) da esterase-8 (seta), nos cruzamentos entre híbridos Est^F/Est^S .

III.4. Alterações nas frequências gênicas e genotípicas em populações

A. Simulação segundo os valores adaptativos

Os valores adaptativos líquidos (W'), calculados a partir das frequências genotípicas obtidas das análises eletroforéticas (Tabela 16), bem como, os valores adaptativos estimados ($W'e$) (Tabela 25), foram utilizados na simulação computacional com o software "POPULUS". Foram obtidos valores teóricos e testada a aderência entre estes valores e aqueles obtidos experimentalmente ao final das 30 gerações estudadas. Para as comparações do $W'e$, foi utilizada a média dos valores obtidos para os genótipos Est^F/Est^S (0,892) e Est^S/Est^F (0,842), ou seja, 0,867, para o heterozigoto.

As curvas de frequências genotípicas (à esquerda) e alélicas (à direita) resultantes das simulações feitas computacionalmente são apresentadas nas Figuras 16 e 17, segundo W' e $W'e$, respectivamente.

Em relação às frequências genotípicas, com exceção da população **D**, com frequências iniciais do alelo Est^S iguais a 12,50% (Figura 16; linha vermelha), os maiores valores percentuais à 30ª geração corresponderam aos genótipos Est^S/Est^S . Por outro lado, os genótipos Est^F/Est^F (linha azul), apresentaram os menores valores na última geração em todas as simulações. Os genótipos heterozigotos foram sempre intermediários (linha verde), com exceção da população **D**, para a qual foram obtidos valores próximos a 50%, superiores aos 30% observados para o genótipo Est^S/Est^S .

Na Figura 17, nos gráficos referentes às frequências iniciais do alelo Est^S similares às das populações **A**, **B**, **C** e **E**, respectivamente de 50,00%, 25,00%, 75,00% e 87,50%, pode ser observada a superioridade percentual obtida computacionalmente para o genótipo Est^S/Est^S , segundo o $W'e$. Todavia, no gráfico com frequência inicial do alelo Est^S igual àquela que iniciou a população **D**, ou seja 12,50%, o valor do genótipo Est^S/Est^S foi inferior aos demais, sendo observada a superioridade para o genótipo Est^F/Est^F .

Considerando-se as frequências alélicas, na Figura 16 pode ser observado que o alelo Est^S foi o mais freqüente na 30ª geração nas cinco simulações, independentemente das frequências iniciais. Na Figura 17, o mesmo pode ser observado, com exceção do gráfico que representa a simulação segundo o $W'e$ da população **D**, para a qual a frequência deste alelo, ainda que ascendente, não suplantou à 30ª geração a frequência do alelo Est^F .

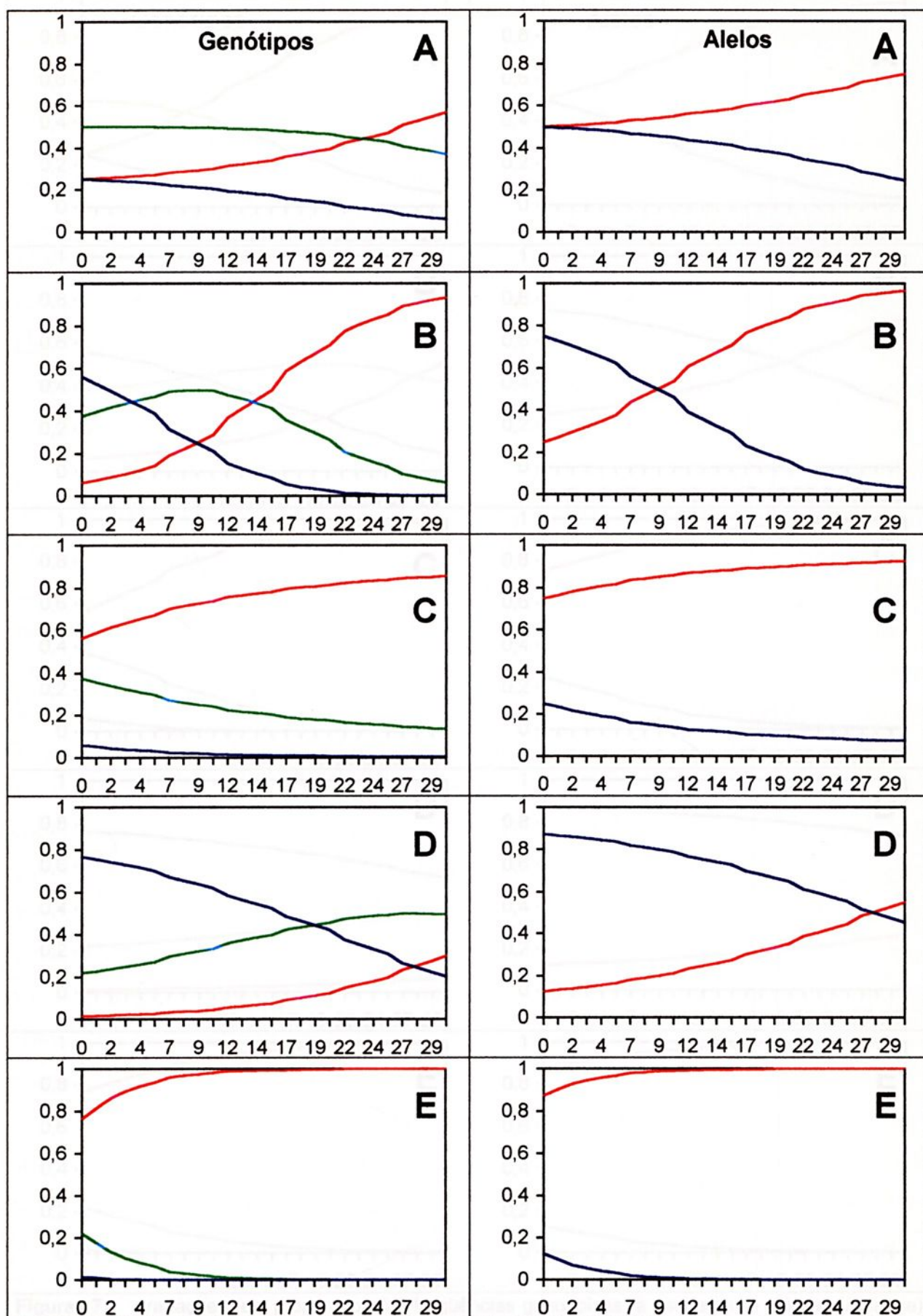


Figura 16. Variações (em proporção) das frequências genotípicas (à esquerda) e alélicas (à direita) obtidas nas cinco populações, por simulação computacional utilizando-se do valor adaptativo líquido W' ($\blacklozenge Est^S/Est^S$, $\blacklozenge Est^S/Est^F$, $\blacklozenge Est^F/Est^F$; $\blacklozenge Est^S$, $\blacklozenge Est^F$).

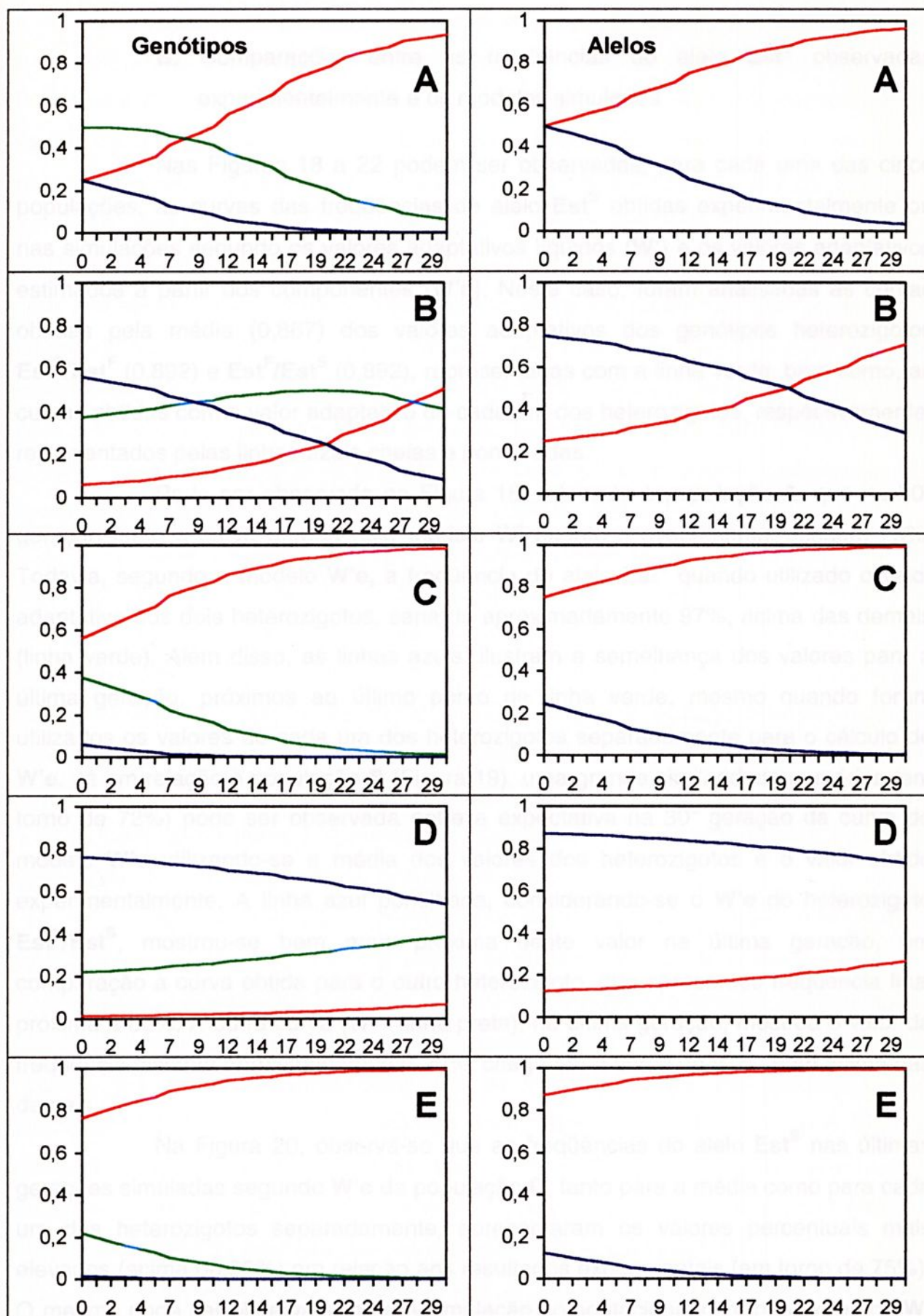


Figura 17. Variações (em proporção) das frequências genotípicas (à esquerda) e alélicas (à direita) obtidas por simulação computacional em cinco populações iniciadas com frequências iguais às populações experimentais, utilizando-se o valor adaptativo estimado W^e (♦ Est^S/Est^S , ♦ Est^S/Est^F , ♦ Est^F/Est^F ; ◆ Est^S , ◆ Est^F).

B. Comparações entre as freqüências do alelo **Est^S** observadas experimentalmente e os modelos simulados

Nas Figuras 18 a 22 podem ser observadas, para cada uma das cinco populações, as curvas das freqüências do alelo **Est^S** obtidas experimentalmente ou nas simulações segundo os valores adaptativos líquidos (**W'**) e os valores adaptativos estimados a partir dos componentes (**W'e**). Neste caso, foram analisadas as curvas obtidas pela média (0,867) dos valores adaptativos dos genótipos heterozigotos **Est^S/Est^F** (0,892) e **Est^F/Est^S** (0,892), representadas com a linha verde, bem como, as curvas obtidas com o valor adaptativo de cada um dos heterozigotos, respectivamente, representados pelas linhas azuis cheias e pontilhadas.

Pode ser observada na Figura 18, referente à população **A**, que na 30^a geração tanto a curva gerada pelo modelo **W'** quanto a experimental atingem 75%. Todavia, segundo o modelo **W'e**, a freqüência do alelo **Est^S** quando utilizado o valor adaptativo dos dois heterozigotos, seria de aproximadamente 97%, acima das demais (linha verde). Além disso, as linhas azuis, ilustram a semelhança dos valores para a última geração, próximos ao último ponto da linha verde, mesmo quando foram utilizados os valores de cada um dos heterozigotos separadamente para o cálculo de **W'e**. Já em relação à população **B** (Figura 19), uma grande similaridade numérica (em torno de 72%) pode ser observada entre a expectativa na 30^a geração da curva do modelo **W'e** utilizando-se a média dos valores dos heterozigotos e o valor obtido experimentalmente. A linha azul pontilhada, considerando-se o **W'e** do heterozigoto **Est^F/Est^S**, mostrou-se bem mais próxima deste valor na última geração, em comparação à curva obtida para o outro heterozigoto, que apresentou freqüência final próxima a 63%. A outra curva (**W'** - linha preta), na última geração, mostrou o valor da freqüência distante aproximadamente 20%, chegando a cerca de 97%, bem acima das demais.

Na Figura 20, observa-se que as freqüências do alelo **Est^S** nas últimas gerações simuladas segundo **W'e** da população **C**, tanto para a média como para cada um dos heterozigotos separadamente, apresentaram os valores percentuais mais elevados (acima de 95%) em relação aos resultados experimentais (em torno de 75%). O mesmo pode ser observado para a simulação computacional com os valores de **W'** (linha preta), que alcançou aproximadamente 92% na última geração.

Da análise da Figura 21, relacionada à população **D**, que foi iniciada com a frequência de 12,50% de alelos **Est^S**, pode-se observar níveis percentuais muito próximos a 72% na trigésima geração da curva da população experimental; entretanto, verifica-se que as curvas dos modelos dos valores adaptativos sugerem na última geração valores percentuais em torno de 25% para **W'e** (linha verde) e de 55% para **W'** (linha preta). Destaca-se nesta figura a diferença marcante entre as linhas dos modelos **W'e** que utilizaram os diferentes valores adaptativos dos heterozigotos, ou seja, a linha pontilhada referente à simulação com os valores de **Est^F/Est^S** apresentou-se com frequência final (cerca de 41%) muito acima da curva traçada a partir do outro heterozigoto (próximo a 13%), o que numericamente contribuiu para que o valor obtido para a simulação a partir da média fosse tão baixo. Finalmente, para a população **E**, observa-se na Figura 22 uma grande similaridade entre os valores percentuais dos modelos e dos resultados experimentais, em torno de 99%.

Nas Tabelas 28 a 31 são apresentados os testes para rejeição da aderência das frequências gênicas (**Est^S**) e genótípicas obtidas experimentalmente na 30^a geração, consideradas como as frequências esperadas, àquelas obtidas pela simulação computacional, que foram consideradas como frequências observadas durante a aplicação dos testes de χ^2 (para igualdade) e **G** (logaritmo da razão de verossimilhança). Nas Tabelas 28 e 29, estão relacionadas as comparações em relação às simulações a partir dos valores adaptativos líquidos (**W'**) e, nas Tabelas 30 e 31, a partir dos valores adaptativos estimados (**W'e**), calculados a partir da média dos valores dos heterozigotos, ou de cada um deles.

Não foi rejeitada a aderência nas comparações das frequências do alelo **Est^S** através do teste de χ^2 entre os valores simulados e experimentais das populações **A** ($\chi^2 = 0,02$; $0,90 > p > 0,80$) e **E** ($\chi^2 = 3,13$; $0,10 > p > 0,05$), em relação às simulações utilizando-se os índices **W'** (Tabela 28). De forma similar, as comparações pelo teste **G** (Tabela 29), considerando-se desta vez as frequências dos três genótipos, não rejeitaram a aderência para as mesmas populações **A** (**G** = 3,03; $0,20 > p > 0,10$) e **E** (**G** = 3,98; $0,20 > p > 0,10$). Todavia, tanto para as frequências do alelo **Est^S**, quanto para as dos três genótipos, a aderência entre os valores simulados e experimentais à trigésima geração foi rejeitada para as populações **B**, **C** e **D** ($p < 0,01$).

As frequências obtidas para a trigésima geração nas simulações utilizando-se os índices **W'e** ajustaram-se às experimentais nas populações **B** e **E**. Quando foi considerada a variação percentual do alelo **Est^S**, na Tabela 30, os valores do teste χ^2 não foram significantes para o estudo que utilizou a média dos valores



adaptativos para o cálculo ($\chi^2=0,02$, $0,90>p>0,80$; $\chi^2=2,70$, $0,20>p>0,10$; respectivamente), bem como, para quando foram utilizados o valor do heterozigoto Est^F/Est^S ($\chi^2=0,56$, $0,90>p>0,80$; $\chi^2=2,20$, $0,20>p>0,10$; respectivamente) ou o do heterozigoto Est^S/Est^F ($\chi^2=2,22$, $0,20>p>0,10$; $\chi^2=2,95$, $0,10>p>0,05$; respectivamente). Deve-se ressaltar que neste último caso, as probabilidades dos valores de χ^2 foram bem mais próximas do nível de rejeição de 0,05. Para as populações **A**, **C** e **D**, os valores simulados não se mostraram aderentes.

Quando foi considerada a variação percentual dos três genótipos, na Tabela 31, os valores do teste **G** também não foram significantes (**G**=0,48, $0,90>p>0,80$; **G**=2,86, $0,30>p>0,20$), para as populações **B** e **E**, respectivamente, quando foi considerada a média dos heterozigotos para o cálculo do **W'e**. Também, considerando-se o modelo segundo cada um dos heterozigotos, os valores de **G** continuaram não significantes. Da mesma forma que para o estudo das freqüências alélicas, para as populações **A**, **C** e **D**, os valores simulados para as freqüências genotípicas não se mostraram aderentes aos observados experimentalmente.

Na Tabela 32 são apresentadas as freqüências do alelo Est^S obtidas na trigésima geração nas cinco populações experimentais e nas simulações computacionais segundo os valores adaptativos líquidos **W'** e **W'e** (calculado a partir da média dos valores adaptativos dos heterozigotos). Pode ser observado para a população **A** que as freqüências distribuem-se em um intervalo de 20%, ou seja, de 75,39% (**W'**) a 96,72% (**W'e**). Para a população **B** destaca-se a proximidade entre o valor simulado para os índices **W'e** (71,07%) com o obtido experimentalmente (70,83%). Quanto aos valores para a população **C**, pode ser observada a proximidade entre os dois valores obtidos para a simulação dos índices (99,38% e 92,57%), distantes cerca de 12% do obtido experimentalmente. O valor mais discrepante observado refere-se à simulação a partir do índice **W'e** para a população **D**, ou seja, 26,48%, muito distante dos demais, principalmente da freqüência experimental, que foi de 72,08%. Finalmente, para a população **E**, observa-se a proximidade numérica entre os valores obtidos das simulações e o obtido experimentalmente, todos maiores que 97%.

