Luís Gustavo da Conceição Galego

Polimorfismos Aloenzimáticos e Interações Competitivas Pré-adultas em uma População Brasileira de *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae)



cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

1910001153

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Pós-Graduação em Genética

LUÍS GUSTAVO DA CONCEIÇÃO GALEGO

Polimorfismos Aloenzimáticos e Interações Competitivas Pré-adultas em uma População Brasileira de *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae)

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Genética.

São José do Rio Preto - SP

2003

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Pós-Graduação em Genética

LUÍS GUSTAVO DA CONCEIÇÃO GALEGO

POLIMORFISMOS ALOENZIMÁTICOS E INTERAÇÕES COMPETITIVAS PRÉ-ADULTAS EM UMA POPULAÇÃO DE *Z. indianus* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)

BIBLIOTECA Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - S. J. Rio Preto
T. J153/03

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto

São José do Rio Preto - SP

2003

†575
G152p

20204000

Galego, Luís Gustavo da Conceição.
Polimorfismos aloenzimáticos e interações competitivas pré-adultas em uma população de *Z. indianus* (Díptera: Drosophilidae)/ Luís Gustavo da Conceição Galego – São José do Rio Preto : [s.n.], 2003
140 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Cláudia Márcia Aparecida Carareto
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética de populações. 2. *Zaprionus indianus*. 3. Aloenzimas,. 4. Polimorfismos. 5. Esterases. 6. Viabilidade. I. Carareto, Cláudia Márcia Aparecida. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios de Genética de Populações e de Genética-Bioquímica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob a orientação da Profa. Dra. Claudia Márcia Aparecida Carareto, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

LUÍS GUSTAVO DA CONCEIÇÃO GALEGO

POLIMORFISMOS ALOENZIMÁTICOS E INTERAÇÕES COMPETITIVAS PRÉ-ADULTAS EM UMA POPULAÇÃO DE *Z. indianus* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)

DISSERTAÇÃO APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientadora: .....

2º Examinador: .....

3º Examinador: .....

São José do Rio Preto - SP

___/___/_____

AGRADECIMENTOS

Várias foram as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste árduo trabalho. Este espaço é dedicado a estas pessoas maravilhosas que nos estimulam a caminhar, a chegar e prosseguir. A todas elas meu muito obrigado e, em especial:

- À Profa. Dra. Cláudia Carareto, pelo exemplo profissional e conduta ética irretocável em todos os momentos, pela orientação segura e a rotineira disponibilidade para a discussão desta dissertação, pelo incentivo constante a vencer os obstáculos que o trabalho científico sempre nos impõe, pela amizade e dedicação que dispensa a carreira e a todos os orientados, por ter me tornado um profissional mais qualificado.
- Ao Prof. Carlos Ceron, pelo espaço cedido e acolhida em seu laboratório, pelas sugestões e colaborações valorosas a este trabalho, pelas palavras de estímulo e a boa-vontade em solucionar minhas dúvidas, muito obrigado!!
- Aos Profs. Hermione Bicudo e Fábio de Melo Sene, pela seriedade com que conduziram suas carreiras e pelo papel ímpar que tiveram e têm para o crescimento da ciência em nosso país e por terem aceitado o convite de fazerem parte da banca de defesa desta dissertação.
- Ao Prof. Antonio José Manzato, pela valiosa colaboração no delineamento experimental e na análise estatística.
- Aos pós-graduandos Felipe Torres, pelo auxílio na identificação das espécies de *Drosophila*, Fábio, Adriana e Hamilton, pela ajuda com os dados de Peso Molecular.
- Aos Profs. do Programa de Pós-Graduação em Genética, em especial aos Profs. Clláudia Bonini, Gustavo Bonilla, Carlos Ceron,

Paula Rahal, Hermione Bicudo, Eloíza Tajara, Lílian Madi, Antônio Manzato, Maria Eliza Arnoni, Marlene Kobayashi, Mary Itoyama, Maria Tercília e Ana Elizabete, em especial às duas últimas pela coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética.

- À família Monta-Lage, em nome do Sr. Irlei, da Sra. Regina e da Juliana, por ter permitido a utilização de sua Chácara para a captura dos insetos utilizados neste trabalho. Agradeço, em especial, ao Sr. Irlei pela colaboração constante e sugestões valiosas para melhorar a captura dos insetos, a Sra. Regina pela eterna simpatia e pelas deliciosas refeições que pude saborear em sua residência e a Juliana pela atenção, colaboração e boa vontade!!
- À Eliani Ohira, pelo suporte técnico indispensável, pelas valiosas sugestões, pelo bom-humor e o otimismo característicos de sua personalidade.
- Aos funcionários da seção de pós-graduação do IBILCE-UNESP, em especial Oscar, Rosana, Nanci, Genoefa e Rosemar, pela boa-vontade, carinho e atenção com nossas dúvidas burocráticas.
- À secretária do departamento de Biologia, Simone, pela colaboração.
- À Sônia, da Casa da Agricultura de Mirassol, pelas valiosas informações dos índices pluviométricos da região.
- Aos companheiros, Marcos *Diet*, Carol e Leiliani pelo apoio laboratorial, pela ajuda metodológica, pela amizade sincera e pelos momentos de descontração no laboratório de Genética-Bioquímica.
- Aos companheiros de orientadora, Juliana, Luciane, Nathalia e Fabrício, pelo apoio, convivência e críticas valorosas para a melhoria da aula de defesa.
- Aos meus companheiros de pós-graduação, em especial Ulises, Jucimara, Ana Cláudia, Ana Paula, Andréia, Luciana, Patrícia,

Aline, Giovana, Alessandra Vidotto, Alessandra Bernardo, Alessandra Laranja, Alessandra Trovo, Paula Moreira, Sandra, Mariângela, Marcos Higino, Rosa, Ana Regina, Fátima, Ana Sílvia, pelas conversas, risos e alegrias que me proporcionaram ao longo desses anos.

- Ao tutor do PET, Classius de Oliveira, e aos meus amigos que foram por ele tutelados, Menin, Michela, Silvana, Júnia, Ana Maria, Chicão, Marcelo, Rodrigo, Dodô, Jane, Mariângela, Adriano, Bianca, Carol, Erica, Bárbara, Xexéu, Gustavo, Renato, Marcos, Vanessa, Van-de-Mel, pela ótima formação que me proporcionaram.
- Ao meu amigo Milclei Bizaio pela versão em inglês do resumo e pela agradável companhia.
- Ao meu amigo josé Arnaldo Jorge, pela ajuda nas coletas e na digitação das referências bibliográficas, e pela sinceridade de sua amizade.
- Às minhas grandes amigas Cássia, Karina e Flávia, pela ajuda fundamental com datas e burocracias, pela companhia agradável e pela força em momentos críticos.
- Às minhas grandes amigas, Carla, Taty Sacchi, Taty-Mãe, Taty-Mi e Cris, pela companhia e amizade ao longo desses anos.
- A minha grande e eterna amiga Maria Andréia nunes, por todos os momentos que passamos juntos e por nossa amizade ainda persistir.
- Ao pessoal da minha turma de Biologia, em especial Gisele, Maristella, Thelma, dênis, Eduardo e Priscila.
- Aos amigos Cláudia Pacheco, Márcio Cri-Cri, Lya, Lilian Castiglione, Marcus, pelos momentos de descontração;

- Ao pessoal dos fóruns Arayashiki e X 1999 por me fazerem "desligar" do mestrado um pouco...
- Aos meus pais, Jorge e Geny, irmãos, Jorge e Ricardo, e cunhada Rosane, por tudo o que fizeram por mim em minha vida, e pela compreensão em relação às minhas atitudes.
- À CAPES, pelo apoio financeiro.
- À Direção do IBILCE, pelas condições materiais que possibilitaram a realização deste trabalho;
- A Deus, pela minha vida, pelas minhas realizações, por tudo.