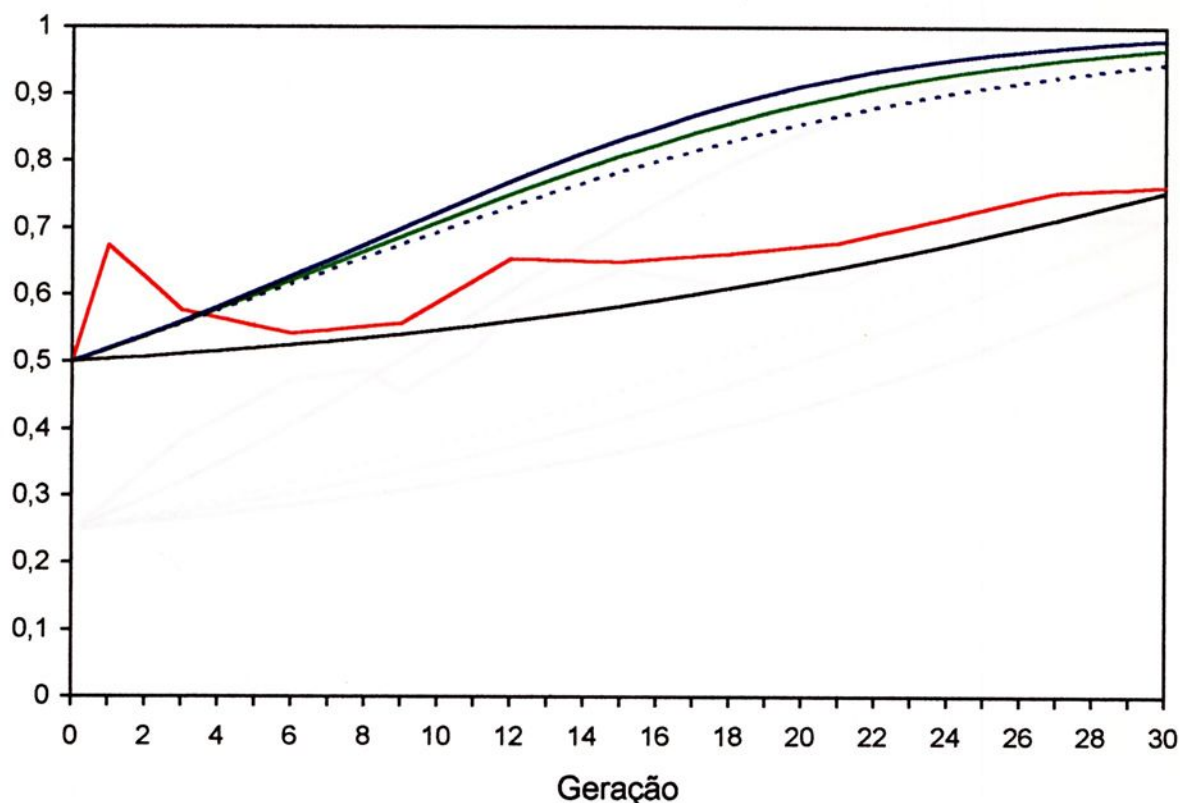


Figura 18. Variações (em proporção) nas frequências do alelo Est^S segundo os modelos de W' (linha preta) e $W'e$ (linha verde) em comparação ao observado (linha vermelha) para a população A. As linhas azuis cheia e pontilhada representam, respectivamente, os modelos calculados segundo os valores adaptativos dos heterozigotos Est^S/Est^F e Est^F/Est^S .

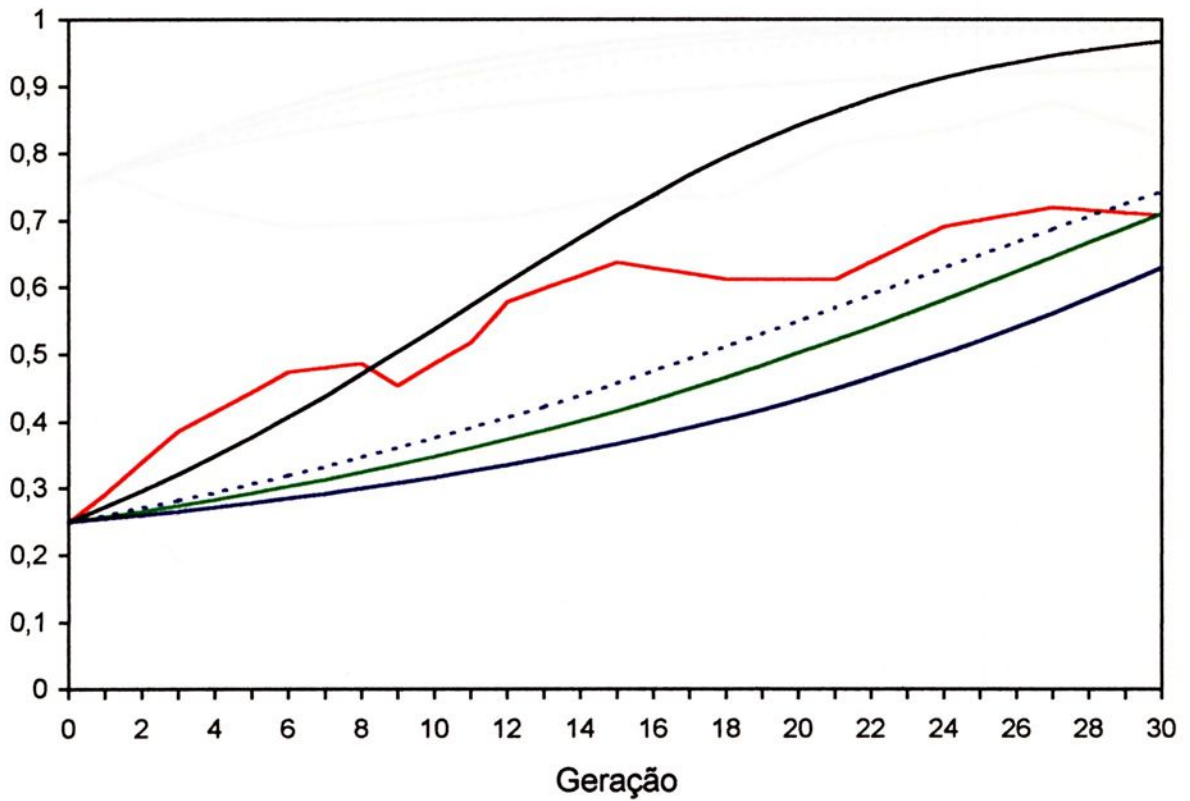


Figura 19. Variações (em proporção) nas freqüências do alelo Est^S segundo os modelos de W' (linha preta) e $W'e$ (linha verde) em comparação ao observado (linha vermelha) para a população B. As linhas azuis cheia e pontilhada representam, respectivamente, os modelos calculados segundo os valores adaptativos dos heterozigotos Est^S/Est^F e Est^F/Est^S .

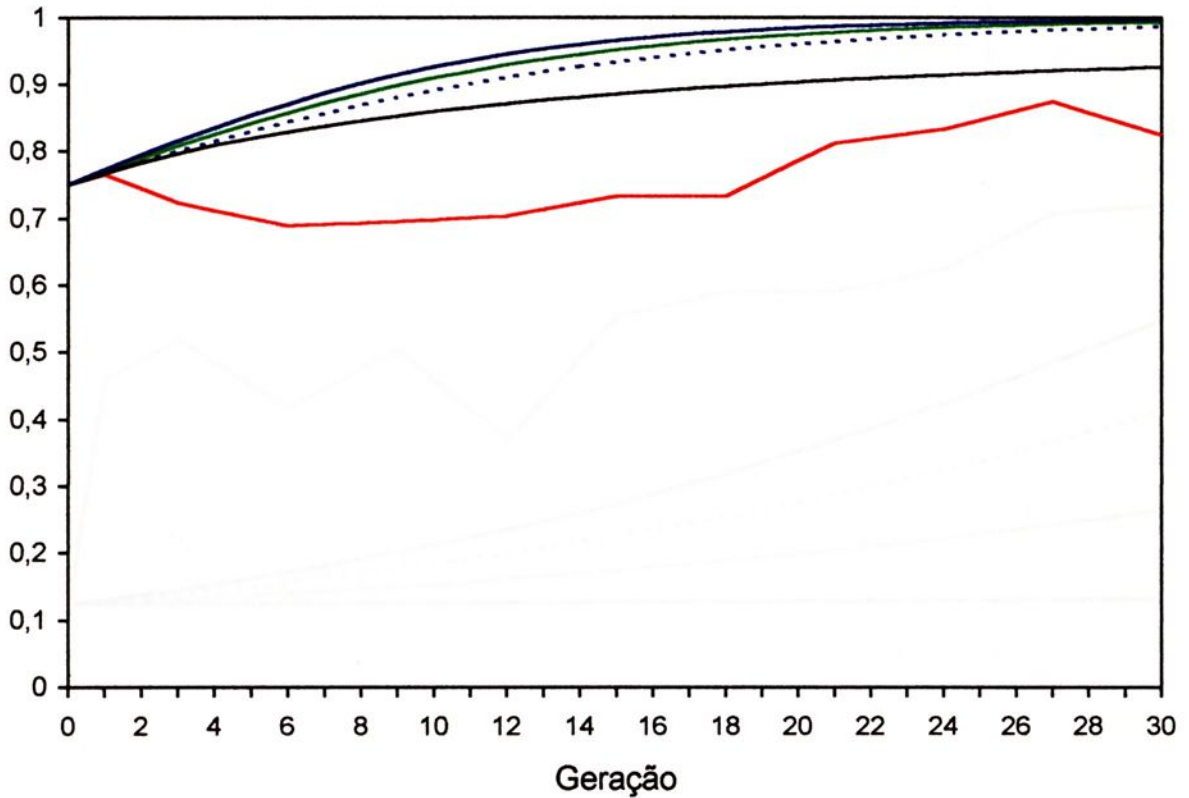


Figura 20. Variações (em proporção) nas frequências do alelo Est^S segundo os modelos de W (linha preta) e $W'e$ (linha verde) em comparação ao observado (linha vermelha) para a população C. As linhas azuis cheia e pontilhada representam, respectivamente, os modelos calculados segundo os valores adaptativos dos heterozigotos Est^S/Est^F e Est^F/Est^S .

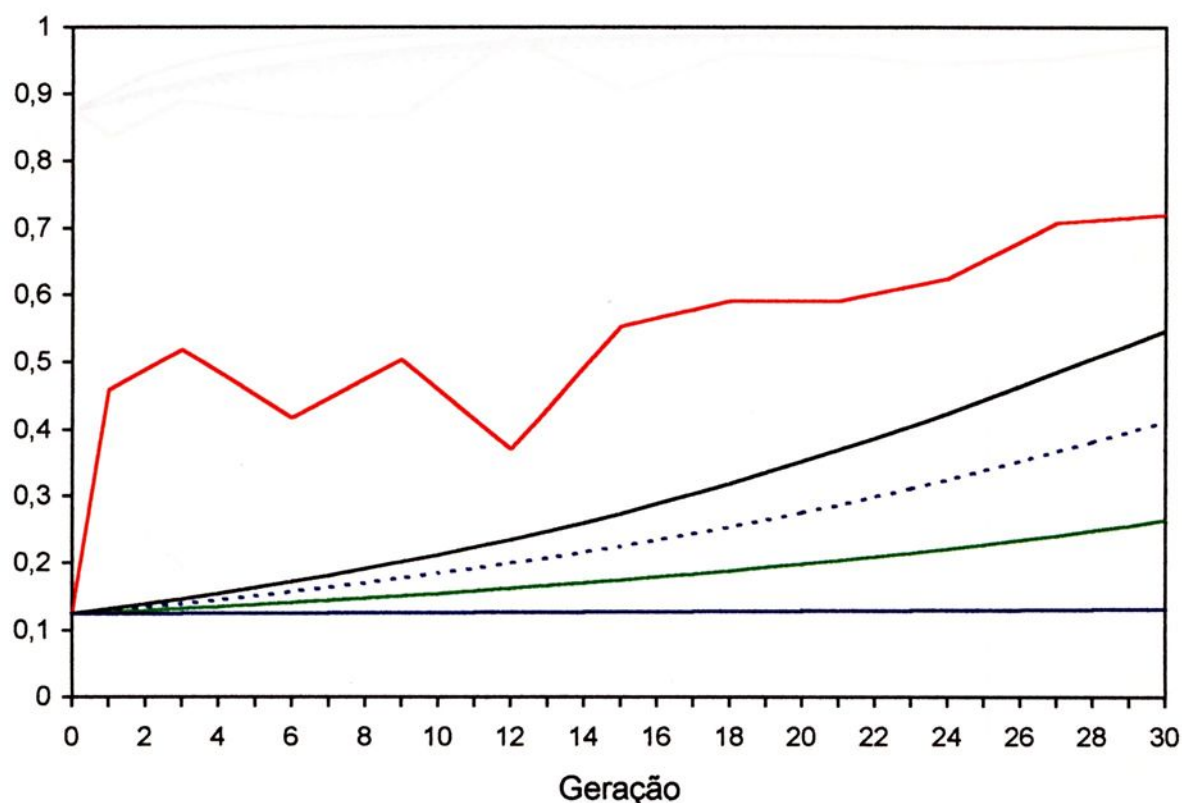


Figura 21. Variações (em proporção) nas frequências do alelo Est^S segundo os modelos de W' (linha preta) e $W'e$ (linha verde) em comparação ao observado (linha vermelha) para a população D. As linhas azuis cheia e pontilhada representam, respectivamente, os modelos calculados segundo os valores adaptativos dos heterozigotos Est^S/Est^F e Est^F/Est^S .

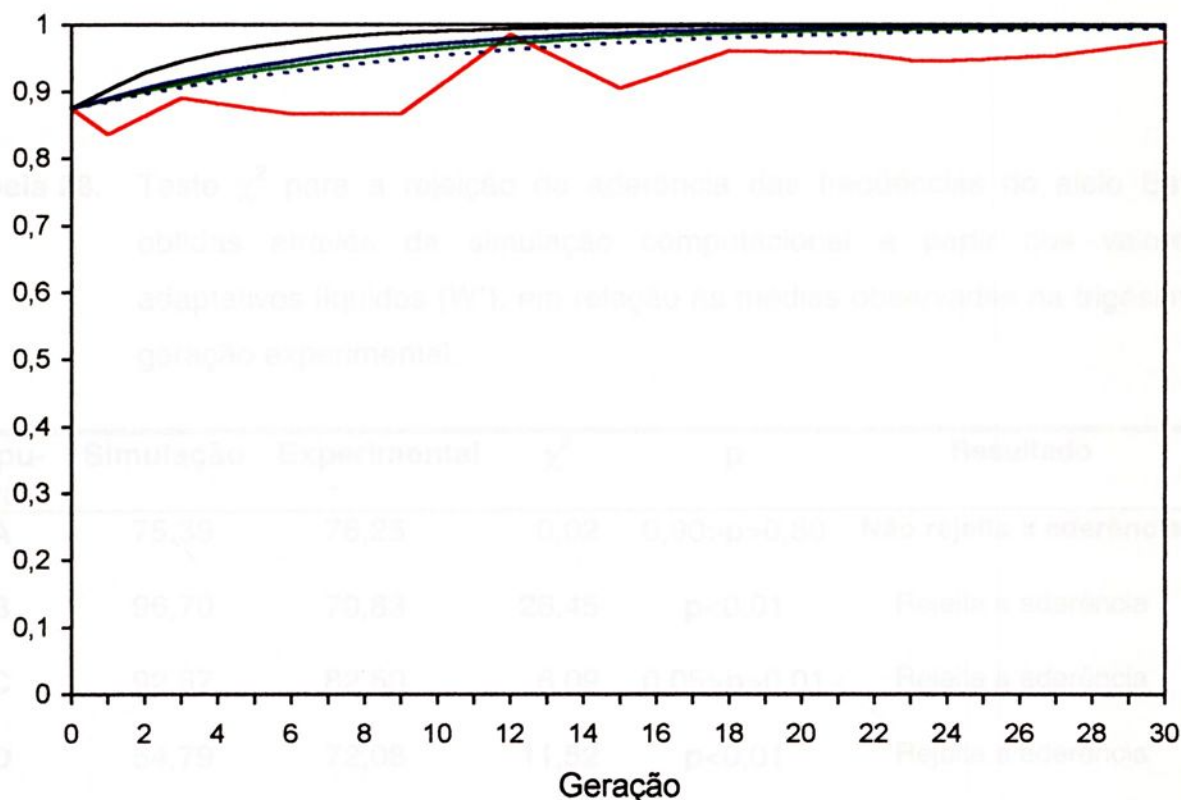


Figura 22. Variações (em proporção) nas frequências do alelo Est^S segundo os modelos de W (linha preta) e $W'e$ (linha verde) em comparação ao observado (linha vermelha) para a população E. As linhas azuis cheia e pontilhada representam, respectivamente, os modelos calculados segundo os valores adaptativos dos heterozigotos Est^S/Est^F e Est^F/Est^S .

Tabela 28. Teste χ^2 para a rejeição da aderência das frequências do alelo **Est^S** obtidas através da simulação computacional a partir dos valores adaptativos líquidos (**W'**), em relação às médias observadas na trigésima geração experimental.

Popu- lação	Simulação	Experimental	χ^2	p	Resultado
A	75,39	76,25	0,02	0,90>p>0,80	Não rejeita a aderência
B	96,70	70,83	26,45	p<0,01	Rejeita a aderência
C	92,57	82,50	6,09	0,05>p>0,01	Rejeita a aderência
D	54,79	72,08	11,52	p<0,01	Rejeita a aderência
E	99,99	97,50	3,13	0,10>p>0,05	Não rejeita a aderência

Tabela 29. Teste **G** (logaritmo da razão de verossimilhança) para a rejeição da aderência das frequências dos genótipos obtidas através da simulação computacional a partir dos valores adaptativos líquidos (W'), em relação às médias observadas na trigésima geração experimental.