"A ciência é uma aventura de toda a raça humana para aprender a viver e talvez a amar o universo onde se encontra. ser uma parte dele é compreender, é conhecer-se a si próprio, é começar a sentir que existe dentro do homem uma capacidade muito superior à que ele pensava ter e uma quantidade infinita de possibilidades humanas"

Isaac I. Rabi

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Dedico...
...aos meus pais (Jorge e Geny)
...aos meus irmãos (Jorge e Rico)
...à minha cunhada (Rô)

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO **01**

I.A. Caracterização da Espécie 01

I.B. Interações Competitivas 03

I.C. Polimorfismos Enzimáticos 06

OBJETIVOS **12**

II. MATERIAL E MÉTODOS **13**

II.A. Material Biológico 13

II.B. Metodologia 13

II.B.1. Caracterização das Esterases 13

II.B.1.a. Determinação do peso molecular 15

II.B.1.b. Resposta a inibidores 16

II.B.1.c. Determinação do padrão de herança 16

II.B.1.d. Identificação de atividade esterásica tecido-específica 16

II.B.1.e. Identificação de atividade esterásica idade-específica e relacionada à atividade sexual 17

II.B.2. Variação Temporal das Esterases do Loco Est-2 18

II.B.3. Interações Competitivas Pré-Adultas 18

II.B.3.a. Determinação da espécie de *Drosophila* mais frequente na estação úmida e na estação seca 18

II.B.3.b. Competição em meio condicionado 19

II.B.3.c. Análise dos polimorfismos enzimáticos nos competidores viáveis 20

IV. RESULTADOS **21**

IV.1. Caracterização das Esterases 21

IV.2. Variação Temporal das Esterases do Loco Est-2 36

IV.3. Interações Competitivas Pré-Adultas 45

V. DISCUSSÃO **56**

VI. CONCLUSÕES **70**

VII. RESUMO **72**

VIII. ABSTRACT **74**

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **76**

I. INTRODUÇÃO

unesp

I. INTRODUÇÃO

A. Caracterização da espécie

Zaprionus indianus é um Diptera da família Drosophilidae, subgênero *Zaprionus* (Chassagnard, 1996), grupo *armatus* e subgrupo *vittiger* (Chassagnard, 1993). Esta espécie foi descrita por Gupta, em 1970, e o primeiro registro de sua ocorrência em território sul-americano data de 20 de março de 1999 (Vilella, 1999). Atualmente, o gênero *Zaprionus* está composto por dois subgêneros e um total de 56 espécies, 20 das quais são endêmicas da África (Sciandra *et al.*, 1974; Bennet-Clark *et al.*, 1980; Tsacas *et al.*, 1981). Segundo Tsacas (1985), *Z. indianus* é a espécie do gênero *Zaprionus* mais comum na África e, conforme foi invadindo outras regiões do planeta, foi redescrita com diferentes nomes específicos: *Z. paravittiger*, por Gradbole & Vaidya (1972); *Z. collarti*, por Tsacas (1980a); e *Z. vittiger*, por Tsacas (1980b). Desta forma, *Z. paravittiger*, *Z. collarti* e *Z. vittiger* nada mais são que sinonímias de *Z. indianus*.

Zaprionus indianus tem aproximadamente 3,0 mm de comprimento, cor castanha e olhos vermelhos, apresentando faixas longitudinais branco-prateadas bordejadas de estreitas faixas negras na região dorsal da cabeça e tórax. Esta parece ser a única espécie do gênero *Zaprionus* que está se espalhando pelas regiões tropicais, provavelmente devido à intensificação do comércio mundial de frutas. Ocorre por toda África e sua distribuição geográfica é bastante ampla: em ilhas do Oceano Índico (Ilhas Comores, Madagascar, Seychelles, Reunião e Mascarenhas) e do Oceano Atlântico (Ilhas Canárias e Santa Helena), Continente Asiático (Índia e Arábia Saudita) e América Latina (Brasil e Uruguai). Este drosofilídeo foi encontrado em 74 espécies botânicas de 31 famílias (*cf.* Stein *et al.*, 2000). Entre estas plantas, inúmeras são nativas do continente americano

(abacate, abacaxi, cajá-mirim, goiaba, mamão) ou foram aqui introduzidas (banana, carambola, nêspera, cítricos, manga, figo).

Como acontece com a maioria dos drosofilídeos, *Z. indianus* alimenta-se fundamentalmente de bactérias e leveduras que participam da fermentação de substratos ricos em carboidratos, especialmente frutos em decomposição. As substâncias voláteis que se originam durante o processo de fermentação destes substratos funcionam como principal atrativo para as moscas.

No Brasil, este drosofilídeo parece estar atingindo o *status* de praga na principal área produtora de figos do estado de São Paulo: foi perdida 50% da safra de figo de 1999 (Stein *et al.*, 2000) devido à ovoposição das moscas nos frutos tornando-os inadequados ao consumo humano. Por isso, no Brasil, esta espécie tem sido denominada de "mosca-do-figo". Fato semelhante foi descrito por Amoudi *et al.* (1991), os quais relataram um grande número de espécimes de *Z. indianus* infestando romãs (*Panica granatum*), na Arábia Saudita. Apesar deste fato, a espécie em questão não é considerada praga na sua região de origem. Como *Z. indianus* também foi encontrada em plantações de outros frutos tropicais, tais como cítricos, mamão e abacate (Stein *et al.*, 2000), a probabilidade desta espécie tornar-se praga também em cultura destes produtos agrícolas é alta. Isto significaria um enorme prejuízo para a economia pois a comercialização de frutos tropicais é de extrema importância para o mercado interno e externo brasileiro. Outra forma de impacto da invasão desta espécie nestes ambientes é decorrente de sua possível interferência no equilíbrio populacional das espécies nativas ou neles introduzidas anteriormente.

Para melhor se entender a dinâmica das populações de *Z. indianus* que estão colonizando novos ambientes, é importante realizar estudos que possibilitem caracterizar a variabilidade genética destas populações ao longo do tempo, como também as interações competitivas que possam se

estabelecer entre esta espécie e as que anteriormente ocupavam os ambientes por ela colonizados.

B. Interações Competitivas

Em uma revisão da teoria da Seleção Natural de Darwin, Crombie (1957, *apud* Taddei, 1973) destacou os seguintes argumentos relacionados à Luta pela Sobrevivência:

1) A taxa potencial de aumento do número de organismos é maior do que os recursos do meio ambiente podem suportar;

2) A extensão das condições físicas nas quais um dado organismo pode sobreviver, e o tipo de matéria que ele pode converter em substâncias de seu próprio tipo são limitados;

3) A incapacidade dos organismos para sobreviver ou para deixar descendentes pode ser devida a três fatores: (1) ação direta do ambiente físico, (2) presença de outros organismos além dos competidores e/ou (3) competição. Este último fator é definido como a procura, por mais que um organismo ao mesmo tempo, dos recursos do ambiente cujo suprimento imediato é limitado.

4) A competição entre os organismos é mais severa quanto mais semelhantes forem suas necessidades e hábitos;

5) A similaridade nas necessidades e hábitos, de uma maneira geral, é maior nos grupos taxônomicos mais próximos;

6) Quando novas formas aparecem em uma determinada localidade, seja por evolução das formas pré-existentes ou migração, elas eliminarão ou serão eliminadas pelas formas mais relacionadas, caso ocorra competição;

7) As várias formas adaptam-se aos seus habitats específicos e podem sobreviver juntas, quando cessa a competição entre elas neste habitat.

unesp

Desta forma, uma maneira de expressar o desempenho das espécies competidoras é referir-se ao desempenho de uma delas em relação ao de outras.

Em culturas mistas, é possível estudar-se diferentes parâmetros como forma de avaliar o desempenho de uma espécie quando em presença de outra, como também analisar a variabilidade genética das populações naturais. Dentre diversos parâmetros possíveis de serem estudados, destacam-se: o estado-de-ser-adaptado, isto é, a medida da capacidade de um genótipo para a sobrevivência e reprodução, em relação a de outros genótipos (Dobzhansky, 1970); a produtividade e o tamanho da população e a influência, sobre estes componentes, da quantidade de alimento, do espaço vital, da temperatura, da variabilidade genética inicial.

O tempo de desenvolvimento também é um dos componentes importantes do valor adaptativo, bem como a viabilidade dos embriões de uma espécie. Estes dois componentes são os mais freqüentemente analisados em estudos que envolvem competição (Gonzáles-Candelas *et al.*, 1990). Estes autores ressaltaram que estudos com competição de larvas têm enfocado principalmente o efeito desta interação ecológica na sobrevivência do indivíduo. Ohba (1961) notou diversas conseqüências da competição em *Drosophila*, tais como aumento na variabilidade da duração do período pré-adulto, decréscimo da viabilidade larval, aumento da variabilidade do tamanho das moscas que emergem e o decréscimo da viabilidade pupal.

Em uma série de experimentos com diferentes linhagens de *D. melanogaster*, Ménsua & Moya (1983) demonstraram que uma competição extrema leva a uma parada no desenvolvimento no terceiro estádio larval. Duas hipóteses poderiam explicar esta parada no desenvolvimento. A primeira propõe que os produtos de excreção das larvas (uréia e ácido

úrico, por exemplo) em altas concentrações poderiam inibir o desenvolvimento por afetarem o metabolismo. Embora nenhum resíduo larval tenha sido identificado como a causa do fenômeno que afeta a sobrevivência e o tempo de desenvolvimento, os efeitos dos resíduos larvais bióticos na viabilidade dos genótipos tanto em competição inter quanto intra-específica foram sugeridos na literatura especializada (Budnick & Brncic, 1975; Huang *et al.*, 1971; Palabost, 1973; Atkinson, 1979; Brncic, 1987; Hemmat & Eggleston, 1988; Amoudi *et al.*, 1993; Budnick *et al.*, 2001). Em todos eles, o efeito do meio condicionado por larvas de diferentes linhagens e espécies foi examinado. A segunda hipótese para explicar a parada de desenvolvimento em larvas é que a requisição dos recursos do meio pelas larvas o tornaria escasso em alguns nutrientes fundamentais para o desenvolvimento futuro dos indivíduos, tais como a deficiência em esteróis, que causaria a mortalidade de larvas do último estádio e de pupas (Bos, 1979).

Em drosofilídeos, tanto o tempo de desenvolvimento quanto a viabilidade ovo-adulto são alterados quando o desenvolvimento dos mesmos ocorre em um meio previamente utilizado por larvas da mesma espécie ou de diferentes espécies, procedimento este chamado de condicionamento do meio (Weisbrot, 1966; Dawood & Strickberger, 1969; Huang *et al.*, 1971; Budnick & Brncic, 1975; Hemmat & Eggleston, 1988; Budnick *et al.*, 2001) .

Budnick e seus colaboradores (1974, 1976, 1983, 2001) demonstraram, a partir de uma série de experimentos de condicionamento de meio, que entre espécies diferentes podem ser estabelecidas interações competitivas entre indivíduos pré-adultos com deterioração ou facilitação da viabilidade de uma ou de ambas as espécies. Estes efeitos podem ser decorrentes da restrição dos recursos nutricionais, ou ainda, da

contaminação do substrato por resíduos metabólicos durante o desenvolvimento larval.

A densidade populacional larval também é um fator competitivo importante. Em *Drosophila*, os aglomerados populacionais característicos de várias espécies deste gênero geralmente levam à redução no tamanho dos indivíduos, ao aumento no tempo de desenvolvimento e à redução na fecundidade (Ecônomos *et al.*, 1981; Mitrofanov & Brodskaya, 1976; Scheiring *et al.*, 1984; Brncic, 1987). Resultados semelhantes foram obtidos por Amoudi *et al.* (1993) em populações experimentais com diferentes densidades iniciais de larvas de *Z. indianus*. Os autores observaram que quanto maior o tamanho populacional de *Z. indianus*, maior é o tempo de desenvolvimento larva-adulto, menor é o percentual de sobreviventes e menor é o tamanho do corpo dos adultos. Estes autores concluíram que as alterações no tempo de desenvolvimento, sobrevivência e tamanho do corpo dos indivíduos estariam relacionadas, neste caso de competição intra-específica, tanto à redução na quantidade de recursos nutricionais disponíveis por larva quanto ao aumento de resíduos larvais, tais como ácido úrico e CO_2.

Competição intra-específica e interespecífica podem funcionar como fatores seletivos sobre a variabilidade genética das populações. Quanto maior for a variabilidade genética, maior é a probabilidade de se encontrar genótipos viáveis, ou que permitam a viabilidade do seu portador, em uma população. A variabilidade genética das espécies competidoras pode ser quantificada de diferentes formas, sendo uma delas a partir de marcadores de variabilidade, tais como as isoenzimas.

C. Polimorfismos Enzimáticos

Na definição original de Markert & Möller (1959), isoenzimas (ou isozimas) foram consideradas como "diferentes formas moleculares de

uma enzima numa espécie, que apresentam a mesma atividade catalítica". Essa multiplicidade de formas pode ser decorrente de mecanismos genéticos como, por exemplo, a duplicação gênica, ou mecanismos epigenéticos que incluem as modificações pós-traducionais a que as moléculas enzimáticas estão sujeitas após sua síntese. Em 1977, a Comissão de Nomenclatura Bioquímica da IUPAC - IUB (*International Union of Pure and Apllied Chemistry and International Union of Biochemistry*) propôs que o termo isoenzima, ou isozima, fosse restrito às formas moleculares múltiplas de uma enzima que compartilham as mesmas atividades catalíticas dentro de uma espécie, resultantes da presença de mais de um gene estrutural. Considerando esta definição as isoenzimas são:

1) Enzimas geneticamente independentes codificadas por genes diferentes. Um exemplo clássico deste tipo de isoenzima é o da aspartato transaminase citoplasmática e mitocondrial.
2) Diferentes heteropolímeros formados pela associação de pelo menos duas cadeias polipeptídicas não covalentemente ligadas. Exemplo deste tipo de isoenzima incluem as cinco formas diferentes da lactato desidrogenase em vertebrados que são formadas pela associações não-covalentes entre as cadeias A e B (A_4, A_3B, A_2B_2, AB_3, AB_1 e B_1). Em humanos, por exemplo, o gene para a cadeia A (ou H de *Heart*) localiza-se em um cromossomo, enquanto o gene para a cadeia B se localiza em outro.
3) Enzimas codificadas por alelos diferentes de um loco gênico (aleloenzimas). Esses alelos são geralmente codominantes, ambos se expressando no heterozigotos, o que permite relacionar os fenótipos bioquímicos observados a determinados genótipos. As aloenzimas são a base dos polimorfismos enzimáticos encontrados virtualmente em todas as espécies.



As formas enzimáticas diferentes, resultantes de modificações epigenéticas, incluem: 1) as originadas pela introdução ou substituição de grupos químicos nas moléculas; 2) proteólise diferencial de uma mesma cadeia polipeptídica; 3) multímeros diferentes de uma mesma enzima. Essas formas, originadas por modificações pós-traducionais, são também designadas de isoenzimas secundárias.

A importância do estudo das isoenzimas do ponto de vista evolutivo, bioquímico e fisiológico é ressaltada por diferentes aspectos. Primeiramente, formas moleculares múltiplas das enzimas são comuns em organismos, sendo que elas apresentam a mesma atividade catalítica, podendo, assim, desempenhar uma função específica no metabolismo, em harmonia com outras enzimas no contexto celular. Em seguida, freqüentemente as isoenzimas apresentam especificidade celular ou tecidual, e a heterogeneidade delas confere flexibilidade, versatilidade e precisão para os organismos em termos de função metabólica. Por último, a multiplicidade molecular é importante para a eficiência morfológica.

Em geral, as isoenzimas geneticamente independentes apresentam maiores diferenças nas suas propriedades bioquímicas e físico-químicas do que as variantes enzimáticas derivadas de um mesmo loco (Hopkinson, 1974).

As isoenzimas, portanto, apresentam diferentes padrões de mobilidade eletroforética, sendo que seus polimorfismos diferem entre populações e entre espécies que habitam diferentes ambientes (Somero, 1978).

Os polimorfismos de isoenzimas podem ser detectados a partir de eletroforese em gel e técnicas de detecção específicas baseadas no tipo de atividade catalítica das enzimas analisadas. Desta forma, as isoenzimas são evidenciadas em um gel sob a forma de bandas coradas. Cada banda corresponde a uma proteína diferente e a síntese de cada uma delas é

controlada por um ou vários genes. Os fenótipos enzimáticos podem ser interpretados em termos de genes e seus alelos. Para os geneticistas, estes genes codificadores de isoenzimas têm duas propriedades importantes: podem ser polimórficos e codominantes. A primeira propriedade indica que uma importante proporção destes genes apresentam-se sob duas ou mais formas descontínuas e simultâneas e a segunda indica que, em organismos heterozigotos, é possível a detecção de ambos os alelos que compõem o genótipo em estudo. Estas duas propriedades tornam as isoenzimas importantes marcadores da variabilidade genética em populações de diferentes tipos de organismos.

Existem vários estudos realizados com o intuito de se entender melhor os polimorfismos protéicos e isoenzimáticos. Muitos trabalhos com isoenzimas enfocaram membros da família Drosophilidae: *D. simulans* (Karotam *et al.*, 1995), *D. melanogaster* (Healy *et al.*, 1991; Parkash *et al.*, 1993), *D. buzzattii* (East, 1982; Barker, 1994), *D. mulleri* (Kambysellis *et al.*, 1968; Ceron, 1988), *D. antonietae* (Mateus, 2001), várias espécies do *cluster buzzatii* (Lapenta *et al.*, 1995), do complexo *mulleri* (Mateus, 1997) e subgrupo *saltans* (Nascimento & Bicudo, 2002), *Z. paravitteger* (=*Z. indianus*) (Kaur & Parkash, 1978; Kaur & Parkash, 1979; Badan *et al.*, 1980) e *Z. indianus* (Parkash *et al.*, 1994). Muitos destes estudos enfocaram polimorfismos de esterases.