População	Valor	Est^S/Est^S	Heterozigotos	Est^S/Est^S	G	p	Resultado
A	Simulado	56,84	37,10	6,05	3,03	0,20>p>0,10	Não rejeita a aderência
	Experimental	63,33	25,83	10,83			
B	Simulado	93,50	6,39	0,11	33,86	p<0,01	Rejeita a aderência
	Experimental	52,50	36,67	10,83			
C	Simulado	85,69	13,76	0,55	6,22	0,05>p>0,01	Rejeita a aderência
	Experimental	70,83	23,33	5,83			
D	Simulado	30,02	49,54	20,44	10,59	p<0,01	Rejeita a aderência
	Experimental	55,00	34,17	10,83			
E	Simulado	99,98	0,02	0,00	3,98	0,20>p>0,10	Não rejeita a aderência
	Experimental	95,00	5,00	0,00			

Tabela 31. Teste G (logaritmo da razão de verossimilhança) para a rejeição da aderência das frequências dos genótipos obtidas através da simulação

Tabela 30. Teste χ^2 para a rejeição da aderência das frequências do alelo **Est^S** obtidas através da simulação computacional a partir dos valores adaptativos estimados (**W'e**), calculados segundo a média dos heterozigotos ou de seus valores, em relação às médias observadas na trigésima geração experimental.

População	W'e do heterozigoto	Simulado	Experimental	χ^2	p	Resultado
A	Média	96,72	76,25	19,92	p<0,01	Rejeita a aderência
	Est^F/Est^S	94,58	76,25	15,39	p<0,01	Rejeita a aderência
	Est^S/Est^F	98,15	76,25	21,84	0,05>p>0,01	Rejeita a aderência
B	Média	71,07	70,83	0,02	0,90>p>0,80	Não rejeita a aderência
	Est^F/Est^S	74,34	70,83	0,56	0,90>p>0,80	Não rejeita a aderência
	Est^S/Est^F	63,01	70,83	2,22	0,20>p>0,10	Não rejeita a aderência
C	Média	99,38	82,50	16,57	p<0,01	Rejeita a aderência
	Est^F/Est^S	98,68	82,50	15,26	p<0,01	Rejeita a aderência
	Est^S/Est^F	99,72	82,50	17,23	p<0,01	Rejeita a aderência
D	Média	26,48	72,08	81,67	p<0,01	Rejeita a aderência
	Est^F/Est^S	41,36	72,08	36,85	p<0,01	Rejeita a aderência
	Est^S/Est^F	13,26	72,08	136,26	p<0,01	Rejeita a aderência
E	Média	99,77	97,50	2,70	0,20>p>0,10	Não rejeita a aderência
	Est^F/Est^S	99,49	97,50	2,20	0,20>p>0,10	Não rejeita a aderência
	Est^S/Est^F	99,90	97,50	2,95	0,10>p>0,05	Não rejeita a aderência

Tabela 31. Teste **G** (logaritmo da razão de verossimilhança) para a rejeição da aderência das frequências dos genótipos obtidas através da simulação computacional a partir dos valores adaptativos estimados ($W'e$), calculados segundo a média dos heterozigotos ou de seus valores, em relação às médias observadas na trigésima geração experimental.

População	$W'e$ do heterozigoto	Valor	Est^S/Est	Heterozigotos	Est^F/Est^F	G	p	Resultado
A		Experimental	63,33	25,83	10,83			
	Média	Simulado	93,54	6,35	0,11	21,63	$p < 0,01$	Rejeição
	Est^F/Est^S	Simulado	89,46	10,25	0,29	24,56	$p < 0,01$	Rejeição
	Est^S/Est^F	Simulado	96,34	3,63	0,03	26,50	$p < 0,01$	Rejeição
B		Experimental	52,50	36,67	10,83			
	Média	Simulado	50,51	41,12	8,37	0,48	$0,90 > p > 0,80$	Não rejeição
	Est^F/Est^S	Simulado	39,70	46,61	13,69	2,63	$0,40 > p > 0,30$	Não rejeição
	Est^S/Est^F	Simulado	55,27	38,15	6,58	0,86	$0,90 > p > 0,80$	Não rejeição
C		Experimental	70,83	23,33	5,83			
	Média	Simulado	98,75	1,24	0,00	23,32	$p < 0,01$	Rejeição
	Est^F/Est^S	Simulado	99,44	0,56	0,00	25,33	$p < 0,01$	Rejeição
	Est^S/Est^F	Simulado	97,38	2,60	0,02	20,10	$p < 0,01$	Rejeição
D		Experimental	55,00	34,17	10,83			
	Média	Simulado	7,01	38,94	54,05	62,06	$p < 0,01$	Rejeição
	Est^F/Est^S	Simulado	1,75	23,01	75,24	104,61	$p < 0,01$	Rejeição
	Est^S/Est^F	Simulado	17,10	48,51	34,39	29,42	$p < 0,01$	Rejeição
E		Experimental	95,00	5,00	0,00			
	Média	Simulado	99,55	0,45	0,00	2,86	$0,30 > p > 0,20$	Não rejeição
	Est^F/Est^S	Simulado	99,81	0,19	0,00	3,42	$0,20 > p > 0,10$	Não rejeição
	Est^S/Est^F	Simulado	98,99	1,01	0,00	1,98	$0,50 > p > 0,40$	Não rejeição

III.5. Análise das frequências gênicas e genotípicas nas populações em estoque

Com o objetivo de se verificar qual a frequência do alelo *Est*^S e dos três genótipos na população mantida em estoque após cerca de 50 gerações do início do experimento e mantidas a aproximadamente 300 gerações no laboratório, foi realizada a análise eletroforética de 78 indivíduos (36 machos e 42 fêmeas) da população.

Tabela 32. Frequências do alelo *Est*^S obtidas na trigésima geração nas cinco populações experimentais e nas simulações computacionais segundo os valores adaptativos *W'* e *W'e* (utilizando-se o valor adaptativo médio dos heterozigotos).

População	Experimental	Simulações	
		<i>W'</i>	<i>W'e</i>
A	76,25	75,39	96,72
B	70,83	96,70	71,07
C	82,50	92,57	99,38
D	72,08	54,79	26,48
E	97,50	99,99	99,77

III.5. Análise das freqüências gênicas e genóticas nas populações em estoque

Com o objetivo de se verificar qual a freqüência do alelo **Est^S** e dos três genótipos na população mantida em estoque após cerca de 50 gerações do início do experimento e mantidas a aproximadamente 300 gerações no laboratório, foi realizada a análise eletroforética de 78 indivíduos (36 machos e 42 fêmeas) da população, escolhidos aleatoriamente. Na Figura 23 é apresentada uma imagem digitalizada de um gel da análise de 39 moscas. Verificou-se a presença de 22 indivíduos **Est^S/Est^S** (56,41%), 14 heterozigotos (35,90%) e 3 **Est^F/Est^F** (7,69%). A partir destas freqüências genóticas, foram calculadas as freqüências alélicas de 74,36% e de 25,64%, respectivamente para os alelos **Est^S** e **Est^F**. Considerando-se todos os indivíduos amostrados foram obtidas as seguintes freqüências genóticas: 62,83% **Est^S/Est^S**; 28,20% heterozigotos; 8,97% **Est^F/Est^F**. Em relação às freqüências alélicas, foram observados 76,92 % **Est^S** e 23,08% **Est^F**.

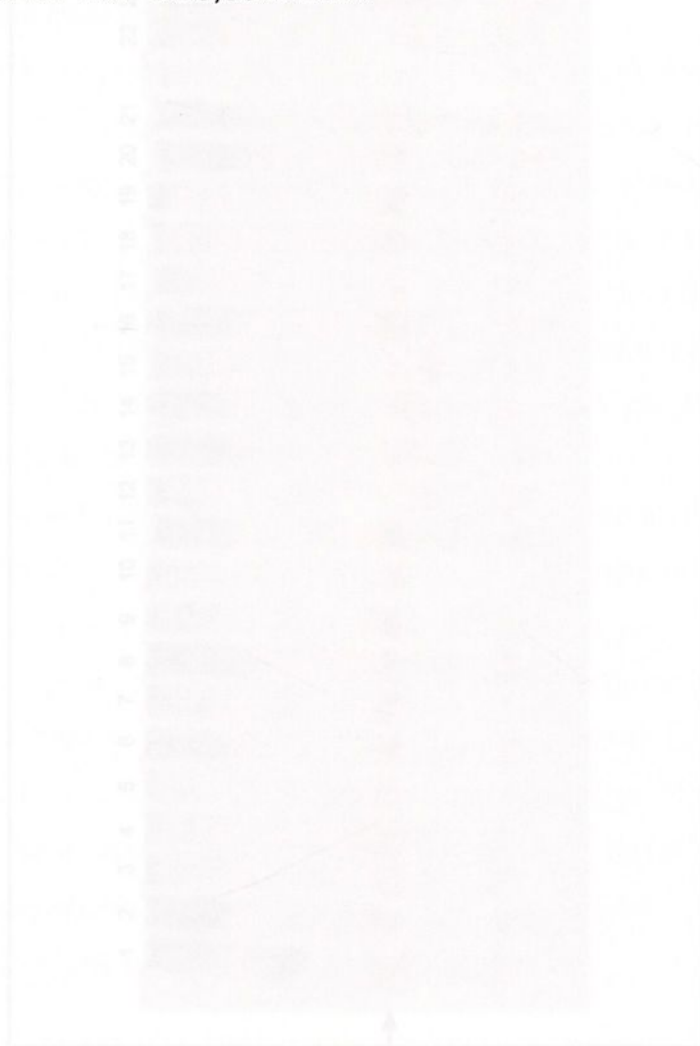


Figura 23. Imagem digitalizada de um gel ilustrativo do padrão de bandas de DNA (ex. coluna 11) e **Est^F/Est^F** (ex. coluna 12) e para os heterozigotos.

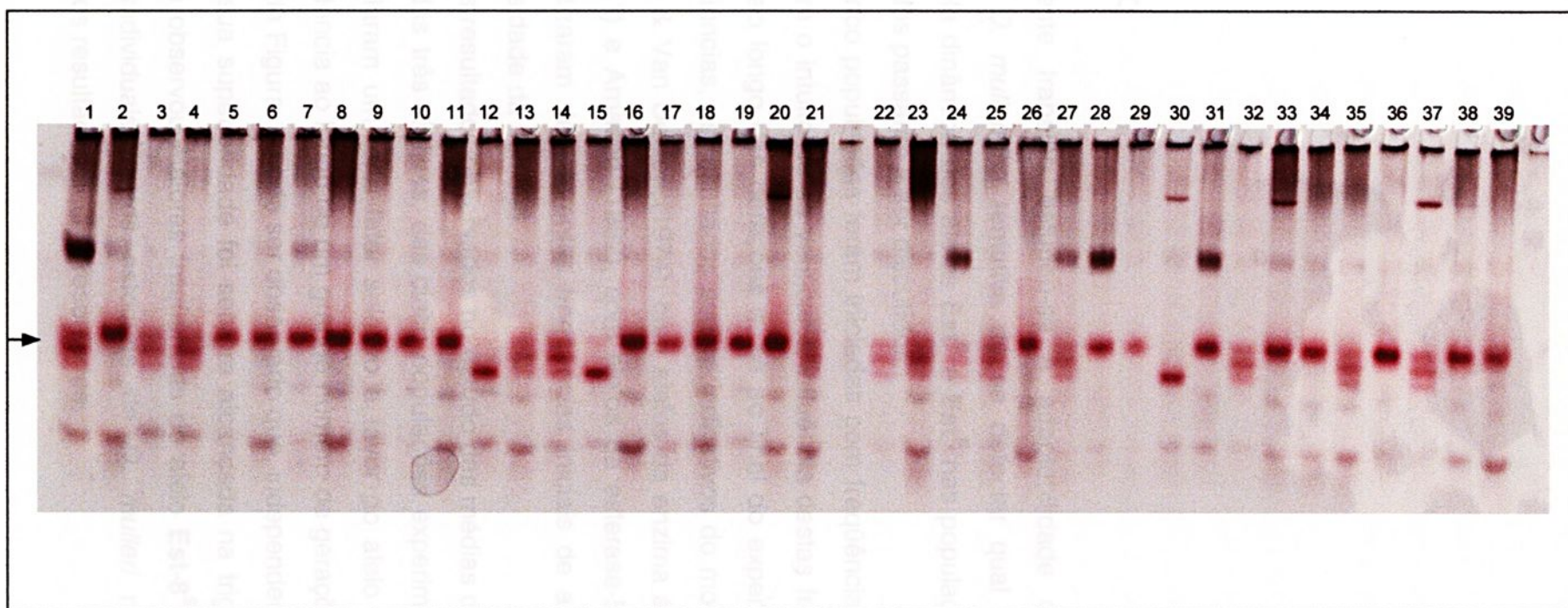


Figura 23. Imagem digitalizada de um gel ilustrativo do padrão de bandas obtido para os genótipos homozigotos Est^S/Est^S (eg. coluna 11) e Est^F/Est^F (eg. coluna 12) e, para os heterozigotos (eg. coluna 14) da esterase-8 (seta).

Em todas as populações, independente da frequência inicial do alelo Est^S , verificou-se um aumento gradual da frequência do homólogo Est^S/Est^S , até atingir a superioridade na trigésima geração. Este genótipo marcou sua ascendência na terceira geração da população A, na primeira da população B, na sexta da população C, na 12ª da população D e na sexta geração da população E. Por outro lado, para o genótipo Est^F/Est^F , observou-se, de maneira geral, o declínio em suas frequências, atingindo os menores valores na última geração, sendo mantida nas populações principalmente pela reprodução de heterozigotos.

As frequências gênicas e genotípicas observadas nas populações foram incompatíveis com a hipótese da neutralidade. Os proponentes da teoria neutralista (Kimura, 1983; Nei, 1983) consideraram que a variação alélica é neutra, ou

IV. DISCUSSÃO

Neste trabalho estudou-se a adaptabilidade de três genótipos da esterase-8 de *D. mulleri* na tentativa de se detectar qual o modelo de seleção responsável pela dinâmica dos alelos Est^S e Est^F nas populações experimentais. Os resultados obtidos passarão a ser discutidos.

Cinco populações foram iniciadas com frequências diferentes dos alelos Est^S e Est^F com o intuito de se verificar a influência destas frequências na dinâmica destes alelos, ao longo das gerações e, se ao final do experimento, segundo estas diferentes frequências, os resultados seriam indicativos do modo de seleção atuante. Bijlsma-Meeles & Van Delden (1974), com alelos da enzima álcool desidrogenase, e Yamazaki (1971) e Arnason (1982), com alelos da esterase-5, de *D. melanogaster*, também se utilizaram de diferentes frequências iniciais de alelos para identificar o modo e a intensidade da seleção.

Os resultados observados no estudo das médias das frequências gênicas e genotípicas das três réplicas, das cinco populações experimentais, ao longo de 30 gerações, revelaram um forte fator seletivo a favor do alelo Est^S , considerando-se como uma tendência ao longo de um grande número de gerações. Nas Tabelas 1 a 5, e nos gráficos da Figura 1, pode ser observado que, independente da frequência inicial deste alelo, a sua superioridade foi sempre alcançada na trigésima geração. Ceron (1988) também observou maiores frequências do alelo $Est-8^S$, próximas a 70%, em experimentos individuais e nos estoques de *D. mulleri* mantidos a 25°C, em concordância aos resultados aqui apresentados.

Em todas as populações, independente da frequência inicial do alelo **Est^S**, verificou-se um aumento gradual da frequência dos homozigotos **Est^S/Est^S**, até atingir a superioridade na trigésima geração. Este genótipo iniciou sua ascendência na terceira geração da população **A**, na primeira da população **B**, na sexta da população **C**, na 12^a da população **D** e na sexta geração da população **E**. Por outro lado, para o genótipo **Est^F/Est^F**, observou-se, de maneira geral, o declínio em suas frequências, atingindo os menores valores na última geração, sendo mantidos nas populações, principalmente pela reprodução de heterozigotos.

As frequências gênicas e genotípicas observadas nas populações foram incompatíveis com a hipótese da neutralidade. Os proponentes da teoria neutralista (Kimura, 1983; Nei, 1983) consideraram que a variação aloenzimática é neutra, ou quase neutra. Crow (1972) definiu alelos quase-neutros como aqueles que tenham coeficientes de seleção muito pequenos, próximos a zero. Por outro lado, alelos com mutações neutras são aqueles que se comportam indistinguívelmente da neutralidade em um determinado momento da história evolutiva da população. Wills (1981), baseando-se na idéia de que algumas características das populações sejam seletivamente neutras, argumentou que um alelo neutro - no sentido estrito do termo - deva existir apenas em teoria.

Uma das principais discordâncias entre os modelos neutralista e selecionista diz respeito à distribuição dos valores adaptativos dos alelos mutantes. Consideradas as limitações do método, a análise dos valores adaptativos (Tabelas 6 a 10), calculados a partir das frequências genotípicas de cada réplica, evidenciou a maior adaptabilidade dos homozigotos **Est^S/Est^S**. Na Tabela 11, que apresenta as médias destes valores adaptativos, utilizados para o cálculo do valor adaptativo líquido (**W'**), este genótipo apresentou-se superior em 13 das 15 comparações. As duas únicas exceções referem-se à réplica **a** da população **A** para a qual o valor adaptativo do homozigoto **Est^F/Est^F** (0,8500) foi apenas 0,1% superior ao do genótipo **Est^S/Est^S** (0,8490) e, à réplica **a** da população **C**, cujo valor adaptativo (0,6298) obtido para este genótipo foi inferior ao do genótipo heterozigoto (0,7504).

Uma possível explicação para as variações no valor adaptativo seria que estes valores foram calculados como a média dos valores obtidos, para as 10 gerações estudadas. Desta forma, além de estar sendo considerado um valor que representa a tendência central de 10 valores, pode ser observado na Tabela 1 a intensa redução ocorrida na frequência do genótipo **Est^S/Est^S** da primeira (34,09%) para a terceira geração (15,91%), o que ocasionou a redução na adaptabilidade deste

genótipo neste momento da réplica **a** da população **A** (0,0933, Tabela 6). Também pode ser observado que entre as gerações de número 6 e 9 ocorreram variações aberrantes na réplica **a** da população **C** (Tabela 3), ou seja, o decréscimo acentuado da frequência do genótipo **Est^S/Est^S** (de 52,28% para 20,00%) e um conseqüente acréscimo do genótipo heterozigoto (de 36,36% para 67,50%).