As esterases são um grupo multifuncional e heterogêneo de isoenzimas que têm como característica comum a participação na hidrólise de ésteres e outros compostos. A classificação das esterases mais amplamente aceita baseia-se na sua sensibilidade a três grupos de inibidores da atividade enzimática (Holmes & Máster, 1967 *apud* Oakeshott *et al.*, 1993), incluindo os reagentes sulfidrílicos, por exemplo o para-cloromercúriobenzoato – pCMB, os organosfosforados(malathion, por exemplo) e carbamatos (como exemplo, o sulfato de eserina). Com

base no critério de sensibilidade a inibidores, quatro classes de esterases são diferenciadas:

1) *Acetilesterases*: não são afetadas por inibidores, e têm, geralmente, maior afinidade por substratos alifáticos envolvendo derivados do ácido acético.

2) *Arilesterases*: são inibidas por reagentes sulfidrílicos e atuam preferencialmente sobre substratos aromáticos.

3) *Carboxilesterases*: são inibidas por organofosforados e sua maior afinidade é por ésteres alifáticos, geralmente ácidos de cadeia longa.

4) *Colinesterases*: são inibidas por organofosforados e carbamatos e atuam preferencialmente sobre substratos como ésteres de colina (acetilcolinesterases) e outros ésteres alifáticos (pseudocolinesterases).

Em insetos, estas enzimas estão relacionadas a diversos processos metabólicos, tais como digestão de alimentos, degradação de inseticidas organofosforados e carbamatos, além da degradação de ferormônios e do hormônio juvenil (Spackman *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1999; Rauschenbach *et al.*, 1994) e à atividade sexual (Richmond & Senior, 1991).

O padrão de bandas e a atividade das esterases em diferentes populações e espécies são bastante variáveis. *D. melanogaster*, por exemplo, apresenta uma esterase, conhecida como EST-6, relacionada à atividade do ducto ejaculatório em machos adultos (Mane *et al.*, 1983). Por outro lado, *D. pseudoobscura* produz uma esterase, a EST-5, homóloga a EST-6, que desempenha importante papel na hemolinfa de adultos de ambos sexos (Brady & Richmond, 1990). Em *Z. indianus*, Parkash & Yadav (1993) encontraram um alto grau de polimorfismo para esterases em populações indianas deste drosofilídeo e constataram a existência de pelo menos sete locos codificadores de esterases nessas populações, as quais foram denominadas EST-1 e EST-2, classificadas como β-esterases; EST-3, EST-4,



EST-5, EST-6 e EST-7, classificadas como α-esterases. As freqüências dos alelos nesses locos, quando comparados com a latitude analisada, constituíam uma clina, sugerindo que uma pressão seletiva poderia estar atuando na distribuição destes polimorfismos.

Kaur & Parkash (1979) encontraram, em seus estudos sobre ontogenia das esterases em *Z. paravittiger* (=*Z. indianus*) diferenças no padrão de bandas esterásicas apresentadas pelos indivíduos analisados conforme o estágio de desenvolvimento em que ele se encontrava. Estes mesmos autores, em 1978, já haviam mostrado variação na expressão das esterases, mas em tecidos larvais de *Z. paravittiger* (=*Z. indianus*). Estes dois trabalhos, em conjunto com o trabalho de Brady & Richmond (1990) sob a expressão de EST-6 em macho de *D. melanogaster*, indicam que as esterases podem ter expressão diferencial conforme a idade e o sexo do indivíduo, bem como no tecido no qual é expressa.

A despeito de sua abundância em comunidades tropicais, as espécies do gênero *Zaprionus* têm sido pouco estudadas (Karan *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2000). Poucos dados sobre a biologia de *Z. indianus* estão disponíveis na literatura, e se referem exclusivamente a populações indianas (Kaur & Parkash, 1978; Kaur & Parkash, 1979; Badam *et al.*, 1980; Parkash, 1980; Yadav & Parkash, 1993a; Parkash & Yadav, 1993b; Parkash & Sharma, 1993) e da Arábia Saudita (Amoudi *et al.*, 1993). Da linhagem ou linhagens que colonizaram o Brasil, nada ainda foi publicado, exceto os trabalhos de Vilela (1999), primeiro registro sobre *Z. indianus* na América do Sul, e Stein *et al.* [*on line*], que discutiram, além de características gerais sobre a biologia e ecologia da mosca-do-figo, a infestação e prejuízos causados por *Z. indianus* em plantações de figo, no ano 2000. Além disso, os possíveis impactos desta espécie sobre as comunidades de drosofilídeos por ela invadidas ainda não foram estudados.



II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

Tendo em vista que *Zaprionus indianus* é uma espécie recém-introduzida e tem mostrado uma grande velocidade de dispersão, é de imprescindível importância ter-se um conhecimento detalhado da biologia desta espécie invasora, do grau de variabilidade genética e da estrutura genética de suas populações, bem como de suas interrelações com drosofilídeos nativos. Deste modo, este estudo teve os seguintes objetivos:

1) caracterizar as esterases encontradas nos indivíduos da população estudada;
2) analisar a variabilidade genética de uma população de *Z. indianus* por meio de variantes eletroforéticas nos locos de esterases, bem como a evolução desta população em um período em relação ao polimorfismo observado;
3) conhecer a influência do metabolismo e da competição larval na viabilidade e no tempo de desenvolvimento a partir de condicionamento de meio de cultura com larvas de *Zaprionus* e da espécie de *Drosophila* mais freqüente em estações úmidas com temperaturas altas e seca com temperaturas mais amenas;
4) verificar, a partir dos adultos obtidos em meio condicionado, se o polimorfismo de algum loco esterásico está associado à sobrevivência e velocidade de desenvolvimento diferencial.

As informações produzidas por este estudo poderão contribuir para com o entendimento da evolução desse drosofilídeo nos ambientes colonizados.

III. MATERIAL E MÉTODOS

unesp

III. MATERIAL E MÉTODOS

A. Material Biológico

No presente estudo foram utilizadas a espécie *Z. indianus* e duas espécies de *Drosophila*, *D. sturtevanti*, e *D. simulans*, provenientes, respectivamente, de coletas realizadas em período úmido e seco, na localidade denominada Chácara do Cristais, município de Mirassol (SP), localizada a 49°30'W e 20°47'S.

As coletas foram efetuadas em meses com clima caracteristicamente úmido (Outubro de 2001, Janeiro, Novembro e Dezembro de 2002) e em meses com clima caracteristicamente seco (Abril, Junho e Agosto de 2002), na região estudada, sendo utilizadas, em cada uma das coletas, cinco armadilhas contendo isca de banana e fermento biológico (*Fleishmann*). Estas armadilhas foram colocadas a cerca de 1,70m do chão, dentro de uma área com plantação de frutas, tais como laranjeiras, limoeiros, jaboticabeiras, mangueiras, entre outras.

B. Metodologia

1. Caracterização das Esterases

Para a obtenção das amostras, indivíduos de *Z. indianus* foram macerados individualmente em tubos *eppendorf* contendo 15μL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M, pH 8,8) a 0°C e centrifugados a 3000 rpm, por aproximadamente três minutos.

De cada uma das amostras foram utilizados 10μL do sobrenadante, para a detecção das esterases, que foram aplicados em gel de poliacrilamida, preparado segundo o seguinte protocolo desenvolvido por Ceron (1988): em 8,0 mL de solução acrilamida/bisacrilamida 30,8% (C = 5%) foram acrescentados 6,0 mL de Tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 e 10,5 mL de água destilada. Feito isto, acrescentou-se, nesta ordem, 0,5 mL de

solução de persulfato de amônia a 10% e 15μL de TEMED (N, N, N, N, tetrametilenodiamina). Após a introdução do TEMED, a solução foi transferida para placas de vidro que foram posteriormente vedadas com vaselina sólida. Após a polimerização da solução, as placas foram presas em cuba de acrílico para eletroforese vertical e então as amostras foram aplicadas. Feito isto, os géis foram submetidos à eletroforese, por aproximadamente cinco horas, com voltagem constante de 200V, em Tampão de Corrida Tris-Glicina 0,1M, pH8,3. Após a corrida, os géis foram submetidos a técnicas de detecção para esterases.

Para a detecção das esterases, os géis foram pré-incubados por 30 minutos em 50 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,2. Transcorrido este tempo, o tampão foi retirado sendo acrescentada uma solução de coloração contendo 60 mg de α-naftilacetato e 50 mg de β-naftilacetato (dissolvidos em 1 mL de acetona), 120 mg de *Fast Blue RR* (dissolvidos em 10,0mL de N-propanol) e 100 mL de Tampão Fosfato 0,1M pH6,2. Os géis foram incubados nesta solução corante, em agitação constante e na ausência de luz, por 30 minutos. A atividade das esterases sobre o α ou o β naftilacetatos produz α ou β naftol, que são complexados pelo *Fast Blue RR* formando produtos insolúveis, podendo ser identificados como bandas pretas (α-esterases) e vermelhas (β-esterases) nos géis.

Após a detecção, os géis foram tratados por 24 horas com solução descorante (etanol-ácido acético) e então secados pelo método de Ceron *et al.* (1992): prensa-se o gel, previamente banhado em solução de gelatina comercial a 5%, entre duas folhas de papel celofane, deixando-se secar à temperatura ambiente por um ou dois dias. Os géis desidratam, transformando-se em uma fina película entre as folhas de celofane, facilitando, assim, a posterior análise dos mesmos.

Para melhor se compreender e caracterizar os locos esterásicos analisados, foram realizados estudos envolvendo a determinação do peso molecular, utilização de inibidores, cruzamentos e análise de indivíduos de diferentes idades, entre outros.

a. Determinação do peso molecular

A determinação do peso molecular (P.M.) das esterases de quatro dos cinco locos encontrados na população de *Z. indianus* estudada neste trabalho foi realizada pelo método descrito por Hedrick & Smith (1968) e modificado por Poletti *et al.* (1997). Foram feitos seis géis com concentrações de 6, 8, 9, 10, 11 e 12%, todos com 5% de ligações cruzadas. Foram aplicadas, nestes géis, amostras de um macho e uma fêmea de *D. melanogaster*, um macho e uma fêmea de *Z. indianus* e 15µL de padrões de Peso Molecular *BenchMark Prestained Protein Ladder* (*Gibco*). Essas amostras e os padrões foram submetidos a eletroforese a 200V por três horas e 30 minutos. Após os procedimentos para a detecção das esterases, os valores, em centímetros, da migração relativa (Rm) das proteínas foram obtidos a partir da distância de migração das bandas esterásicas de interesse e dos padrões de peso molecular em relação ao ponto de origem da aplicação das amostras. Como as Rms das proteínas variam exponencialmente em função da concentração do gel, para cada proteína, ao se plotar o logaritmo de Rm *versus* a concentração do gel, obtém-se uma linha reta que tem relação com o peso molecular dessa proteína. Esta reta possui uma inclinação negativa que pode ser utilizada para se inferir o valor do peso molecular da proteína, comparando-se com as proteínas padrões submetidas aos mesmos tratamentos. Como o que importa é o valor absoluto da inclinação, todos os valores foram multiplicados por -1, obtendo-se, assim, valores positivos para os pesos moleculares encontrados.



Para cada proteína padrão obteve-se uma reta, relacionando-se seu Rm com as várias concentrações dos géis. As inclinações dessas retas foram então utilizadas para se construir um gráfico relacionando-as com os pesos moleculares das proteínas padrões, o que gerou uma reta expressa pela equação Y = A + BX, obtida com o programa MICROCAL ORIGIN versão 3.5 (*Scientific and Thechnical Graphics in Windows - Copyright © 1991-1994 Microcal Software, Inc.*). Esta equação foi então utilizada para se determinar os valores dos pesos moleculares das esterases de *Z. indianus*.

b. Resposta a inibidores

Uma caracterização mais detalhada das esterases de *Z. indianus* foi realizada utilizando-se os inibidores de atividade enzimática, malathion, sulfato de eserina e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), em adultos com cinco dias. Como controle, foram utilizados adultos de cinco dias de *D. melanogaster*. Cada um desses inibidores foi utilizado na concentração de 1mM, o qual foi adicionado ao tampão de pré-incubação e solução corante.

c. Determinação do padrão de herança

Para se determinar o padrão de herança do loco esterásico 2 (Est-2) encontrado na população de *Z. indianus* analisada, foram realizados cruzamentos entre os descendentes de fêmeas recém-coletadas e posteriormente foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida (10%; C = 5%) e técnicas para detecção de esterases.

d. Identificação de atividade esterásica tecido-específica

Objetivando-se localizar a expressão do loco esterásico 1 (Est-1) de *Z. indianus*, foram preparadas amostras, por sexo, contendo aparelhos reprodutores de cinco indivíduos e, como controle, foram usadas as

cabeças destes indivíduos. Estas amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida e posterior detecção das esterases, comparando-se cada um dos padrões de banda obtidos.

e. Identificação de atividade esterásica idade-específica e relacionada à atividade sexual.

Com o intuito de se verificar a expressão diferencial relacionada à idade ou a atividade sexual do loco Est-1, indivíduos de ambos os sexos de *Z. indianus* foram envelhecidos por 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias. Estes indivíduos foram agrupados em dois blocos: *Expostos ao sexo oposto* (A) e *Não-Expostos ao Sexo Oposto* (B). Os indivíduos do bloco A foram mantidos por um dia, aos casais, em tubo de vidro contendo meio-de-cultura banana-ágar. Após este período, cada indivíduo foi congelado a -20ºC e mantido sob esta temperatura até a análise eletroforética das esterases. O bloco B foi constituído por moscas virgens, mantida à mesma temperatura pelo mesmo período.

Um terceiro bloco contendo fêmeas virgens de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias foi preparado com o intuito de verificar-se a transferência de esterases de machos para fêmeas via cópula, imediatamente após o término da atividade sexual. Cada uma dessas fêmeas foi exposta a um macho e, ao término da cópula, retirava-se a fêmea e a congelava (-20ºC) até o momento da análise eletroforética.

2. Variação Temporal das Esterases do Loco Est-2.

Os indivíduos de *Z. indianus* que foram utilizados para esta análise foram provenientes de seis coletas realizadas em quatro meses úmidos (Outubro de 2001, Janeiro, Novembro e Dezembro de 2002) e dois meses secos (Junho e Agosto de 2002). Uma amostra de cada uma destas coletas foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida e posterior detecção

de esterases para avaliação da variabilidade genética apresentada pelo loco Est-2. Nesta tabela também estão indicados os índices pluviométricos referentes aos meses de coletas.

Os resultados observados foram analisados estatisticamente por coleta com auxílio do programa TFPGA (Miller, 1997), com o qual foram efetuados a estatística descritiva (freqüências alélicas e genotípicas), a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, a análise de UPGMA (Swofford & Olsen, 1990) e o teste exato para a verificação da diferenciação da população (Raymond & Rousset, 1995).

Além disso, as coletas foram agrupadas de dois em dois meses, constituindo três blocos caracterizados pelo tipo de clima: *Úmido 1* (Outubro de 2001 e Janeiro de 2002 = 202 indivíduos), *Seco* (Junho de 2002 e Agosto de 2002 = 159 indivíduos) e *Úmido 2* (Novembro de 2002 e Dezembro de 2002 = 203 indivíduos) e as análises estatísticas foram realizadas conforme descrito para as coletas.

3. Interações Competitivas Pré-Adultas

a. Determinação da espécie de *Drosophila* mais freqüente na estação úmida e na estação seca.

Para definir-se quais espécies de *Drosophila* seriam utilizadas como competidoras de *Z. indianus* nos experimentos com condicionamento de meio de cultura, foram identificadas as espécies obtidas nas cinco coletas, duas em período úmido (Outubro/2001 e Janeiro/2002) e duas em período seco (Abril/2002 e Junho/2002). A espécie de *Drosophila* mais freqüente, considerando as duas coletas de cada estação, foi utilizada para se fundar o estoque do qual foram retiradas as larvas utilizadas no experimento de competição em meio condicionado.

b. Competição em meio condicionado

Para obtenção das larvas que foram utilizadas no experimento de competição em meio-condicionado, primeiramente foram fundados, em garrafas de 250 mL contendo meio de cultura à base de banana-ágar, três estoques: um de *Z. indianus* (A), um de *D. sturtevanti* (B) e um de *D. simulans* (C), as duas últimas foram as espécies mais freqüentes nos períodos úmido e seco, respectivamente. A manutenção e ampliação destes estoques foi realizada em garrafas de 250mL contendo meio de cultura à base de banana-ágar, mantidas à temperatura constante de 25ºC, com repiques a cada 10 dias.