Provavelmente, em se tratando de uma amostra de indivíduos de uma população que deva ser considerada em seu todo, incluindo seus representantes nas fases mais iniciais do desenvolvimento, e não apenas quanto à sua parcela adulta, que era amostrada, este fato refletiria um fenômeno amostral aleatório ou um momento de deriva genética, que se tornou significativo justamente pelo fato de serem 10 as gerações analisadas, das 30 observadas. Em conseqüência, a frequência do alelo **Est^S** também foi reduzida drasticamente neste momento (53,75%). Entretanto, na mesma Tabela 1, observa-se que a tendência de aumento na frequência do genótipo **Est^S/Est^S** na réplica **a** foi restabelecida após este período de perturbação.

Reduções no tamanho populacional podem levar a variações significativas nas frequências gênicas por deriva genética, independente da adaptabilidade de genótipos particulares e das de frequências gênicas iniciais.

Segundo Falconer (1981), as mudanças das frequências gênicas resultantes de seleção são mais complexas do que aquelas resultantes de mutação, porque as diferenças de valores adaptativos que originam a seleção são um aspecto do fenótipo. Assim, têm que ser consideradas as relações de dominância mostradas pelos alelos em questão. Neste sentido, dominância com respeito ao valor adaptativo não é necessariamente o mesmo que dominância com respeito a qualquer efeito visível do gene.

Da análise da Tabela 11 pode-se identificar relações de dominância para os valores adaptativos líquidos em cada uma das populações. Nas populações **B**, **D** e **E**, o genótipo **Est^S/Est^S** apresentou maior valor adaptativo líquido, seguido pelo genótipo heterozigoto, o que caracteriza dominância parcial para o valor adaptativo. Esta relação é a esperada a partir dos resultados observados, isto é, maior frequência do alelo **Est^S** ao final das 30 gerações. Entretanto, outros tipos de relações também foram observados: os valores da população **C** sugerem sobredominância para o valor adaptativo, enquanto que na população **A**, a subdominância. Estes resultados discrepantes deveram-se, no caso da população **C**, apenas aos valores adaptativos médios da réplica **a**, pois nas réplicas **b** e **c** mantiveram-se as relações de dominância observadas nas demais populações. Além do mais, a diferença em relação ao valor

adaptativo líquido do homozigoto **Est^S/Est^S** (0,9960), e do heterozigoto (1,0000), foi apenas da ordem de 0,4%, que pode ter refletido simplesmente uma diferença numérica não biologicamente significativa.

No caso da população **A**, a inferioridade do heterozigoto pode estar refletindo um fenômeno real, pois, como será discutido adiante, o genótipo **Est^S/Est^F** mostrou-se inferior aos demais (Tabelas 19, 22 e 25) para diversos componentes do valor adaptativo e para o valor adaptativo total (**W'e**). Além disso, simulando computacionalmente (POPULUS, Figura 16) a dinâmica do alelo **Est^S**, com o valor adaptativo líquido desta população (Tabela 11), demonstrou-se a ocorrência do equilíbrio instável em relação ao alelo **Est^S**.

A análise de dependência, realizada para a verificação de quais genótipos estariam associados às gerações amostradas (Figuras 4 a 8), mostrou a forte influência do tempo na explicação da inércia total, sempre como um forte fator de dependência. Isto significa que para o genótipo **Est^S/Est^S**, por exemplo, foi observada uma forte associação com as gerações a partir da 15^a, indicando que de modo independente da frequência inicial, este genótipo está diretamente relacionado às últimas gerações. Este fato, interpretado em associação às frequências genotípicas, sugere que a ANADEP detectou o ponto em que este genótipo passou a exercer a maior influência numérica no sistema, determinando decisivamente a direção das curvas de frequência com chances pequenas de mudança, se as forças que criaram todas as associações entre genótipos e gerações permanecerem as mesmas. De maneira mais direta, a partir desta geração, o modo de seleção já definiu a superioridade numérica do alelo **Est^S**. Apesar das situações discrepantes acima discutidas, as variações nas frequências revelaram um forte fator seletivo favorecendo o alelo **Est^S**, como esperado segundo um modelo de seleção direcional.

De acordo com Futuyma (1992), a observação de variabilidade genética nas populações poderia ser o resultado da verificação experimental de um estado polimórfico transitório, pois a seleção estaria dirigindo um dos alelos para a fixação. De acordo com o momento amostral e dependendo dos valores adaptativos, haveria a interpretação de um polimorfismo balanceado. Como muitas vezes não se tem idéia dos valores adaptativos e, nem mesmo, de qual o número exato de genótipos nas populações, a análise do modo de seleção atuante é muito difícil de ser executada. No presente trabalho, apesar de ter sido amostrado um número razoável de gerações, não se pode afirmar que o momento da história evolutiva das populações seja



demonstrativo de seleção direcional sem a proposição de modelos que possam ser testados quanto à aderência ao observado experimentalmente.

Alguns estudos sobre frequências genotípicas foram feitos a partir de simulações com a utilização de modelos, geralmente computacionais. Estes modelos têm algumas vantagens em relação aos experimentos, ou seja, possibilidade de simular um grande número de gerações e de indivíduos, alteração na magnitude de algumas variáveis, repetibilidade, etc. Por outro lado, algumas desvantagens como a artificialidade dos processos às vezes torna complexa a interpretação dos resultados. Por exemplo, Nagylaki (1989) estudou a manutenção da variabilidade genética em dois locos dialélicos, sob seleção estabilizadora, segundo um modelo que previa gerações discretas e que não se sobrepunham no tempo, além de cruzamentos aleatórios, ausência de mutação e de deriva genética, e seleção atuando apenas sobre diferenças na viabilidade. Além disso, a proposição dos valores adaptativos foi feita aditivamente e o desequilíbrio de ligação entre os dois locos foi descartado. Este autor observou que a presença de diferentes graus do polimorfismo poderia ser explicada por variações na pressão de seleção sobre cada um dos dois locos. Os polimorfismos estáveis de vários locos podem ocorrer em modelos teóricos, até mesmo com contribuições iguais dos alelos, se for proposta a existência de dominância parcial (Lewontin, 1964; Singh & Lewontin, 1966), epistasia ou efeitos pleiotrópicos (Gimelfarb, 1986). A combinação de seleção estabilizadora e sobredominância na viabilidade podem também manter a variação genética (Bulmer, 1973; Gillespie, 1984).

Com o intuito de descrever os dados experimentais, foi proposto um modelo teórico que se baseia nas Cadeias de Markov, que em resumo, prevê uma certa probabilidade para um evento estocástico mudar de um estado A para B; uma outra probabilidade para que permaneça no estado A; uma probabilidade de mudar do estado B para A; e, assim por diante, se forem considerados diversos estados. No presente trabalho, foram assumidos como estados as frequências gênicas dos alelos Est^S e Est^F e as frequências dos três genótipos, distribuídas em classes de frequência de 10% e de 20%. A partir dos valores das frequências obtidos, nas cinco populações, foram compostas matrizes de transição inicial que indicavam quantas vezes um valor observado numa classe de frequência permaneceu na mesma classe ou mudou para uma classe maior ou menor. Considerando que cada vez que esta matriz de transição inicial fosse elevada a uma próxima potência, as forças que interagiram para compor a distribuição inicial seriam simuladas, pode-se supor que estas forças sejam aquelas

que determinaram a história evolutiva observada, ou seja, pressão de seleção segundo as diferenças nos valores adaptativos.

Foram simuladas várias gerações para cada população (Tabela 12) na tentativa de se estabelecer o número de gerações necessárias para que as freqüências do alelo **Est^S** e dos três genótipos apresentassem variações muito pequenas entre duas gerações, que pudesse ser interpretado como uma aparente estabilidade em um certo valor. As simulações mostraram que, a partir da 87^a geração, as alterações seriam muito pequenas, da ordem de 1%. Assim, considerando-se os intervalos de 20%, a freqüência ponderada esperada para o alelo **Est^S** seria de 76,30% a partir desta geração. Outra forma de interpretação é, segundo o diagrama da matriz de estabilidade para este alelo, que a probabilidade da freqüência do alelo **Est^S** estar na classe 0-20% seria igual a zero; na classe 20-40% seria igual a 2%; na classe 40-60% seria igual a 15%; na classe 60-80% seria igual a 37%; e, na classe 80-100% seria igual a 47%.

Então, segundo este modelo, após a 87^a geração, as alterações na freqüência deste alelo seriam tão pequenas, que se fossem representadas graficamente, mostrariam uma ascendência muito leve em direção a 100%. De modo semelhante, pode ser analisado o modelo a partir de intervalos de 10%, com freqüência estável em torno de 81,25% após a 132^a geração.

As variações de freqüências do alelo **Est^S**, inferiores a 1%, a partir destas gerações, poderia sugerir a ocorrência de um polimorfismo estável. Entretanto, a adaptabilidade diferencial dos genótipos apontam para sua posterior fixação. Segundo Futuyma (1992), quando um alelo deletério torna-se raro, no caso **Est^F**, o valor de Δq torna-se muito pequeno, de modo que a eliminação se processa vagarosamente; uma vez que os alelos recessivos ocorrem preferencialmente em condição heterozigótica, sendo mascarados pelos dominantes vantajosos e raramente eliminados como um todo pela seleção.

Com o intuito de verificar se as réplicas das populações experimentais seriam concordantes do ponto de vista do processo atuante, ou seja, se as freqüências do alelo **Est^S** ao longo das 30 gerações tiveram dispersões semelhantes, foi realizada a Análise de Tendência Linear de Séries Temporais para as freqüências deste alelo (Figuras 9 a 13), mostrando que, de maneira geral, a seleção atuou segundo um mesmo padrão em todas elas, o que corrobora a proposição de que este alelo esteja relacionado com maior adaptabilidade.

independente Li & Graur (1991) destacaram que a seleção natural tem sido considerada a principal força direcionadora das mudanças em traços morfológicos, enquanto que a deriva genética, relaciona-se a modelos de evolução no nível molecular. Estes autores acrescentaram ainda que, para o estudo das alterações genéticas nas populações, existem duas abordagens matemáticas: a primeira, chamada de “modelo determinístico”, assume que as alterações nas frequências gênicas ocorrem de uma maneira única e uniforme a partir de condições iniciais e, possui como premissas que as populações são infinitas e que o ambiente permanece constante ao longo das gerações ou, no mínimo, que as alterações ambientais ocorrem segundo regras determinísticas. Estas condições obviamente não são encontradas na natureza, o que faz dos estudos puramente determinísticos não suficientemente capazes de explicar as alterações nas frequências alélicas das populações sem a utilização de conceitos acerca de aleatoriedade e de flutuações imprevisíveis.

os indivíduos A segunda abordagem matemática das alterações temporais nas populações, chamada de “modelo estocástico”, estabelece que as alterações nas frequências alélicas ocorrem de maneira probabilística que, em resumo, não pode prever com certeza quais as frequências em uma próxima geração, mas sim, somente determinar com quais probabilidades estas frequências podem sofrer alterações. Vários autores (Nei *et al.*, 1978; Kimura, 1983; Nei & Graur, 1984, entre outros) têm preferido os modelos estocásticos segundo a alegação de que eles são baseados em situações mais realistas. Todavia, modelos determinísticos são mais fáceis de serem tratados matematicamente e fornecem geralmente boas aproximações da história evolutiva de polimorfismos.

adaptativo Aplicando-se a teoria das Cadeias de Markov aos valores percentuais das frequências alélicas e genotípicas no presente trabalho, poder-se-ia supor que o modelo estocástico tivesse sido utilizado para a verificação de um processo seletivo. Todavia, quando se considerou que esta probabilidade de mudança entre as classes refletiria o fator determinante das variações ao longo do tempo, poder-se-ia associar o modelo determinístico como o modelo utilizado. Durante o planejamento e a execução dos experimentos projetou-se, ao final, fornecer subsídios para a proposição de uma metodologia que pudesse acrescentar aos estudos evolutivos uma nova abordagem matemática para a verificação de frequências gênicas e genotípicas após o término dos experimentos. Apesar do estudo ter tido um embasamento no modelo determinístico, a utilização das Cadeias de Markov mostraram-se uma ferramenta adequada para sintetizar toda a história evolutiva relacionada à dinâmica destes alelos,

independente das frequências iniciais em cada população. As simulações a partir das Cadeias de Markov, que possuem princípios plenamente estocásticos, em conjunto com os aspectos teóricos bem difundidos do modelo determinístico, mostraram-se adequadas para a descrição *a posteriori* da dinâmica populacional.

A estimativa do valor adaptativo líquido (W'), a partir de populações experimentais, pode estar sujeita a dificuldades metodológicas, como por exemplo, a heterogeneidade do material genético a ser testado. Se um alelo originou-se de duas populações diferentes com altos níveis de endocruzamento, os genes que afetam o W' e que estão intimamente ligados aos alelos, podem diferir segundo a origem. Se cada um dos alelos for ligado a genes deletérios, os heterozigotos do loco em estudo podem mostrar uma superdominância espúria, pelo fato dos homozigotos para o loco também serem homozigotos para os genes deletérios (Li & Graur, 1991).

Neste estudo, tomou-se o cuidado de minimizar este problema pois todos os indivíduos utilizados para o início dos experimentos, tanto para os cruzamentos individuais, como para as populações, foram retirados de uma única população, mantida em laboratório por, no mínimo, 20 anos (aproximadamente 365 gerações desde 1976), que originaram as populações homozigotas para os dois alelos estudados por Ceron em 1988 (aproximadamente 182 gerações). Espera-se que, devido ao longo período de manutenção, que possíveis desequilíbrios de ligação entre o loco da esterase-8 e de genes intimamente ligados, principalmente aqueles com fortes influências sobre o valor adaptativo, tenham sido equilibrados, como proposto por Wills (1981).

Segundo Falconer (1981), o caráter sobre o qual a seleção atua é o valor adaptativo. O valor adaptativo de um indivíduo de determinado genótipo é o resultado final de todos os seus processos fisiológicos e do desenvolvimento, que podem ser denominados de componentes do valor adaptativo.

Fragmentando-se o valor adaptativo em alguns componentes mensuráveis do ciclo biológico, procurou-se verificar a existência de diferenças significativas entre as médias dos genótipos, na tentativa de propor quais deles poderiam estar relacionados ao modelo de seleção proposto, ou seja, aquele que provê a superioridade numérica obtida para o alelo **Est^S**. A longevidade foi estudada e considerada como um componente diretamente associado ao valor adaptativo, pois indivíduos mais longevos devem ter maior probabilidade de deixarem mais descendentes, em comparação aos menos longevos. Além disso, duas situações

foram analisadas: moscas virgens, ou seja, mantidas sem atividade sexual; e, moscas mantidas juntas, com possibilidade de manterem atividade sexual (Tabelas 14 a 16).

Vários autores indicaram que os componentes do valor adaptativo relativos à fase de seleção sexual (Hedrick & Murray, 1983), como por exemplo, os tempos de cópula e de pré-cópula e a frequência de acasalamentos, são muito importantes para a composição do valor adaptativo total, pois deles dependem a que taxas e velocidades os patrimônios genéticos dos pais serão transferidos para a próxima geração (Prout, 1971a,b; Barnes & Merrel, 1985; Carareto & Mourão, 1992).

A observação de que os indivíduos acasalados do genótipo **Est^S/Est^S** foram significativamente mais longevos que os demais, pode sugerir que este genótipo seria beneficiado, pois seus indivíduos poderiam ainda permanecer na população ao mesmo tempo que as próximas duas gerações, no mínimo. Em consequência, por se tratar de uma espécie que tem a necessidade de amadurecimento sexual de cerca de sete dias, estes machos, já sexualmente amadurecidos, teriam maiores chances de acasalamento com as fêmeas das gerações seguintes. Por outro lado, os machos do genótipo **Est^F/Est^F** que mostraram as menores longevidades, segundo esta linha de raciocínio, teriam as menores chances, embora ainda existissem sobreposições de gerações.

De maneira geral, a teoria da seleção natural estabelece que a capacidade diferencial de contribuir para as futuras gerações, em termos de progênie, constitui a base da evolução adaptativa (Hedrick & Murray, 1983). De acordo com o Paradigma Sintético da Evolução, a seleção natural pode ser entendida como o grau de eficiência com que os diferentes genótipos que coexistem na população se reproduzem (Dobzhansky, 1973); é considerada, portanto, como um processo que possibilita o aumento da frequência de indivíduos melhor adaptados em relação aos demais, ao longo de sucessivas gerações.

Os resultados obtidos para o estudo da produtividade (Tabelas 17 a 19) sugerem uma outra razão para as frequências aumentadas do alelo **Est^S** nas populações. Os cruzamentos envolvendo as fêmeas **Est^S/Est^S** produziram cerca de duas vezes mais descendentes principalmente em comparação com aqueles que envolveram as fêmeas **Est^F/Est^F**. Este fato, associado à maior longevidade dos indivíduos **Est^S/Est^S** classificariam este genótipo como possuidor de maior adaptabilidade.

Carareto & Mourão (1992), avaliando a importância relativa de componentes do valor adaptativo mostraram que, para *D. sturtevantii*, a produtividade é



um dos mais importantes componentes para a composição do valor adaptativo total de um certo genótipo. No presente trabalho, foram observadas diferenças altamente significantes neste componente em relação aos quatro genótipos estudados. Esta capacidade pode ser considerada ainda do ponto de vista da sobrevivência nas fases iniciais do desenvolvimento, na forma de componentes da viabilidade (Tabelas 20 e 21). O genótipo **Est^S/Est^S** apresentou as maiores médias em dois componentes da viabilidade (ovo-larva e ovo-imago) e valor igual ao de **Est^F/Est^S** para a viabilidade ovo-pupa. Apenas para a viabilidade pupa-imago (97,11%) este genótipo foi inferior, pois o heterozigoto **Est^F/Est^S** apresentou um valor levemente superior (97,52%). É importante ressaltar que este genótipo heterozigoto, que se caracteriza pela origem materna do alelo **Est^S**, tem se mostrado também muito eficiente nos componentes do valor adaptativo analisados, como a produtividade de imagos, as viabilidades e os tempos de desenvolvimento. Se forem também analisadas à luz da adaptabilidade genotípica, como maiores taxas de sobrevivência e reprodução dos genótipos, a maior viabilidade observada para o homozigoto **Est^S/Est^S** aumentaria, embora em escala menor que a produtividade, a freqüência do alelo **Est^S** nas populações.