Após obter-se a descendência e ampliação do estoque de cada espécie (A, B e C), os adultos foram coletados e mantidos por um dia, para que as fêmeas pudessem ovopositar, em garrafas de 250 mL contendo meio de cultura à base de banana-ágar e então descartados. Após três dias, foram realizadas coletas das larvas diretamente das garrafas. Em seguida, 5mL de meio de cultura contido em tubos de vidro de 15 mL foi condicionado com a deposição de 30 larvas. Depois da deposição das larvas para condicionamento do meio, cada bloco foi mantido em câmara de 25ºC durante cinco dias. Passado este período, os tubos foram congelados a -20ºC por seis horas, para que as larvas neles contidas fossem mortas. Logo em seguida, foram levados para uma câmara de 25º C, lá ficando por 24 horas. A seguir, em cada um dos tubos foram adicionadas as larvas da espécie alvo do estudo de competição: 20 larvas de *Z. indianus* (Bloco I e III) ou 20 larvas de *D. sturtevanti* (Bloco II) ou 20 larvas de *D. simulans* (Bloco IV). Registrou-se, desses indivíduos, o tempo de desenvolvimento larva-imago e a viabilidade larva-imago em cada um dos tubos que compuseram os blocos experimentais.

Cada bloco experimental foi constituído por quatro tubos com as seguintes características: o Tubo 1 não foi condicionado (Tubo Controle), o

Tubo 2 foi condicionado por 30 larvas da espécie-alvo (competição intra-específica), o Tubo 3 foi condicionado por 30 larvas da espécie competidora (competição interespecífica) e o Tubo 4 foi condicionado com 15 larvas da espécie-alvo e 15 larvas da espécie competidora (competição inter e intra-específica). Cada um dos tubos teve 10 réplicas, para cada um dos quatro blocos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das espécies em cada um dos blocos experimentais da competição em meio condicionado. sp = espécie; *Zap* = Z. indianus; *st* = *D. sturtevanti*; *sm* = *D. simulans*.

		Tubos e espécies condicionadoras			
Bloco	sp-alvo	1	2	3	4
I	*Zap*	--	*Zap*	*st*	*Zap* + *st*
II	*st*	--	*st*	*Zap*	*st* + *Zap*
III	*Zap*	--	*Zap*	*sm*	*Zap* + *sm*
IV	*sm*	--	*sm*	*Zap*	*sm* + *Zap*

Os efeitos do condicionamento do meio na viabilidade e no tempo de desenvolvimento de cada uma das espécies e entre elas foi avaliado pelo teste de ANOVA e, caso a diferença fosse significante, realizou-se o teste de Tukey com taxa de erro de 5%.

c. Análise dos polimorfismos enzimáticos nos competidores viáveis

A partir dos adultos produzidos nos estudos de competição em meio condicionado, foram separados 15 machos e 15 fêmeas de cada um dos blocos experimentais para serem analisados quanto aos polimorfismos de esterases. Para a análise estatística, foram utilizados os mesmos testes descritos em 2, exceto a análise de UPGMA.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

I. Caracterização das Esterases

A Figura 1 apresenta um gel de poliacrilamida a 10% (C = 5,0%) que ilustra o padrão de bandas com atividade esterásica na população de *Z. indianus* estudada. Bandas esterásicas que apresentam as mesmas características bioquímicas e ocupam, no gel, uma mesma região, podem ser interpretadas como enzimas produzidas por um mesmo loco gênico. Desta forma, a população de *Z. indianus* estudada apresentou cinco locos esterásicos diferentes: Est-1, Est-2, Est-3, Est-4 e Est-5.

Cada loco, dependendo da disposição, no gel, das bandas que representam seus alelos, recebeu uma denominação específica, conforme pode ser notado no zimograma apresentado na Figura 2. As enzimas provenientes dos locos Est-1 e Est-4 mostraram maior afinidade pelo β-naftilacetato, o que pode ser notado pela produção de bandas vermelhas, sendo então caracterizadas como β-esterases, enquanto que as esterases dos locos Est-2, Est-3 e Est-5 pelo α-naftilacetato, produzindo bandas negras e sendo assim classificadas como α-esterases.

Um padrão único de bandas, ou monomorfismo, foi encontrado para as enzimas dos locos Est-3, Est-4 e Est-5. Por outro lado, um padrão polimórfico de bandas foi observado para os produtos dos locos Est-1 e Est-2, sendo que para Est-1, duas bandas foram encontradas e para Est-2, quatro. Cada banda recebeu, como denominação dependendo da sua posição no gel, um número que também representa o alelo responsável pela síntese da esterase. Desta forma, quanto mais próxima ao ânodo a banda se localiza, menor é o número que denomina o alelo. Assim, para o loco Est-1 foram identificados os alelos *1* e *2*, enquanto que o loco Est-2 apresentou os alelos *1, 2, 3* e *4*, conforme pode ser observado nas Figuras 1 e 2.

Os dois locos polimórficos, Est-1 e Est-2, apresentaram enzimas monoméricas, que são caracterizadas, em eletroforese em gel, por heterozigotos apresentando padrão de duas bandas (Figuras 1 e 2).

Um dos géis analisados para a estimativa dos pesos moleculares para as esterases de *D. melanogaster* e *Z. indianus* está ilustrado na Figura 3. Os valores de peso molecular de cada uma das esterases analisadas foram obtidos a partir da relação entre os valores de inclinação de cada uma das aloenzimas e o gráfico construído a partir das inclinações dos padrões de peso molecular (Figura 4). Os valores estimados variaram entre 159,3 $\pm$ 10,7 KDa, para a EST-5, e 41,8 $\pm$ 5,3 KDa, para a EST-1. EST-4 e EST-2 apresentaram pesos moleculares 126,5 $\pm$ 7,6 KDa e 56,8 $\pm$ 3,1 KDa, respectivamente. Os valores de peso molecular obtidos para *D. melanogaster* foram 89,08 $\pm$ 2,74 KDa, para EST-6, e 159,57 $\pm$ 5,73 KDa, para a Acetilcolinesterase (AChE). Estes valores são condizentes com os valores sugeridos pela migração destes peptídeos, quando comparados aos padrões de peso molecular.

Em relação aos inibidores utilizados, as esterases de *Z. indianus* apresentaram diferentes padrões de resposta, conforme pode ser observado na Figura 5 e na Tabela 2. Para comparação, foram submetidas aos mesmos inibidores amostras de *D. melanogaster*. As esterases de *Z. indianus* apresentaram graus variáveis de inibição e EST-6 e AChE de *D. melanogaster* apresentaram inibição praticamente total pelo malathion. Porém, as esterases do loco Est-2 foram totalmente inibidas pelo PMSF, enquanto as demais e a EST-6 e AChE de *D. melanogaster* não apresentaram inibição. O sulfato de eserina, por sua vez, não inibiu as esterases dos locos Est-1, Est-2 e Est-4 de *Z. indianus* nem a EST-6 de *D. melanogaster*, porém a EST-5 de *Z. indianus* e a AChE de *D. melanogaster* foi fortemente inibida por este sulfato.

Para se verificar o padrão de herança do loco Est-2 de *Z. indianus* e constatar se ele se tratava realmente de um único loco, foram realizados diversos cruzamentos. Os cruzamentos realizados apresentaram descendência com as mesmas bandas que a linhagem parental e distribuição do padrão destas bandas conforme esperado pela 1ª lei de Mendel. A Figura 6 ilustra esta afirmação, apresentando dois cruzamentos distintos: o primeiro, cujo genótipo paterno foi *2 4* e materno *1 1*, apresentou quatro descendentes com genótipo 1 2 e seis com genótipo *1 4* (Figura 6A), enquanto o segundo, cujo genótipo paterno foi pai *2 4* e materno, produziu uma prole com sete indivíduos 1 2, um indivíduo *1 4*, quatro indivíduos *2 2* e um indivíduo *2 4* (Figura 6B).

Ao contrário do loco Est-2, em que a expressão dos alelos é independente do sexo, as esterases provenientes do loco Est-1 são expressas exclusivamente em machos (Figura 7), sendo que sua produção está relacionada à tecidos do aparelho reprodutor. No aparelho reprodutor feminino não foi detectada produção destas enzimas (Figura 8). O loco Est-1 também apresentou expressão significantemente maior em machos a partir do 3º dia de emergência (Figuras 9A e 9B). Machos virgens (Figura 9A) apresentaram bandas mais intensas para o loco Est-1 do que machos que foram expostos a indivíduos do sexo oposto por 24 horas (Figura 9B). Algumas fêmeas expostas a machos por 24 horas (Figura 9D) apresentaram marcação fraca para EST-1, o que não ocorreu com nenhuma das fêmeas virgens (Figura 9C). Contudo, todas as fêmeas, exceto uma, que foram congeladas imediatamente após a cópula apresentaram bandas pouco densas na posição EST-1 (Figura 10).