Kojima & Yarborough (1967) e Kojima & Tobar (1969) estudaram populações experimentais de *D. melanogaster* e relataram, pelo menos para dois locos enzimáticos (esterase-6 e álcool desidrogenase), a diminuição da viabilidade de um genótipo com o aumento de sua freqüência, o que está de acordo com o modelo de seleção dependente da freqüência. Neste trabalho o genótipo **Est^S/Est^S** apresentou a maior viabilidade em todas as fases estudadas, em cruzamentos individuais. Não foram realizados experimentos para testar a atuação de seleção dependente da freqüência, pois não foram encontradas evidências de estar o loco da esterase-8 sob este modelo seletivo, já que o genótipo **Est^S/Est^S**, após algumas gerações, tornou-se o mais freqüente em todas as populações, independentemente das freqüências iniciais serem altas, medianas ou baixas (Figura 1).

Bijlsma-Meeles & Bijlsma (1988) estimaram para *D. melanogaster* a adaptabilidade relativa de diferentes genótipos dos alelos **Adh^S** e **Adh^F** sob condições normais de laboratório e na ausência de pressão seletiva provocada por conteúdos de álcool no meio de cultura. Seus resultados revelaram que para a viabilidade, representante dos componentes do valor adaptativo da fase larval, não foram observadas diferenças significantes entre os genótipos. Além disso, para o estudo da fertilidade de machos, o homozigoto **Adh^S/Adh^S** mostrou valores estatisticamente menores, o que sugeriria a presença de dominância adaptativa do alelo **Adh^F**.

Entretanto, para a fecundidade de fêmeas, foram observadas diferenças significativas sugestivas de sobredominância, ou seja, ambos os homozigotos apresentaram valor adaptativo inferior ao do heterozigoto, o que levaria à manutenção do polimorfismo.

Ainda em relação aos componentes do valor adaptativo, procurou-se por diferenças entre as médias dos genótipos em relação aos tempos de desenvolvimento (Tabelas 22 e 23), considerando-se a premissa de que quanto mais rápido fosse o desenvolvimento do indivíduo, mais cedo ele estaria apto a acasalar-se e a contribuir com seu genótipo para a próxima geração. Neste caso, novamente pode ser proposta a maior eficiência do genótipo **Est^S/Est^S** em relação aos demais, principalmente imposta pelos menores tempos de desenvolvimento ovo-pupa, o que proporcionaria um menor tempo de exposição aos catabólitos tóxicos acumulados no meio de cultura pelas larvas que ali se alimentam e excretam (Moya & Botella, 1985). Esta intoxicação poderia, como um reflexo, reduzir a viabilidade dos indivíduos e, até mesmo, sua produtividade e longevidade. Similarmente aos outros componentes estudados, pode ser observada também certa eficiência do genótipo heterozigoto **Est^F/Est^S**, para o qual foram obtidos valores muito próximos ao referido genótipo homozigoto.

Budnik & Brncic (1975) mostraram que resíduos do metabolismo de larvas podem afetar a viabilidade nesta fase do desenvolvimento. Tal mecanismo, segundo os autores, pode ser considerado como regulador do tamanho da progênie, visto que estes metabólitos podem apresentar alta toxicidade. Desta forma, considerando-se que os metabólitos relacionam-se justamente à fisiologia da digestão e as esterases têm papel importante neste aspecto (Jones & Brancoft, 1986; Argentine & James, 1995), poder-se-ia supor duas possíveis explicações para os indivíduos portadores do alelo **Est^S** em homozigose apresentarem maior produtividade: maior habilidade na metabolização destes agentes tóxicos ou menor produção de produtos tóxicos excretados no meio. Esta suposição, entretanto, permanece para ser testada.

Yamazaki & Hirose (1984) propuseram que genes relacionados com o valor adaptativo total não afetariam igualmente cada componente. Por exemplo, genes que trariam benefícios à viabilidade poderiam ser detrimentais à fertilidade, como foi mostrado nos estudos dos efeitos mutacionais pleiotrópicos sobre a viabilidade (Simmons *et al.*, 1980). A hipótese do pleiotropismo antagônico ou variável foi baseada nas correlações negativas entre os efeitos genéticos sobre os componentes da história da vida. Para Rose (1983), de maneira geral, os componentes exibiriam ação pleiotrópica antagônica, ou seja, aumentando a contribuição de um componente e diminuindo a de outro.



Apesar de não terem sido empregados métodos para se quantificar a contribuição relativa de cada componente para o valor adaptativo total, como por exemplo os empregados por Carareto & Mourão (1992), à luz dos resultados obtidos em cada componente analisado, fica clara a ausência de correlação negativa entre eles, ou seja, não se detectou pleiotropismo antagônico no presente trabalho, pois a magnitude dos valores de cada componente, para cada genótipo, foram geralmente concordantes. Esta ausência de pleiotropismo antagônico encontra embasamento na “hipótese unitária” (Geisel, 1979; Geisel & Zettler, 1980), que em resumo, assume que “a reprodução e a sobrevivência são características geralmente inseparáveis”, ou seja, “todos os caracteres da história da vida devem ser vistos como componentes do valor adaptativo positivamente correlacionados, evoluindo como o valor adaptativo evolui”. Segundo estes autores, genes que favoreceriam componentes relativos à reprodução ou à sobrevivência, deveriam também favorecer todos os demais. Considerando que uma afirmação extrema dessa natureza não deva ser tomada no seu sentido estrito, poder-se-ia explicar a vantagem adaptativa do alelo **Est^S**, observada na maioria dos componentes estudados, como uma associação entre o loco em questão e os componentes selecionados para o estudo.

Não foram encontrados na literatura muitos relatos acerca de comparações de componentes do valor adaptativo de linhagens esterásicas para serem contrapostos com os obtidos do presente trabalho. Entretanto, Saad *et al.* (1994) estudaram a associação de alelos da esterase-6 com componentes do valor adaptativo de *D. melanogaster*, respectivamente nas fases reprodutivas e pré-adulta. Esta esterase, que é principalmente produzida no ducto ejaculatório de machos, parece desempenhar um importante papel na biologia reprodutiva, segundo estes autores. No primeiro estudo, foram comparadas 11 linhagens **Est-6^S**, e cinco **Est-6^F**, segundo cinco componentes: período de pré-cópula, tempo de cópula, freqüências de acasalamento, produtividade de ovos e fertilidade. Não foram encontradas diferenças significantes entre os componentes nas comparações entre os alelos.

Em outro trabalho, o mesmo grupo utilizou componentes do valor adaptativo em linhagens da esterase-6 de *D. melanogaster* (Oakeshott *et al.*, 1994). Todavia, o estudo baseou-se na análise dos níveis de atividade protéica com reflexos no tempo de desenvolvimento e na viabilidade ovo-adulto em linhagens determinadas por haplótipos e não por padrão de migração eletroforética das enzimas. Apesar de tratar-se de uma abordagem muito diferente do presente trabalho, onde não foram estudadas as atividades das isoenzimas **EST-8^S** e **EST-8^F**, podem ser feitas algumas



considerações, por analogia. Por exemplo, estes autores verificaram que os níveis de atividade enzimática estavam diretamente associados à viabilidade e, de maneira inversa, ao tempo de desenvolvimento. A partir deste princípio, se o alelo **Est^S** proporcionar uma proteína mais ativa, em termos catalíticos, poderia explicar as maiores viabilidades e os menores tempos de desenvolvimento obtidos para os genótipos **Est^S/Est^S**.

Yamazaki (1971) realizou experimentos com linhagens da esterase-5 de *D. pseudoobscura*. A partir dos resultados obtidos ao longo de várias gerações, nas populações iniciadas com diferentes freqüências do alelo *Est-5*^{1,12}, o autor propôs que este alelo não estaria sofrendo efeito seletivo, ou no máximo, estaria sob seleção fraca, visto que as variações nas freqüências foram inferiores a 5%, ao longo do tempo. Contrariamente, Arnason (1982), estudando populações grandes e pequenas desta espécie, iniciadas com freqüências de 50% deste mesmo alelo, observou uma redução significativa, atingindo um valor de equilíbrio em torno de 40%, após 400 dias de experimento. Este comportamento foi considerado pelo autor como incompatível pelas predições da teoria da neutralidade e que algum tipo de seleção balanceado estava implicado no processo. Entretanto, nas populações pequenas não foram observadas tais alterações. Pode-se supor que discordâncias desta natureza sejam devidas a dificuldades experimentais relacionadas com o tamanho das populações, número de réplicas, erros amostrais, etc. Entretanto, Yamazaki (*op. cit.*) também estudou a viabilidade e a fertilidade dos diferentes genótipos, não obtendo contudo diferenças significativas, principalmente devido aos grandes erros padrões obtidos para as médias, o que corroboraria a não observação de seleção.

No presente trabalho, a composição de índices representativos do valor adaptativo total (**W'e**), a partir dos valores médios dos componentes, como proposto por Carareto & Mourão (1992), revelou de forma clara o que havia sido observado particularmente para cada componente estudado, isto é, a maior adaptabilidade relativa do genótipo **Est^S/Est^S** (1,000), seguido do híbrido **Est^F/Est^S** (0,892), que possui o alelo **Est^S** de origem materna, do homozigoto **Est^F/Est^F** (0,863) e, do híbrido **Est^S/Est^F** (0,842), com o alelo **Est^F** de origem paterna. Estes resultados vão ao encontro daqueles obtidos experimentalmente para as populações, ou seja, a maior adaptabilidade dos homozigotos **Est^S/Est^S** é compatível com o aumento nas freqüências gênicas ao longo das 30 gerações.

Anderson & Oakeshott (1984) e Oakeshott *et al.* (1988), apresentaram evidências da natureza adaptativa da esterase-6 em populações naturais de *D.*



melanogaster, pois as frequências dos alelos *Est-6^S* e *Est-6^F* mostraram padrões não-aleatórios em relação à latitude e à sazonalidade nos trabalhos realizados na Austrália, na América do Norte e na Europa. Estas variações constituem evidência de que estes alelos não são neutros. Todavia, Jiang *et al.* (1989) encontrou resultados diferentes em algumas populações chinesas. Este fato pode ser sugestivo da existência de mais de um alelo sob a denominação "slow" ou "fast", promovendo diferentes adaptabilidades. Eletromorfo é um termo utilizado para designar uma família de variantes enzimáticas que não possuam diferenças quanto à mobilidade eletroforética. Como estas variantes não são passíveis de separação através de técnicas convencionais, a sua ocorrência em populações pode levar a uma subestimativa da variabilidade genética existente, pois sua diferenciação eletroforética não é possível.

Em populações experimentais, contudo, não foram encontradas diferenças significativas em componentes da atividade sexual e da produtividade entre genótipos destes dois alelos (Miekle & Richmond, 1990). Atualmente é sabido que o polimorfismo *EST-6^S* e *EST-6^F*, com suas diferenças adaptativas, é apenas um entre vários possíveis para o loco *Est-6*. O seqüenciamento da região codificadora do cromossomo III, realizado por Cooke & Oakeshott (1989), revelou pequenas diferenças em aminoácidos que corresponderiam a variações mínimas no padrão de migração eletroforética. Assim, genericamente considerados como "slow" e "fast", existem na verdade um número ainda incerto de variantes enzimáticas, detectáveis apenas a partir de técnicas eletroforéticas de alta resolução, ou então, em experimentos de instabilidade térmica (Saad *et al.*, 1994). De maneira geral, estes resultados podem ser sugestivos que pequenas diferenças seletivas entre amostras destas variantes mínimas, obtidas nos primeiros estudos laboratoriais que compararam os alelos *Est-6^S* e *Est-6^F*, podem ter levado a observações equivocadas de diferenças adaptativas entre estas duas formas principais.

Alguns autores sugeriram a utilização de meios de cultura restritivos como um fator de ampliação das diferenças entre genótipos de isoenzimas, quando estas diferenças não são detectadas de maneira convincente. Por exemplo, Wills e seus colaboradores investigaram os locos da esterase-5 e da octanol desidrogenase (ODH) de *D. pseudoobscura* (Wills & Nichols, 1971, 1972; Wills *et al.*, 1975), sob a premissa que os coeficientes de seleção associados a diferentes genótipos seriam praticamente não detectáveis na maioria dos locos eletroforicamente polimórficos em populações exocruzantes. Foram utilizados diferentes meios de cultura que se esperava interagirem com os locos *Odh* e *Est-5*: meios contendo octanol e etanol, ambos

substratos para a enzima codificada pelo loco *Odh*, e tributirina, um lipídeo de cadeia curta que é levemente hidrolisado pela EST-5. Um resultado interessante, são as diferentes maneiras com que os diversos meios afetaram a sobrevivência dos genótipos *Odh*, detectadas por estes autores. Houve uma deficiência de homozigotos *Odh^S/Odh^S* e excesso de *Odh^F/Odh^F* em meio com etanol e exatamente o reverso em meio com octanol. Em cada caso, o heterozigoto não foi intermediário, com uma dominância parcial em relação ao genótipo mais apto. Para o loco *Est-5*, ligado ao sexo, a situação foi diferente. O hemizigoto *Est-5^F* esteve em desvantagem tanto em meio com octanol como com tributirina. Entretanto, os autores argumentaram que é provável existirem outros meios de cultura onde o hemizigoto *Est-5^S* seria desfavorecido.

No presente trabalho não foram utilizados meios restritivos para se maximizar os efeitos da seleção. Todavia, a metodologia empregada durante o procedimento experimental, como por exemplo, as várias réplicas para a análise dos componentes do valor adaptativo, mostrou-se suficiente para a detecção das diferenças observadas entre os genótipos.

As freqüências gênicas e genotípicas obtidas a partir de simulações computacionais (programa POPULUS), com os valores adaptativos líquidos para cada genótipo (**W'**, Tabela 11) e estimados a partir dos componentes do valor adaptativo (**W'e**, Tabela 25), foram comparadas com as freqüências obtidas experimentalmente (Tabelas 28 a 32).

A princípio, o software utilizado simula infinitas gerações de seleção em um loco autossômico, a partir de um modelo determinístico que assume tamanho populacional infinito, minimizando, desta forma, os erros de amostragem. Além disso, o modelo supõe que o regime de seleção permaneça constante durante toda a história evolutiva da população e que não exista nenhum efeito ambiental sobre o fenótipo, sendo ele diretamente o resultado de um único loco autossômico.

As comparações das Tabelas 28 e 29 entre os valores simulados para o **W'** e os experimentais revelaram a forte aderência para os valores das populações **A** e **E**, justificando que o modelo que melhor explica a dispersão do alelo **Est^S** ao longo das gerações é o da seleção direcional, determinado pelas diferenças adaptativas observadas entre os referidos genótipos, principalmente pela vantagem do homozigoto **Est^S/Est^S**.

Entretanto, o mesmo não foi observado para as populações **B**, **C** e **D**. Para a população **B**, o modelo simulado, segundo este mesmo valor adaptativo, previu



o valor 96,70% para a frequência do alelo **Est^S** na trigésima geração, cerca de 25,00% maior que os valores obtidos experimentalmente. Para a população **C**, previu 85,69%, cerca de 15,00% maior que o experimental. Todavia, para a população **D** a frequência simulada foi de 30,02%, 25,00% inferior a obtida experimentalmente.

Em relação às simulações computacionais utilizando-se os valores **W'e** (Tabelas 30 e 31), observa-se para a população **B** a não-rejeição da aderência entre o valor experimental e os valores simulados, independente da utilização do valor adaptativo médio dos heterozigotos (0,867) ou de seus valores individuais (**Est^F/Est^S**: 0,892; **Est^S/Est^F**: 0,842). Foram obtidas, respectivamente, as frequências 71,07%, 74,34% e 63,01% para as quais não se rejeitou a aderência em relação à trigésima geração experimental (70,83%), contrariamente ao observado para o **W'**. Para a população **E**, também não se rejeitou a aderência, como citado acima. Entretanto, para os valores relativos às simulações com frequências iniciais idênticas àquelas das populações **A**, **C** e **D**, foram rejeitadas as aderências ($p < 0,01$). Nas duas primeiras, os valores simulados para as frequências do alelo **Est^S** foram superiores aos obtidos experimentalmente. Mas, na população **D**, o valor simulado é cerca de 50,00% menor que o experimental, prevendo-se a necessidade de um número considerável de gerações para que atingisse cerca de 70,00%.

A rejeição das aderências nas populações pode ter sido devida a diferentes fatores. Primeiramente, por se tratar de comparações entre valores médios obtidos a partir de amostras de três réplicas a cada três gerações, existiu um componente amostral que não poderia ser descartado, como já discutido anteriormente (Futuyma, 1992; Gravilets & Hastings, 1994). Outra variável que poderia ter sido responsável pela rejeição pode ser o número de gerações insuficiente para que a frequência deste do alelo **Est^S** pudesse atingir valores mais altos.

Além disso, o modelo computacional não prevê variações ocasionais, como de deriva genética, que poderia determinar reduções casuais da frequências deste alelo, mas simplesmente, aplica às frequências dos genótipos os valores relativos de adaptabilidade, em um processo numérico determinístico, como previsto por Li & Graur (1991), que deve ser considerado com cautela pois admite populações infinitas e constância ambiental, dificilmente encontrados em experimentação.

Devemos considerar ainda que os valores **W'e** utilizados para as simulações foram calculados a partir de oito componentes do valor adaptativo, representativos de diferentes fases do ciclo biológico de *D. mulleri*, o que poderia ser uma subestimativa do valor adaptativo real para o genótipo, ocasionando pequenas



diferenças nas frequências genóticas e gênicas à trigésima geração. Além disso, estes valores foram calculados a partir de médias de componentes, segundo um modelo aditivo, introduzindo também um componente amostral relacionado ao erro padrão destas médias.

Como último fator, e talvez o mais relevante, que pode ter interferido nas frequências do alelo **Est^S** nas populações experimentais, destaca-se a inferioridade dos heterozigotos. Nas populações, as análises eletroforéticas não permitiram diferenciar os heterozigotos quanto à origem dos alelos (se **Est^F/Est^S** ou **Est^S/Est^F**); entretanto, em cruzamentos, pudemos avaliar seus valores adaptativos individuais. O heterozigoto, como já citado, **Est^S/Est^F** mostrou-se como o menos apto (0,842) e esta inferioridade relativa poderia ter interferido no aumento esperado da frequência do alelo **Est^S**, segundo o modelo teórico, devido à possibilidade de equilíbrio instável, que em alguns momentos favoreceria o alelo **Est^F**.

Futuyma (1992) tratando da inferioridade dos heterozigotos, coloca também este fenômeno como uma forma de manutenção de polimorfismos nas populações. Este autor considera que se os valores adaptativos de três genótipos (AA , AA' e $A'A'$), forem respectivamente $1+s_1$, 1 e $1+s_2$, haveria um equilíbrio em $\hat{q}=s_1/(s_1+s_2)$; entretanto, este equilíbrio seria instável se q fosse menor que $\hat{q}$, produzindo um Δq negativo e a frequência do alelo A' diminuiria. Se q fosse maior, Δq seria positivo, levando ao aumento e à fixação de A' . Portanto, a composição genética da população, neste caso, dependeria de sua frequência alélica inicial.

O equilíbrio instável pode ser demonstrado simulando computacionalmente (POPULUS) a dinâmica do alelo **Est^S**, com os valores adaptativos líquidos médios da população **A** (**Est^F/Est^S**: 1,000; heterozigoto: 0,874; **Est^F/Est^F**: 0,973). Verifica-se, com esta simulação, que a frequência de equilíbrio encontra-se em 44%, resultando na manutenção dos dois alelos na população. Frequências iniciais de **Est^S** superiores, favorecem-no, levando este alelo à fixação. Entretanto, frequências iniciais inferiores a 44% desfavorecem o alelo **Est^S** e determinam, conseqüentemente, o aumento de frequência de **Est^F**, que tenderia por sua vez à fixação. Este fenômeno pode ser o principal fenômeno redutor da velocidade de dispersão do alelo **Est^S**.

Em adição, a observação das diferenças significantes em relação ao esperado para as frequências gênicas e genóticas, obtidas na descendência dos cruzamentos entre os heterozigotos (Tabelas 26 e 27), ou seja, o aumento substancial de progênie **Est^S/Est^S** no cruzamento entre indivíduos **Est^F/Est^S**, somada à maior



gerações. É importante ressaltar que a partir deste ponto, as variações nas frequências alélicas seriam pequenas (inferiores a 1%), o que poderia estar sendo observado no estoque. Desta forma, o momento da história evolutiva da população em relação ao loco gênico em questão, de sua dinâmica, das forças seletivas envolvidas e dos possíveis fenômenos estocásticos, deve ser justamente o previsto segundo as Cadeias de Markov.

O presente trabalho abre novas linhas de abordagem, segundo diferentes metodologias, que poderiam ser empregadas para auxiliar o esclarecimento das questões aqui levantadas. Entre estas metodologias, deve ser citada a empregada por Game & Oakeshott (1989). Estes autores detectaram diferenças significativas na quantidade e na atividade da EST-6 sintetizada por diferentes alelos, de acordo com o sexo de adultos virgens de *D. melanogaster*. Além disso, técnicas bioquímicas como a eletroforese de alta resolução para a detecção de variantes mínimas, como utilizadas por Cooke *et al.* (1987) para esta mesma esterase, ajudariam a identificar novos genótipos, não observáveis segundo as técnicas convencionais.

Apesar das dificuldades que existem para explicar diferenças na adaptabilidade de genótipos a partir da extrapolação de dados bioquímicos, como por exemplo, aqueles obtidos pelos ensaios enzimáticos de White *et al.* (1988), para as proteínas EST-6^S e EST-6^F, acerca da especificidade de substratos, da termoestabilidade e dos efeitos do pH, de álcoois e de inibidores sobre a atividade destas enzimas, os resultados obtidos poderiam ser utilizados juntamente aos dados populacionais, na tentativa de elucidar as bases moleculares e evolutivas envolvidas na dinâmica da esterase-8 de *D. mulleri*.

Em conclusão, os resultados das frequências genótípicas e gênicas das populações experimentais, as médias dos componentes do valor adaptativo e os dois tipos de valores adaptativos calculados indicaram maior adaptabilidade do genótipo **Est^S/Est^S**, justificando o aumento na frequência do alelo **Est^S** ao longo das gerações, segundo um modelo de seleção direcional.

Este modelo seletivo explica as variações nas frequências gênicas, bem como, identificar os fatores evolutivos atuantes no polimorfismo dos alelos Est^S e Est^F e suas expressões ao longo das gerações.

Foram fundadas cinco populações experimentais com três réplicas cada uma, segundo diferentes frequências iniciais do alelo Est^S: população A (50%), B (25%), C (75%), D (12,5%) e E (87,5%), mantidas através da técnica de transferência serial. A cada três gerações, até a vigésima, foi feita uma amostragem de adultos

para análise eletrolítica em gel de poliacrilamida. Com os resultados das frequências gênicas e genótipas foram realizadas análises de Dependência de Tendência Linear de Séries Temporais e de Cadeias de Markov. Foram ainda calculados índices representativos do valor adaptativo (W) para cada geração.

Os resultados mostraram que as frequências de Est^S foram maiores ao final das 30 gerações independentemente de sua frequência inicial. As populações fundadas com frequências de Est^S inferiores às de Est^F (populações B e C), por volta da 15ª geração, as frequências de Est^S tornaram-se maiores, permanecendo assim até o final. Estes resultados são incompatíveis com a hipótese da neutralidade pois revelaram uma forte pressão seletiva favorecendo Est^S .

O genótipo Est^S/Est^S apresentou o maior W superior em 13 das 15 gerações. D e E, este genótipo apresentou maior valor seguido pelo genótipo Est^S/Est^F e por último o genótipo Est^F/Est^F .

V. RESUMO E CONCLUSÕES

Uma questão importante na genética de populações é se as variantes genéticas diferem em valor adaptativo, sendo assim matéria prima para a adaptação a novos regimes seletivos, ou, se a maior parte da variabilidade genética encontrada nas populações é seletivamente neutra e irrelevante para a capacidade de uma população responder a novas forças de seleção. As isoenzimas constituem uma parcela significativa dos polimorfismos e, as esterases, compreendem um grupo heterogêneo de isoenzimas que, nos insetos, estão envolvidas em vários processos metabólicos, incluindo a digestão, a degradação de inseticidas, de feromônios e do hormônio juvenil.

Em contribuição ao entendimento das questões acerca de qual fração da variabilidade enzimática é adaptativa e qual quantidade é seletivamente neutra, o presente trabalho foi planejado para atingir os seguintes objetivos: **a)** estudar a dinâmica de dispersão dos alelos Est^S e Est^F da esterase-8 em populações experimentais de *Drosophila mulleri*, ao longo de 30 gerações; **b)** decompor o valor adaptativo total em seus componentes e avaliar diferenças na expressão destes componentes entre as linhagens homozigotas e heterozigotas; **c)** verificar se algum modelo seletivo explica as variações nas frequências gênicas, bem como, identificar os fatores evolutivos atuantes no polimorfismo dos alelos Est^S e Est^F e suas expressões ao longo das gerações.

Foram fundadas cinco populações experimentais com três réplicas cada uma, segundo diferentes frequências iniciais do alelo Est^S : população **A** (50%), **B** (25%), **C** (75%), **D** (12,5%) e **E** (87,5%), mantidas através da técnica de transferência seriada. A cada três gerações, até a trigésima, foi feita uma amostragem de adultos

para análise eletroforética em gel de poliacrilamida. Com os resultados das frequências gênicas e genótípicas foram realizadas análises de Dependência, de Tendência Linear de Séries Temporais e de Cadeias de Markov. Foram ainda compostos índices representativos do valor adaptativo líquido (W') para cada genótipo.

Os resultados mostraram que as frequências de **Est^S** foram maiores, ao final das 30 gerações, independente da sua frequência inicial. Nas populações fundadas com frequências de **Est^S** inferiores às de **Est^F** (populações **B** e **D**), por volta da 15^a geração, as frequências de **Est^S** tornaram-se maiores, permanecendo assim até o final. Estes resultados são incompatíveis com a hipótese da neutralidade pois revelaram uma forte pressão seletiva favorecendo **Est^S**.

O genótipo **Est^S/Est^S** apresentou o maior W' , superior em 13 das 15 comparações. Nas populações **B**, **D** e **E**, este genótipo apresentou maior valor seguido pelo genótipo heterozigoto, o que caracteriza dominância parcial para o valor adaptativo, em concordância com a maior frequência de **Est^S** ao final das 30 gerações.

Através da Análise de Dependência mostrou-se que o genótipo **Est^S/Est^S** esteve fortemente associado com as gerações posteriores à 15^a, indicando que, de um modo independente da frequência inicial, este genótipo esteve diretamente relacionado às últimas gerações. Este fato, interpretado em associação às frequências genótípicas, sugere que a análise detectou o ponto em que este genótipo passaria a exercer a maior influência numérica no sistema, determinando a direção das curvas de frequência.

Com o intuito de descrever os dados experimentais, propôs-se um modelo baseado nas Cadeias de Markov. Foram simuladas várias gerações para se estabelecer o número necessário para que as frequências de **Est^S** apresentassem variações inferiores a 1% entre duas gerações. Assim, considerando-se intervalos de 20%, a frequência ponderada esperada para **Est^S** foi de 76,30% na 87^a geração, indicando que após esta geração, as alterações na frequência deste alelo seriam muito pequenas e mostrariam uma leve ascendência em direção a 100%. Para o estudo com intervalos de 10%, a frequência estável foi de 81,25%, após a 132^a geração.

A Análise de Tendência mostrou que as frequências de **Est^S** tiveram dispersões semelhantes ao longo das gerações nas três réplicas, indicando que a seleção atuou segundo um mesmo padrão em todas, o que está de acordo com a proposição de maior adaptabilidade deste alelo.

Com o objetivo de interpretar os resultados do estudo das populações, foram estudados componentes do valor adaptativo relativos à longevidade, à



produtividade, ao tempo de desenvolvimento e à viabilidade, de indivíduos dos quatro genótipos.

O estudo da longevidade mostrou que os indivíduos **Est^S/Est^S** acasalados foram significativamente mais longevos que os demais. Este resultado sugere que este genótipo seja favorecido, pois seus portadores poderiam permanecer mais tempo na população. Os valores da produtividade também sugerem uma razão adicional para as frequências aumentadas de **Est^S**, pois os cruzamentos com fêmeas **Est^S/Est^S** produziram cerca de duas vezes mais descendentes.

Foram observadas diferenças significativas na viabilidade dos genótipos, tendo o genótipo **Est^S/Est^S** sempre as maiores médias, com exceção da viabilidade pupa-imago (97,11%), para a qual, um dos heterozigotos (**Est^F/Est^S**) apresentou um valor levemente superior (97,52%). É importante ressaltar que este genótipo mostrou-se também muito eficiente nos demais componentes, destacando-se a importância da origem materna de **Est^S**. A maior viabilidade observada para o homozigoto **Est^S/Est^S** aumentaria também a frequência deste alelo nas populações.

Os tempos de desenvolvimento de indivíduos **Est^S/Est^S** e **Est^F/Est^S** foram sempre os menores, sugerindo maior eficiência destes genótipos. Considerando-se que metabólitos que se acumulam no meio de cultura e nas pupas relacionam-se justamente à fisiologia da digestão e que as esterases têm papel importante neste aspecto, poder-se-ia propor duas hipóteses para explicar o fato dos indivíduos portadores de **Est^S** em homozigose apresentarem maior produtividade: maior habilidade na metabolização destes agentes tóxicos e/ou menor produção de produtos tóxicos excretados no meio.

Os valores adaptativos totais (**W'e**) revelaram também maior adaptabilidade do genótipo **Est^S/Est^S** (1,000), seguido pelo heterozigoto **Est^F/Est^S** (0,892), que possuía o alelo **Est^S** de origem materna, pelo homozigoto **Est^F/Est^F** (0,863) e, pelo heterozigoto **Est^S/Est^F** (0,842).

Comparando-se as frequências obtidas experimentalmente com as simuladas a partir do **W'**, demonstrou-se a forte aderência para os valores das populações **A** e **E**, justificando que o modelo que melhor explicaria a dispersão de **Est^S** ao longo das gerações é o da seleção direcional. Em relação às simulações computacionais utilizando-se os valores **W'e**, observou-se para as população **B** e **E** a não-rejeição da aderência entre os valores experimentais e os simulados.

As rejeições das aderências podem ter sido o reflexo de uma redução da velocidade de dispersão de **Est^S**, superior àquela esperada quando atingisse



freqüências altas, além de fatores casuais relacionados à amostragem dos genótipos à cada geração e aos cálculos dos valores adaptativos a partir de médias, bem como, de deriva genética ocorrendo durante as gerações. A inferioridade do heterozigoto **Est^S/Est^F** poderia ter intervindo na velocidade de dispersão de **Est^S** devido à ocorrência de equilíbrio instável favorecendo **Est^F**, em determinadas freqüências.

Em conclusão, os resultados das freqüências genotípicas e gênicas das populações experimentais, as médias dos componentes do valor adaptativo e os dois tipos de valores adaptativos calculados indicaram maior adaptabilidade do genótipo **Est^S/Est^S**, justificando o aumento na freqüência de **Est^S** ao longo das gerações, segundo um modelo de seleção direcional.

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

An important question of population genetics is whether genetic variants differ regarding Darwinian fitness, thus being significant for adaptation to new selective pathway, or whether most of the genetic variability in populations is neutral and, therefore, without importance for population capacity to respond to new selective forces. Isozymes constitute a significant part of polymorphisms and esterases are a heterogeneous group of isozymes that in insects are involved in several metabolic processes, including digestion, degradation of insecticides, and of pheromones and juvenile hormones.

In order to contribute for the understanding of questions about which enzymatic variability fraction is adaptive, thus, being target to natural selection, and which is neutral fraction, this study was designed with the following aims: a) to study the dynamic of spreading of **Est^S** and **Est^F** esterase-B alleles in experimental populations of *D. muller*, along of 30 generations; b) to divide the Darwinian fitness into fitness components and to evaluate their expression differences between esterase-B homozygote and heterozygote strains; c) to identify the selective model that could explain genetic frequency variations and the evolutionary factors acting on polymorphism of **Est^S** and **Est^F** alleles, as well on their expressions along generations.

Five experimental populations, three times replicated, were founded with couples **Est^S/Est^S** and **Est^F/Est^F** according to different **Est^S** allele starting frequencies: A population (50%), B (25%), C (75%), D (12.5%) and E (87.5%), maintained through serial transfer technique. Every three generations to the 30th, males and females were sampled for polyacrilamide gel electrophoretic analysis. From the genic and genotypic

frequency results. Analysis of Dependence, Analysis of Linear Trend for Time Series and Analysis of Markov Chains were made.

The Est^S frequencies were always higher at the 30th generation, independent of the starting frequency. Around the 15th generations, the Est^S frequencies became higher than Est^F frequencies in populations B and C, which had started with lower Est^S frequencies. These results are incompatible with the neutral hypothesis since it showed a strong selective pressure favoring to Est^S allele. It was also composed index representing the net Darwinian fitness (W') for each genotype.

The Est^S/Est^S genotype showed the higher W' values in 30th M. generations. For B, D and E populations, the Est^S/Est^S genotype showed the higher value followed

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

An important question of population genetics is whether genetic variants differ regarding Darwinian fitness, thus being significant for adaptation to new selective pathway, or whether most of the genetic variability in populations is neutral and, therefore, without importance for population capacity to respond to new selective forces.

Isosymes constitute a significant part of polymorphisms and esterases are a heterogeneous group of isosymes that in insects are involved in several metabolic processes, including digestion, degradation of insecticides, and of pheromones and juvenile hormone.

In order to contribute for the understanding of questions about which enzymatic variability fraction is adaptive, thus, being target to natural selection, and which is neutral fraction, this study was designed with the following aims: **a)** to study the dynamic of spreading of Est^S and Est^F esterase-8 alleles in experimental populations of *D. mulleri*, along of 30 generations; **b)** to divide the Darwinian fitness into fitness components and to evaluate their expression differences between esterase-8 homozygote and heterozygote strains; **c)** to identify the selective model that could explain genic frequency variations and the evolutionary factors acting on polymorphism of Est^S and Est^F alleles, as well on their expressions along generations.

Five experimental populations, three times replicated, were founded with couples Est^S/Est^S and Est^F/Est^F , according to different Est^S allele starting frequencies: **A** population (50%), **B** (25%), **C** (75%), **D** (12,5%) and **E** (87,5%), maintained through serial transfer technique. Every three generations to the 30th, males and females were sampled for polyacrilamide gel electrophoretic analysis. From the genic and genotypic

frequency results, Analysis of Dependence, Analysis of Linear Trend for Time Series and Analysis of Markov Chains were made.

The **Est^S** frequencies were always higher at the 30th generation, independent of the starting frequency. Around the 15th generations, the **Est^S** frequencies became higher than **Est^F** frequencies in populations **B** and **C**, which had started with lower **Est^S** frequencies. These results are incompatible with the neutral hypothesis since it showed a strong selective pressure favoring to **Est^S** allele. It was also composed index representing the net Darwinian fitness (**W'**) for each genotype.

The **Est^S/Est^S** genotype showed the higher **W'** values in 13 of 15 comparisons. For **B**, **D** and **E** populations, the **Est^S/Est^S** genotype showed the higher value followed by the heterozygote one, so that it describes partial dominance concerning fitness. These relationships are expected for the results obtained in the 30th generation for the **Est^S** higher frequencies.

Analysis of Dependence (ANADEP) showed that **Est^S/Est^S** genotype was strongly associated with the generations after the 15th. This fact indicated that, independent of starting frequencies, this genotype was directly related to the last generations. Along with the genotype frequency results, the ANADEP detected the point in which this genotype began to exert a major numerical influence, determining the slope of frequency line graphs.