O loco Est-5 apresentou maior expressão quanto maior era a idade do indivíduo (Figuras 9A, B, C e D), independente do sexo, e a enzima EST-5 foi detectada na cabeça dos indivíduos analisados (Figura 8). Por outro lado, conforme pode ser observado nas Figuras 7, 8 e 9A a

9D, as enzimas do loco Est-4 foram mais expressas em machos, apesar de não serem exclusivas deste sexo. Elas também foram mais expressas quanto maior a idade do indivíduo (Figuras 9A a 9D), sendo inclusive detectada em aparelhos reprodutores masculinos e femininos (Figura 8).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

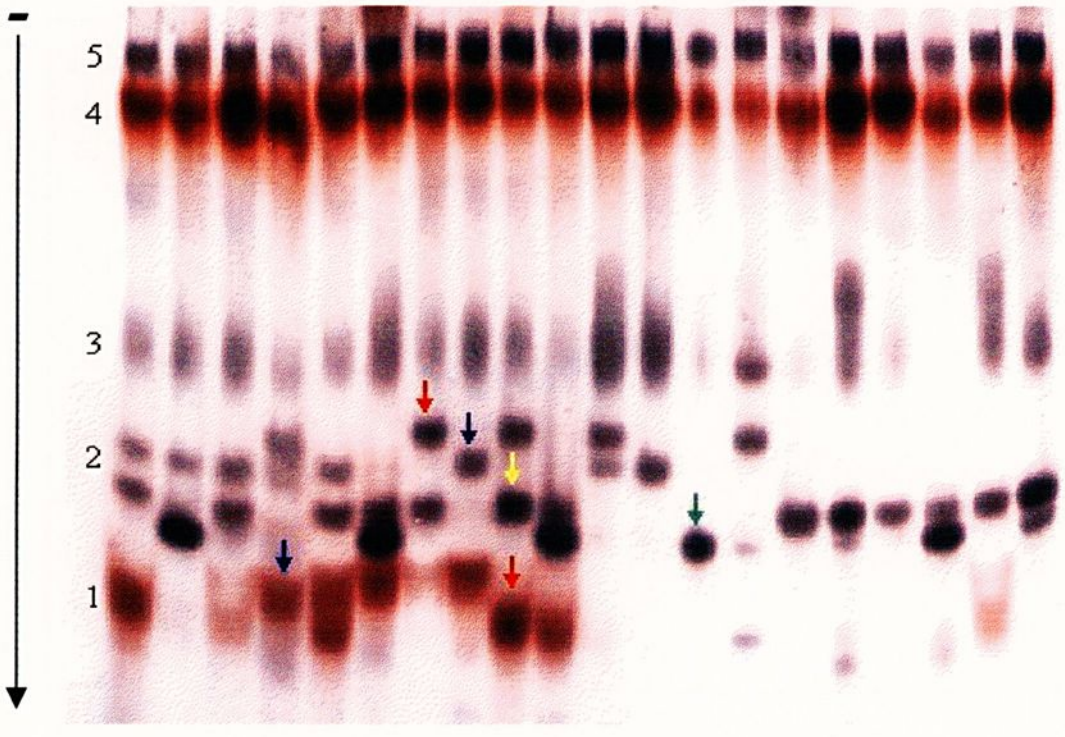


Figura 1. Padrão de esterases em gel de poliacrilamida a 10% (C = 5%) em *Z. indianus*: **1**. Est-1, dois alelos (seta azul, *1*; seta vermelha, *2*); **2**. Est-2, quatro alelos (seta vermelha, *1*; seta azul, *2*; seta amarela, *3*; e seta verde, *4*); **3.** Est- 3, um alelo; **4.** Est-4, um alelo; e **5.** Est-5, um alelo.

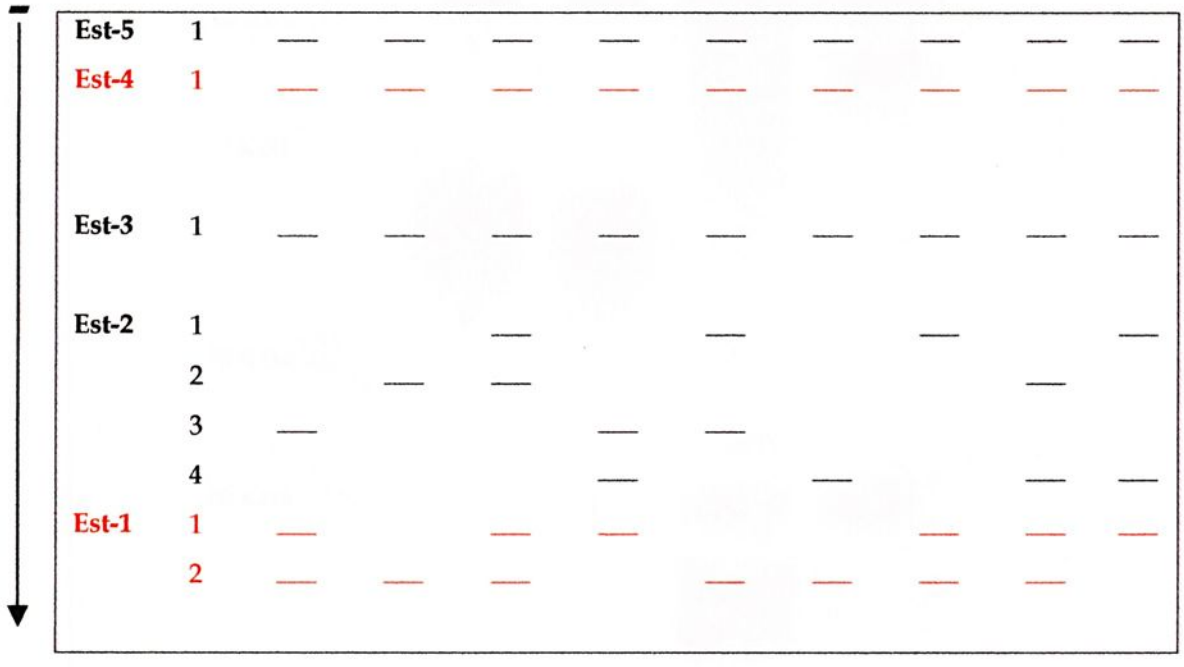


Figura 2. Zimograma representando o padrão de esterases encontrado em *Z. indianus*. Est-1, dois alelos; Est-2, quatro alelos; Est- 3, um alelo; Est-4, um alelo; Est-5, um alelo.

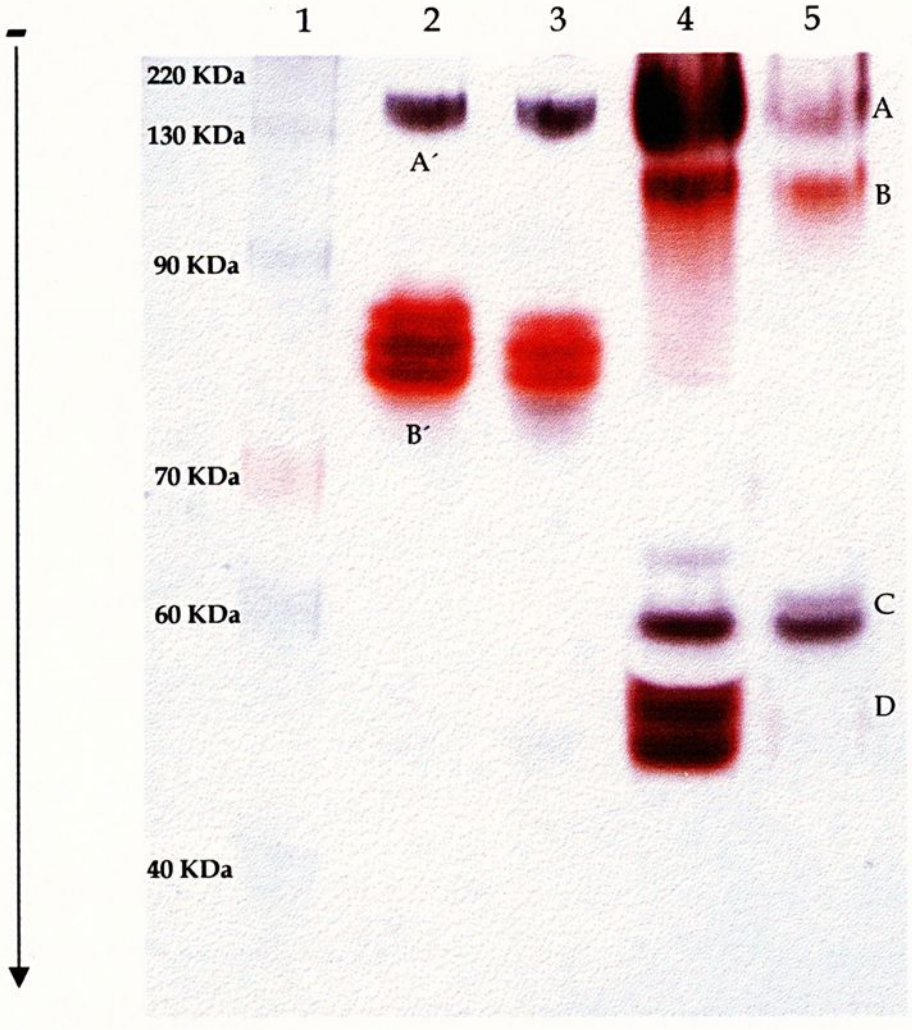


Figura 3. Determinação do peso molecular de esterases de adultos de *Z. indianus* em gel de poliacrilamida a 10% (C = 5%). **1.** Padrões de peso molecular (*BenchMark Prestaine Protein ladder,* 10-220KDa); **2.** Macho de *D. melanogaster*; **3.** Fêmea de *D. melanogaster*; **4.** Macho de *Z indianus;* **5.** Fêmea de *Z. indianus.* **A´** = AChE; **B´** = EST-6; **A** = EST-5; **B** = EST-4; **C** = EST-2 e **D** = EST-1.