To describe the experimental data, we proposed a theoretical model based in Markov Chains. Several generations were simulated in order to evaluate the number of generations necessary to the frequencies of **Est^S** allele and of three genotypes to show changes lower than 1% between two generations. Thus, considering 20% intervals, the pooled expected frequency for **Est^S** allele was 76.30% in the 87th generation, which represented that, after this point, frequency changes will be very small in direction to 100%. To 10% interval study, the stability frequency was 81.25%, in the 132th generation.

The Analysis of Linear Trend for Time Series showed that **Est^S** frequencies of three replicates have similar spreading along 30 generations, suggesting that selective forces have the same magnitude in all of them, according to the proposition that this allele was related with higher adaptability.

In order to explain the population results, fitness components concerning longevity, productivity, time of development and viability, of flies from the four

genotypes, were assessed. In order to get reciprocal-direction heterozygotes, mass crosses were made with **Est^S/Est^S** and **Est^F/Est^F** flies.

The study of longevity showed that **Est^S/Est^S** mated flies are significantly more longevous, suggesting that this genotype is favored, since these flies stayed in the population until the next two generations. Moreover, productivity values indicate another reason for increasing **Est^S** allele frequencies in populations. The crosses involving **Est^S/Est^S** females produced almost two times more offspring than crosses with **Est^F/Est^F** females.

Significant differences on viability of genotypes were observed: **Est^S/Est^S** had the higher means, except for pupa-imago viability (97.11%) to which **Est^F/Est^S** showed a lightly superior value (97.52%). It is important to emphasize that this heterozygote genotype showed to be efficient to another fitness components, thus distinguishing the importance of **Est^S** allele maternal ascendance. The higher viability value observed for **Est^S/Est^S** would also increase **Est^S** frequencies in populations.

Times of development to **Est^S/Est^S** and **Est^F/Est^S** genotypes were always smaller, suggesting high efficiency, which was mainly imposed by reduced egg-pupa developmental times. Considering that the accumulation of metabolic products in culture medium and puparium was associated with digestive physiology, and esterases play an important role in this process, two explanations could tentatively be supposed for the higher productivity of **Est^S/Est^S** flies: greater ability of toxic agents degradation or small production of toxic excrements in culture medium.

The total Darwinian fitness (**W'e**) revealed higher adaptability of **Est^S/Est^S** (1.000), followed by **Est^F/Est^S** (0.892), with **Est^S** of maternal ascendance, followed by **Est^F/Est^F** (0.863), and **Est^S/Est^F** (0.842), with **Est^F** of maternal ascendance.

Comparing experimental genic and genotypic frequencies with the computer simulated ones, calculated from **W'**, strong adherence to **A** and **E** populations values was observed, indicating that the directional selection model is the best to explain **Est^S** dynamics along generations. Concerning the computer simulations with **W'e** values, non-rejection of adherence with experimental data to **B** e **E** populations was observed; however, the adherence for frequencies of **A**, **C** and **D** populations was rejected

The rejection of adherences might reflect a reduction of the speed of spreading of the **Est^S** allele, higher than that one expected when this allele reached

higher frequencies. Besides, factors due to chance acting on genotypes sampling every generation, as well as in the calculation of fitness values from averages, and genetic drift occurring along generations. The inferiority of **Est^S/Est^F** heterozygotes might interfered in the **Est^S** speed of spreading due to the occurrence of unstable equilibrium that could favor the **Est^F** allele at particular frequencies.

In conclusion, the results of genic and genotypic frequencies of experimental populations, the means of Darwinian fitness components and the two types of calculated Darwinian fitness values indicated higher adaptability of **Est^S/Est^S** genotype, which explained the frequency increase for **Est^S** allele along the generations, according to a directional selection model.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, A.C. Genetic factors in resistance to malaria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.91, p.719-29, 1961.
- ANDERSON, P.R., OAKESHOTT, J.G. Parallel geographic patterns of allozyme variation in two sibling *Drosophila* species. *Nature*, v.308, p.729-31, 1984.
- ARGENTINE, J.A., JAMES, A.A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, v.25, p.621-30, 1995.
- ARNASON, E. An experimental study of neutrality at the malic dehydrogenase and esterase-5 loci in *D. pseudoobscura*. *Heredity*, v.96, p.13-27, 1982.
- BARNES, P.R., MERREL, D.J. Mating preference and its relevance to adaptation in *D. melanogaster*: inversion polymorphism and DDT resistance. *Evolution*, v.39, p.1100-9, 1985.
- BARTON, N.H., TURELLI, M. Evolutionary quantitative genetics: how much do we know? *Am. Rev. Genet.*, v.23, p.337-79, 1989.
- BIJLSMA-MEELES, E., VAN DELDEN, W. Intra- and interpopulation selection concerning the alcohol dehydrogenase locus in *D. melanogaster*. *Nature*, v.247, p.369-71, 1974.
- BIJLSMA-MEELES, E., BIJLSMA, R. The alcohol dehydrogenase polymorphism in *D. melanogaster*: fitness measurements and predictions under conditions with no alcohol stress. *Genetics*, v.120, 743-53, 1988.
- BRITTNACHER, G.J. Genetic variation and genetic load due to the male reproductive component of fitness in *Drosophila*. *Genetics*, v.87, p.719-30, 1981.

- BULMER, M.G. Inbreeding in the great tit. *Heredity*, v.30, p.313-25, 1973.
- BUDNIK, M., BRNCIC, D. Effects of larval food resources on viability in four species of *Drosophila*. *Evolution*, v.29, p.777-80, 1975.
- BUTLIN, R.K., COLLINS, P.M., SKEVINGTON, S.J., DAY, T.H. Sexer inversion at the alcohol dehydrogenase locus in natural populations of the sawfly *Costopa trigua*. *Heredity*, v.48, p.45-55, 1982.
- BUZZATI-TRAVERSO, A.A. Evolutionary changes in components of fitness and other polygenic traits in *D. melanogaster* populations. *Heredity*, v.9, p.153-66, 1955.
- CARARETO, C.M.A. Valor adaptativo de *Drosophila obscura*. São José do Rio Preto, 1989. 150p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, A.C. Genetic factors in resistance to malaria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.91, p.710-29, 1961.
- ANDERSON, P.R., OAKESHOTT, J.G. Parallel geographic patterns of allozyme variation in two sibling *Drosophila* species. *Nature*, v.308, p.729-31, 1984.
- ARGENTINE, J.A., JAMES, A.A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, v.25, p.621-30, 1995.
- ARNASON, E. An experimental study of neutrality at the malic dehydrogenase and esterase-5 loci in *D. pseudoobscura*. *Hereditas*, v.96, p.13-27, 1982.
- BARNES, P.R., MERREL, D.J. Mating preference and its relevance to adaptation in *D. melanogaster*: inversion polymorphism and DDT resistance. *Evolution*, v.39, p.1100-9, 1985.
- BARTON, N.H., TURELLI, M. Evolutionary quantitative genetics: how much do we know? *Am. Rev. Genet.*, v.23, p.337-70, 1989.
- BIJLSMA-MEELES, E., VAN DELDEN, W. Intra- and interpopulation selection concerning the alcohol dehydrogenase locus in *D. melanogaster*. *Nature*, v.247, p.369-71, 1974.
- BIJLSMA-MEELES, E., BIJLSMA, R. The alcohol dehydrogenase polymorphism in *D. melanogaster*: fitness measurements and predictions under conditions with no alcohol stress. *Genetics*, v.120, 743-53, 1988.
- BRITTNACHER, G.J. Genetic variation and genetic load due to the male reproductive component of fitness in *Drosophila*. *Genetics*, v.97, p.719-30, 1981.



- BULMER, M.G. Inbreeding in the great tit. *Heredity*, v.30, p.313-25, 1973.
- BUDNIK, M., BRNCIC, D. Effects of larval biotic residues on viability in four species of *Drosophila*. *Evolution*, v.29, p.777-80, 1975.
- BUTLIN, R.K., COLLINS, P.M., SKEVINGTON, S.J., DAY, T.H. Genetic variation at the alcohol dehydrogenase locus in natural populations of the seaweed fly, *Coelopa frigida*. *Heredity*, v.48, p.45-55, 1982.
- BUZZATI-TRAVERSO, A.A. Evolutionary changes in components of fitness and other polygenic traits in *D. melanogaster* populations. *Heredity*, v.9, p.153-86, 1955.
- CARARETO, C.M.A. *Valor adaptativo de Drosophila sturtevantii*. São José do Rio Preto, 1989. 150p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.
- CARARETO, C.M.A., MOURÃO, C.A. Darwinian fitness in *Drosophila*. I. Fitness componentes of *D. prosaltans*. *Rev. Brasil. Genet.*, v.14, p.661-72, 1991a.
- CARARETO, C.M.A., MOURÃO, C.A. Darwinian fitness in *Drosophila*. II. Quantification of total fitness in *D. prosaltans*. *Rev. Brasil. Genet.*, v.14, p.937-52, 1991b.
- CARARETO, C.M.A., MOURÃO, C.A. Darwinian fitness in *Drosophila*. III. Fitness components of *D. sturtevantii*. *Rev. Brasil. Genet.*, v.15, p.323-38, 1992.
- CARRASCO, C.E., PÉREZ-CHIESA, Y., BRUCK, D. The esterases of *D. dunni*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.79B, p.375-8, 1984.
- CASTIGLIONI-RUIZ, L., BICUDO, H.E.M.C., CERON, C.R. Esterase patterns in four brazilian populations of *Haematobia irritans*. *Cytobios*, v.90, p.81-94, 1997.
- CERON, C.R. *Padrão de esterases no desenvolvimento de Drosophila mulleri, D. arizonensis e seus híbridos*. São Paulo, 1988. 142p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética). Instituto de Biociências, USP.
- CERON, C.R., SANTOS, J.R., BICUDO, H.E.M. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in embroiderin hoop. *Rev. Brasil. Genet.*, v.15, p.201-3, 1992.
- CHAMBERS, G.K., LAVER, W.G., CAMPBELL, S., GIBSON, J.B. Structural analysis of an electrophoretically cryptic alcohol dehydrogenase variant from an Australian population of *D. melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.78, p.3103-7, 1981.
- CLARKE, B. The contribution of ecological genetics to evolutionary theory: detecting the direct effects of natural selection on particular polymorphic loci. *Genetics*, v.79, p.101-13, 1975.
- CLEGG, M.T., ALLARD, R.W. Patterns of genetic differentiation in the slender wild oat species *Avena barbata*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.69, p.1820-4, 1972.



- COOKE, P.H., OAKESHOTT, J.G. Amino acid polymorphisms for esterase-6 in *D. melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.86, p.1426-30, 1989.
- COOKE, P.H., RICHMOND, R.C., OAKESHOTT, J.G. High resolution electrophoretic variation at the esterase-6 locus in a natural population of *D. melanogaster*. *Heredity*, v.59, p.259-64, 1987.
- CORDEIRO, J.A. *Análise de dependência*. São José do Rio Preto, 1990. Tese (Livro-Docência - Estatística). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.
- CROW, J.F. The dilemma of nearly neutral mutations: how important are they for evolution and human welfare? *J. Hered.*, v.63, p.306-16, 1972.
- DOBZHANSKY, Th. *Genética do processo evolutivo*. São Paulo: EDUSP-Polígono, 1973. 453p.
- DOBZHANSKY, Th., PAVLOVSKY, O. A further study of fitness of chromosomally polymorphic and monomorphic populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Heredity*, v.16, p.169-79, 1961.
- ENDLER, J.A. *Natural selection in the wild*. New Jersey: Princeton University Press, 1986.
- FALCONER, D.S. *Introduction to quantitative genetics*. 2.ed. London: Longman, 1981. 340p.
- FLETCHER, T.S., AYALA, F.J., THATCHER, D.R., CHAMBERS, G.K. Structural analysis of the ADH^S electromorph of *D. melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.75, p.5609-12, 1978.
- FUERST, P.A., CHAKRABORTY, R., NEI, M. Statistical studies on protein polymorphism in natural populations. I. Distribution of single locus heterozygosity. *Genetics*, v.86, p.455-83, 1977.
- FUTUYMA, D.J. *Biologia evolutiva*. 2.ed. Ribeirão Preto: Soc. Bras. Genética, 1992. 646p.
- GAME, A.Y., OAKESHOTT, J.G. Variation in the amount and activity of esterase 6 in a natural population of *D. melanogaster*. *Heredity*, v.62, p.27-34, 1989.
- GEISEL, J.T. Genetic co-variation of survivorship and other fitness indices in *D. melanogaster*. *Exp. Geront.*, v.14, p.323-8, 1979.
- GEISEL, J.T., ZETTLER, E.E. Genetic correlation of life historical parameters and certain fitness indices in *D. melanogaster*. *Oecologia*, v.37, p.299-302, 1980.
- GILLESPIE, J.H. Molecular evolution over the mutational landscape. *Evolution*, v.38, p.1116-29, 1984.



- GILMELFARB, A. Additive variation maintained under stabilizing selection: a two-locus model of pleiotropy for two quantitative characters. *Evolution*, v.112, p.717-25, 1986.
- GRAVILETS, S., HASTINGS, A. Dynamics of genetic variability in two-locus models of stabilizing selection. *Genetics*, v.138, p.519-32, 1994.
- HAIJ-AHMAD, Y., HICKEY, D.A. A molecular explanation of frequency-dependent selection in *Drosophila*. *Nature*, v.299, p.350-2, 1982.
- HARRIS, H. Enzyme polymorphisms in man. *Proc. R. Soc. (London)*, Ser. B, v.164, p.298-310, 1966.
- HEDRICK, P.W., MURRAY, E. Selection and measures of fitness. In: ASHBURNER, M., CARSON, H.L., THOMPSON, J.N. Jr (eds.) *The genetics and biology of Drosophila*. New York: Academic Press, 1983. p.61-104.
- HELLINGER, E. Quadratischen Formen von unendlichvielen Veranderlichen. *J. Reine U. Ang. Math.*, v. 136, p. 210-271, 1909.
- HILBISH, T.J., BAYNE, B.L., DAY, A. Genetics of physiological differentiation within the marine mussel genus *Mytilus*. *Evolution*, v.48, p.267-86, 1994.
- HOENIGSBERG, H.F., PALOMINO, J.J., ZANDSTRA, I.Z., ROJAS, G.G. Populations genetics in the American Tropics X. Genetic load differences in *D. willistoni* from Colombia. *Evolution*, v.31, p.805-11, 1977.
- HUBBY, J.L., LEWONTIN, R.C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *D. pseudoobscura*. *Genetics*, v.54, p.577-94, 1966.
- IUPAC-IUB COMISSION on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of multiples forms of enzymes. Recommendations (1976). *J. Biol. Chem.*, v.252, p.5939-41, 1977.
- JIANG, C., GIBSON, J.B., CHEN, H. Genetic differentiation in populations of *D. melanogaster* from the People's Republic of China: comparison with patterns on other continents. *Heredity*, v.62, p.193-8, 1989.
- JOHNSON, F.M., RICHARDSON, R.H., KAMBYSELLIS, M. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. III. Qualitative comparison of the esterases of *D. aldrichi* and *D. mulleri*. *Biochem. Genetic.*, v.1, p.239-47, 1968.
- JONES, B.R., BRANCOFT, H.R. Distribution and probable physiological role of esterases in reproductive, digestive and fat-body tissue of adult cotton boll Weevil *Anthonomus grandis*. *Both. Biochem. Genet.*, v.24, p.499-508, 1986.

- JONES, G., VENKATARAMAN, B.R., RIDLEY, B., O'MANOY, P., TURNER, H. Structure, expression and gene sequence of a juvenile hormone esterase-related protein from metamorphosing larvae of *Trichoplusia ni*. *Biochem. J.*, v.302, p.827-35, 1994.
- KAMBYSELLIS, M.P., JOHNSON, F.M., RICHARDSON, R.H. Isoenzyme variability in species of the genus *Drosophila*. IV. Distribution of the esterases in the body tissues of *D. aldrichi* and *D. mulleri* adults. *Biochem. Genet.*, v.1, p.249-65, 1968.
- KAROTAM, J., OAKESHOTT, J.G. Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. *Heredity*, v.71, p.41-50, 1993.
- KIRCHER, H.W., AL-AZAWI, B. Longevity of seven species of cactophilic *Drosophila* and *D. melanogaster* on carbohydrates. *J. Insect Physiol.*, v.31, p.165-9, 1985.
- KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, v.217, p.624-6, 1968.
- KIMURA, M. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge: Cambridge University Press, 1983.
- KING, J.L. Genetic polymorphisms and environment. *Science*, v.176, p.545, 1972.
- KOEHN, R.K., TURANO, F.J., MITTON, J.B. Population genetics of marine pelecypodes. II. Genetic differences in microhabitats of *Modiolus demissus*. *Evolution*, v.27, p.100-5, 1973.
- KOEHN, R.K., MILKMAN, R., MITTON, J.B. Population genetics of marine pelecypodes. IV. Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Evolution*, v.30, p.2-32, 1976.
- KOGIMA, K., YARBOROUGH, K.M. Frequency dependent selection at the esterase-6 locus in *D. melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.57, p.645-9, 1967.
- KOGIMA, K., TOBARI, Y.N. The pattern of viability changes associated with genotype frequency at the alcohol dehydrogenase locus in a population of *D. melanogaster*. *Genetics*, v.61, p.201-9, 1969.
- KORT, C.A., GRANGER, N.A. Regulation of the juvenile hormone titer. *Ann. Rev. Entomol.*, v.26, p.1-20, 1981.
- KREITMAN, M. Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *D. melanogaster*. *Nature*, v.304, p.412-7, 1983.
- LANGLEY, C.H. Nonrandom associations between allozymes in natural populations of *D. melanogaster*, In: CHRISTIANSEN, F.B., FENCHEL, T.M. (ed.) *Measuring selection in natural populations*. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.265-73.



- LAPENTA, A.S. *Padrão de esterases em D. serido*. São José do Rio Preto, 1998. p. Tese (Doutoramento em Ciências Biológicas - Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- LEWONTIN, R.C. The analysis of variance and the analysis of causes. *Am. J. Hum. Genet.*, v.26, p.400-11, 1964.
- LEWONTIN, R.C. *The genetics basis of evolutionary change*. New York: Columbia University, 1974. 346p.
- LEWONTIN, R.C., HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *D. pseudoobscura*. *Genetics*, v.54, p.595-609, 1966.
- LI, W.H., GRAUR, D. *Fundamentals of molecular evolution*. Sunderland: Sinauer. 1991. 284p.
- LIMA-CATELANI, A.R.A. *Padrão de esterases de Aedes aegypti e A. albopictus*. São José do Rio Preto, 1996. 126p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.
- MANE, S.D., TEPPER, C.S., RICHMOND, R.C. Studies of esterase-6 in *D. melanogaster*. XIII. Purification and characterization of the two major isozymes. *Biochem. Genet.*, v.21, p.1019-39, 1983.
- MARKOW, T., HEDRICK, P.W., ZUERLEIN, K., DANILOVS, J., MARTIN, J., VYVIAL, T., ARMSTRONG, C. HLA polymorphism in the Havasupai: evidence for balancing selection. *Am. J. Hum. Genet.*, v.53, p.943-52, 1993.
- McDONALD, J.F., AYALA, F.J. Genetic response to environmental heterogeneity. *Nature*, v.250, p.572-4, 1974.
- McGOLDRICK, D.J., HEDGECOCK, D. Fixation, segregation and linkage of allozyme loci in inbred families of the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg): implications for the causes of inbreeding depression. *Genetics*, v.146, p.321-34, 1997.
- MIEKLE, D.B. & RICHMOND, R.C. Localisation and longevity of seminal-fluid esterase 6 in mated female *D. melanogaster*. *J. Insect Physiol*, v.36, p.93-101, 1990.
- MINAWA, A., BIRLEY, A.J. Genetical and environmental diversity in *D. melanogaster*. *Nature*, v.255, p.702-4, 1975.
- MORTON, N.E. Genetic studies of Northwestern Brazil. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, v.29, p.69-79, 1964.

- MORTON, N.E., KRIEGER, H., MI, M.P. Natural selection on polymorphisms in Northeastern Brazil. *Am. J. Hum. Genet.*, v.18, p.153-71, 1966.
- MOYA, A., BOTELLA, L.M. Larva-to-adult and pupa-to-adult mortality dynamics in crowded cultures of *D. melanogaster*. *Genetica*, v.67, p.201-7, 1985.
- MUELLER, L.D., AYALA, F.J. Fitness and density-dependent population growth in *D. melanogaster*. *Genetics*, v.97, p.667-77, 1981.
- NAGYLAKI, T. The maintenance of genetic variability in two locus models of stabilizing selection. *Genetics*, v.122, p.235-48, 1989.
- NEI, M. Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. In: NEI, M., KOEHN, R.K. (eds). *Evolution of genes and proteins*. Sunderland: Sinauer, p.165-90, 1983.
- NEI, M., FUERST, P.A., CHAKRABORTY, R. Subunit molecular weight and genetic variability of proteins in natural populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.75, p.3359-62, 1978.
- NEI, M., GRAUR, D. Extend of protein polymorphism and the neutral mutation theory. *Evol. Biol.*, v.17, p.73-118, 1984.
- OAKESHOTT, J.G., WILSON, S.R., KNIBB, W.R. Selection affecting enzyme polymorphisms in confined populations of *Drosophila* living in a natural environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.85, p.293-7, 1988.
- OAKESHOTT, J.G., SAAD, M., GAME, A.Y., HEALY, M.J. Causes and consequences of esterase 6 enzyme activity variation in pre-adult *D. melanogaster*. *Heredity*, 73, p. 160-9, 1994.
- O'BRIEN, S.J., MacINTYRE, R. Genetics and biochemistry of enzymes and specific proteins of *Drosophila*. In: ASHBURNER, M., WRIGHT, T.R.F. (ed.) *The genetics and biology of Drosophila*. v.2A, p.395-551, 1978.
- OHTA, T. Mutational pressure as the main cause of molecular evolution and polymorphism. *Nature*, v.252, p.351-4, 1974.
- ORR, H.A., COYNE, J.A. The genetics of adaptation revisited. *Am. Nat.*, v.140, p.725-42, 1992.
- PATTERSON, J.T. The Drosophilidae of the Southwest. *Univ. Tex. Publs.*, v.4313, p.7-203, 1943.
- PIPKIN, S.B., FRANKLIN-SPRINGER, E., LAW, S., LUBEGA, S. New studies of the alcohol dehydrogenase cline in *D. melanogaster* from Mexico. *J. Heredity*, v.67, p.258-66, 1976.

- POWELL, J.R. Genetic polymorphisms in varied environments. *Science*, v.174, p.1035-6, 1971.
- POWELL, J.R. Genetic polymorphism and environment (reply). *Science*, v.176, p.545, 1972.
- PROUT, T. The relation between fitness components and population prediction in *Drosophila*. I. The estimation of fitness components. *Genetics*, v.68, p.127-49, 1971a.
- PROUT, T. The relation between fitness components and population prediction in *Drosophila*. II. Population prediction. *Genetics*, v.68, 151-167, 1971b.
- RAUSCHENBACH, I.Y., LUKASHINA, N.S., KOROCKKIN, L.I. Role of pupal esterase in regulation of hormonal status in two *D. virilis* stocks differing in response to high temperature. *Develop. Genet.*, v.22, p.65-80, 1994.
- RICHMOND, R., POWELL, J.R. Evidence of heterosis associated with an enzyme locus in a natural population of *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.67, p.67, 1970.
- RICHMOND, R., SENIOR, A. Esterase 6 of *Drosophila melanogaster*: kinetics of transfer to females, decay in females and male recovery. *J. Insect. Physiol.*, v.24, p.849-853, 1981.
- RIDLEY, M. *Evolution*. 2.ed. Oxon: Blackwell Science, 1996. 719p.
- RITS, C.R.F. *Padrão de esterases em Megaselia scalaris*. São José do Rio Preto, 1997. 128p. Tese (Doutoramento em Ciências Biológicas - Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- ROSE, M.R. Theories of life-history evolutions. *Amer. Zool.*, v.23, p.15-23, 1983.
- SAAD, M., GAME, A.Y., HEALY, M.J., OAKESHOTT, J.G. Associations of esterase 6 allozyme and activity variation with reproductive fitness in *D. melanogaster*. *Genetica*, v.94, p.43-56, 1994.
- SCOTT, D. Inhibition of female *D. melanogaster* remating by a seminal fluid protein (esterase-6). *Evolution*, v.40, p.1084-91, 1986.
- SCOTT, D., RICHMOND, R.C. Evidence against an antrophrodisiac role for cisvaccenil acetate in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect. Physiol.*, v.33, p.363-9, 1987.
- SHEPPARD, P.M., COOK, L.M. The manifold effects of the *medionigra* gene of the moth *Panaxia dominula* and the maintenance of a polymorphism. *Heredity*, v.15, p.415-26, 1962.
- SIMMONS, M.J., PRESTON, C.R., ENGELS, W.R. Pleiotropic effects on fitness of mutations affecting viability in *D. melanogaster*. *Genetics*, v.94, p.467-75, 1980.

- SINGH, M., LEWONTIN, R.C. Stable equilibria under optimizing selection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.56, p.1345-8, 1966.
- SOMERO, G.N. Temperature adaptation of enzymes: biological optimization through structure-function compromises. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v.9, p.1-17, 1978.
- SPACKMAN, M.E., OAKESHOTT, J.G., SMYTH, K., MEDVECZKY, K.M., RUSSEL, R.J. A cluster of esterase genes on chromosome 3R of *D. melanogaster* includes homologues of esterase genes conferring insecticide resistance in *Lucilia cuprina*. *Biochem. Genet.*, v.32, p.39-62, 1994.
- STURTEVANT, A.H. The classification of the genus *Drosophila*, with descriptions of nine new species. *Univ. Tex. Publs.*, v.4213, p.5-51, 1942.
- TADEI, W.J., MOURÃO, C.A. Cyclic oscillations in population size of *D. sturtevantii*. *Rev. Brasil. Genet.*, v.4, p.149-64, 1981.
- TOSIC, M., AYALA, F.J. Density- and frequency-dependent selection at the *Mdh-2* locus in *D. pseudoobscura*. *Genetics*, v.97, p.679-701, 1981.
- TRACEY, M.L., BELLET, N.F., GRAVEN, C.D. Excess allozyme homozygosity and breeding population structure in the mussel *Mytilus californianus*. *Mar. Biol.*, v.32, p.303-11, 1975.
- TSACAS, L., LACHAISE, D., DAVID, J.R. Composition and biogeography of the afrotropical drosophilid fauna. In: ASHBURNER, M., CARSON, H.L., THOMPSON, J.N. (eds). *The genetics and biology of Drosophila*. v.3a, Londres: Academic Press, p.197-259, 1981.
- VAN DELDEN, W. The alcohol dehydrogenase polymorphism in *D. melanogaster*. *Evol. Biol.*, v.15, p.187-222, 1982.
- VAN DELDEN, W., BOEREMA, A.C., KAMPING, A. The alcohol dehydrogenase polymorphism in populations of *D. melanogaster*. I. Selection in different environments. *Genetics*, v.90, p.161-91, 1978.
- VILELA, C.R. A revision of the *D. repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Ent.*, v.27, p.1-114, 1983.
- WAGNER, R.P. The nutrition of *Drosophila mulleri* and *D. aldrichi*. *Univ. Tex. Publs.*, v.4445, p.104-128, 1944.
- WASSERMAN, M. Cytological studies of the *repleta* group of the genus *Drosophila*. VI. The *fasciola* subgroup. *Univ. Tex. Publs.*, v.6205, p.119-34, 1962.
- WASSERMAN, M. Evolution of the *repleta* group. In: ASHBURNER, M., CARSON, H.L., THOMPSON, J.N. (eds). *The genetics and biology of Drosophila*. v.3b, Londres, Academic Press, p.61-139, 1982.



- WATTERSON, G.A. The homozygosity test of neutrality. *Genetics*, v.88, p.405-17, 1978.
- WHARTON, L.T. Interspecific hybridization in the *repleta* group. *Univ. Tex. Publs.*, 4445: 175-193, 1944.
- WHITE, M.M., MANE, S.D., RICHMOND, R.C. Studies of esterase 6 in *D. melanogaster*. XVIII. Biochemical differences between the slow and fast allozymes. *Mol. Biol. Evol.*, v.5, p.41-62, 1988.
- WILLIAMS, S.M. Differences in life history traits between alcohol dehydrogenase genotypes of *D. mercatorum*: background and maternal genotype effects. *Genetica*, v.74, p.149-53, 1987.
- WILLS, C. *Genetic variability*. New York: Oxford, 1981. 312p.
- WILLS, C., NICHOLS, L. Single gene heterosis in *Drosophila* revealed by inbreeding. *Nature*, v.233, p.123-5, 1971.
- WILLS, C., NICHOLS, L. How genetic background masks single-gene heterosis in *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.69, p.323-5, 1972.
- WILLS, C., PHELPS, J., FERGUSON, R. Further evidence for selective differences between isoalleles in *Drosophila*. *Genetics*, v.79, p.127-41, 1975.
- YAMAZAKI, T. Measurement of fitness at the esterase-5 locus in *D. pseudoobscura*. *Genetics*, v.67, p.579-603, 1971.
- YAMAZAKI, T., HIROSE, Y. Genetic analysis of natural populations of *D. melanogaster* in Japan. II. The measurement of fitness components in homozygous lines. *Genetics*, v.108, p.213-21, 1984.
- ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1998. 663p.
- ZOUROS, E., SINGH, S.M., MILES, H.E. Growth rate in oysters: an overdominant phenotype and its possible explanations. *Evolution*, v.34, p.856-67, 1980.



D. Tampão da corrida Tris-Glicina 0,1M, pH 8,3

Tris 3,02g

Glicina 14,42g

- Acrescentou-se água destilada para 200mL

preparou-se no momento da eletroforese

E. Tampão fosfato 0,1M, pH 8,2

NaH_2PO_4 0,2M 100mL

Na_2HPO_4 0,2M 410mL

- acertou-se para pH 8,2 acrescentando

VIII. APÊNDICE - Soluções utilizadas na análise eletroforética

A. Solução de Acrilamida/Bisacrilamida 30,8%

Acrilamida 30,0g

Bisacrilamida 0,8g

- Acrescentou-se água destilada para 100mL

- filtrou-se em algodão ou papel de filtro

F. Solução de Etanol - reservou-se sob refrigeração e em frasco escuro

Etanol 250mL

Ácido acético glacial 100mL

B. Tampão do gel (4x) Tris-HCl 1,5M, pH 8,8

Tris 18,17g

- Acrescentou-se água destilada para 80mL

- acertou-se para pH 8,8 com HCl 6M

G. Solução de Glicerol - reservou-se sob refrigeração e em frasco escuro

Glicerol 15mL

Ácido 70mL

Água destilada 815mL

C. Tampão de amostra Tris-HCl 0,1M, pH 8,8

Tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 1,4mL

Glicerol concentrado (87%) 2,6mL

Solução de Azul de bromofenol 1,0mL

- Acrescentou-se água destilada para 20mL

- reservou-se sob congelamento em frasco escuro

- validade aproximada de 1 mês



D. Tampão de corrida Tris-Glicina 0,1M, pH 8,3

Tris 3,02g

Glicina 14,42g

- Acrescentou-se água destilada para 2000mL

- preparou-se no momento da eletroforese

E. Tampão fosfato 0,1M, pH 6,2 NaH_2PO_4 0,2M 100mL Na_2HPO_4 0,2M 410mL

- acertou-se para pH 6,2 acrescentando:

- Na_2HPO_4 0,2M para aumentar o pH- NaH_2PO_4 0,2M para reduzir o pH

- Acrescentou-se água destilada para 1000mL

- reservou-se sob refrigeração e em frasco escuro

- validade aproximada de 3 meses

F. Solução descorante do gel

Etanol comercial 250mL

Ácido acético glacial 100mL

Água destilada 650mL

- reservou-se à temperatura ambiente e em frasco escuro

- validade aproximada de 3 meses

G. Solução conservante do gel

Glicerina comercial 15mL

Ácido acético glacial 70mL

Água destilada 915mL

- reservou-se à temperatura ambiente e em frasco escuro

- validade aproximada de 3 meses

IX. AGRADECIMENTOS

Ao fim deste trabalho, gostaria de prestar meus mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que participaram, direta ou indiretamente, para a sua concretização. Dentre elas, agradeço particularmente:

à Profa. **Dra. Cláudia Márcia A. Carareto**, amiga e professora, pelo exemplo de seriedade e conduta científica, pela atenção e pela orientação segura durante todos estes anos, desde minha graduação;

ao Prof. **Dr. Carlos Roberto Ceron**, pela amizade e co-orientação, pelo entusiasmo e pelas valiosas sugestões que enriqueceram o trabalho;

aos Profs. **Dra. Eucléia Primo Betioli Contel**, **Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo**, **Dr. Aldo Mellender de Araújo** e **Dr. Antônio José Manzato**, pela presteza e atenção na análise da proforma e pelas relevantes contribuições à forma definitiva deste trabalho;

ao Prof. **Dr. José Antônio Cordeiro**, pelo estímulo e pela enorme contribuição na análise estatística dos resultados;

ao Prof. **Dr. Alvaro Luiz Rattner**, pelo interesse e colaboração na redação do "Summary and Conclusions";

aos meus professores do Curso de Pós-Graduação, em especial aos do Departamento de Biologia da UNESP de S.J.Rio Preto, por toda a atenção e empenho para o meu amadurecimento científico: **Dra. Adelina B. C. Silva**, **Dr. Aluísio J. Gallo**, **Dra. Eloisa H. Tajara**, **Dr. Grigor Vartanian**, **Dra. Hermione E. M. de Campos Bicudo**, **Dra. Maria Tercília V.A. Oliveira**, **Dra. Maria Astride S. Corradi**, **Dra. Marileila V. Garcia** e **Dr. Wladimir J. Tadei**.



ao meu querido e saudoso amigo, **Dr. Celso A. Mourão**, pelo exemplo de amor à Ciência e ao magistério, pela amizade e confiança a mim dedicados;

à **Dra. Fádua R. C. Rits**, pelo auxílio na realização das análises eletroforéticas, pela amizade e incentivo;

a todos Colegas do Curso de Pós-Graduação, pela convivência harmoniosa e por todas as dificuldades que superamos juntos;

à Fundação Educacional de Votuporanga, pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho e ao Centro Universitário de Rio Preto, pela disponibilização dos recursos gráficos.

a todos os funcionários do Departamento de Biologia, em especial à **Sras. Simone C. Fernandes e Olga B. Pelicer** pelo carinho a mim dedicado e, à **Sra. Laura N. Almeida** e aos **Srs Paulo A. Maziero e Sebastião D. Barbosa**, pelo auxílio técnico;

aos funcionários e colegas professores do Centro Universitário de Votuporanga e do Centro Universitário de Rio Preto, pelo apoio e incentivo;

aos meus alunos, do passado e do presente, pelo ideal e respeito acadêmico, por todo o incentivo e amizade.

às funcionárias da biblioteca da UNESP, pelo zelo nos serviços de comutação bibliográfica e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela atenção;

aos graduandos **Marcelo R. Luizon e Ana Paula B. Reinaque**, pelo auxílio nas análises eletroforéticas dos estoques;

à Direção da UNESP de S.J.R. Preto, pelas condições materiais;

aos meus amigos **Dra. Mônica V. Nunes Lipay, Dr. Marco Aurélio Lipay, Dr. Mauro T. Villanova, Méd. Vet. Alexander L. Rits, Farm. Rogério C. de Castro, Nutr. Agdamar Suffredinni, Fis. Neuseli Lamari, Profa. Encarnação Manzano e Dra. Sirlei Branco**, pela amizade e incentivo a mim dedicados;

aos meus sogros **Valter** (*in memoriam*) e **Maria Terezinha**, à vovó **Idalina**, aos meus cunhados e sobrinhos por todos os anos de carinho e incentivo;

à minha querida avó **lot**, tios e primos pelo incentivo e carinho.

aos meus queridos pais, **Celso e Nelzi**, pelo exemplo de dedicação e amor à família, sempre me incentivando e apoiando e, aos meus irmãos, **Maurício, Márcio e Gerusa**, por toda a amizade e apoio;

à minha querida esposa, **Sheila** pelo altruísmo, amor e convivência e por ter gerado nosso maior tesouro: a nossa querida filha **Marcela**;

finalmente, ao **Senhor**, por tudo e por todos.