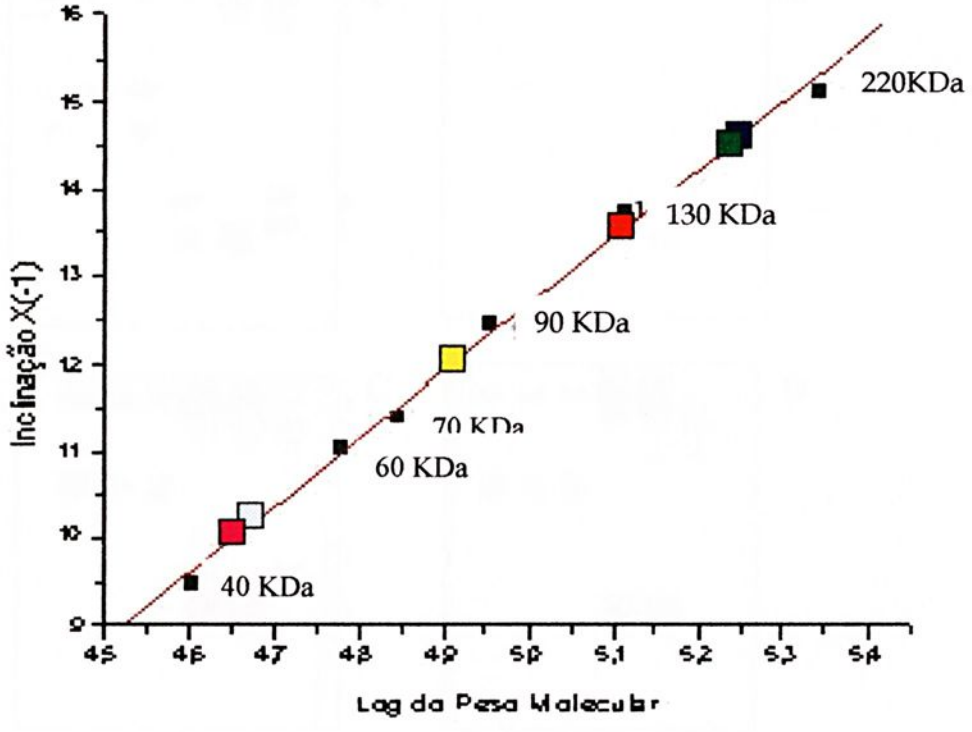


Figura 4. Regressão linear entre as inclinações das retas obtidas para cada um dos padrões de peso molecular submetidos a eletroforese em géis de poliacrilamida com diferentes concentrações. (Quadrados pretos: padrões de peso-molecular; azul –escuro: EST-5 de *Z. indianus*; verde: AChE de *D. melanogaster*; vermelho: EST-4 de *Z. indianus*; amarelo: EST-6 de *D. melanogaster*; azul-claro: EST-2 de *Z. indianus* e rosa: EST-1 de *Z. indianus*).

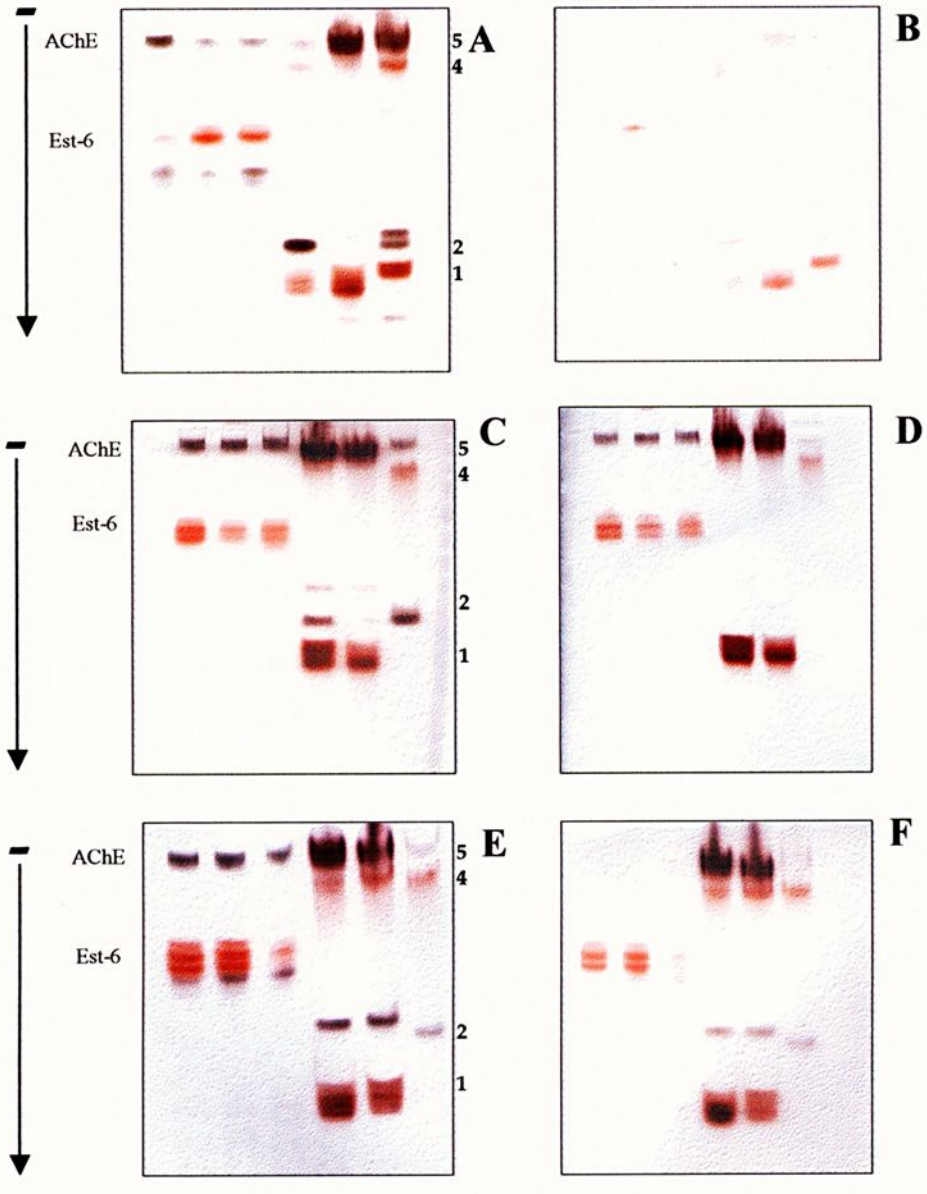


Figura 5. Atividade esterásica na presença dos inibidores malathion (B), PMSF (D) e Sulfato de Eserina (F) e seus respectivos controles (A, C e E) em gel de poliacrilamida a 10%. Em cada figura, os três primeiros indivíduos são da espécie *D. melanogaster* e os três últimos são indivíduos de *Z. indianus*. 1) Est-1; 2) Est-2; 4) Est-4; 5) Est-5 de *Z. idianus*.

Tabela 2. Atividade de α e β-esterases em *D. melanogaster* e *Z. indianus* na presença de diferentes inibidores.

Espécie	Enzima	Malathion	PMSF	Eserina
D. melanogaster	AChE	+ + +	-	+ + +
	EST-6	+ +	-	-
Z. indianus	EST-5	+ +	-	+
	EST-4	+ + +	-	-
	EST-2	+ +	+++	-
	EST-1	+	-	-

+ + + = Inibição Total

+ + = Inibição Parcial

+ = Inibição Fraca

- = Não afetada

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

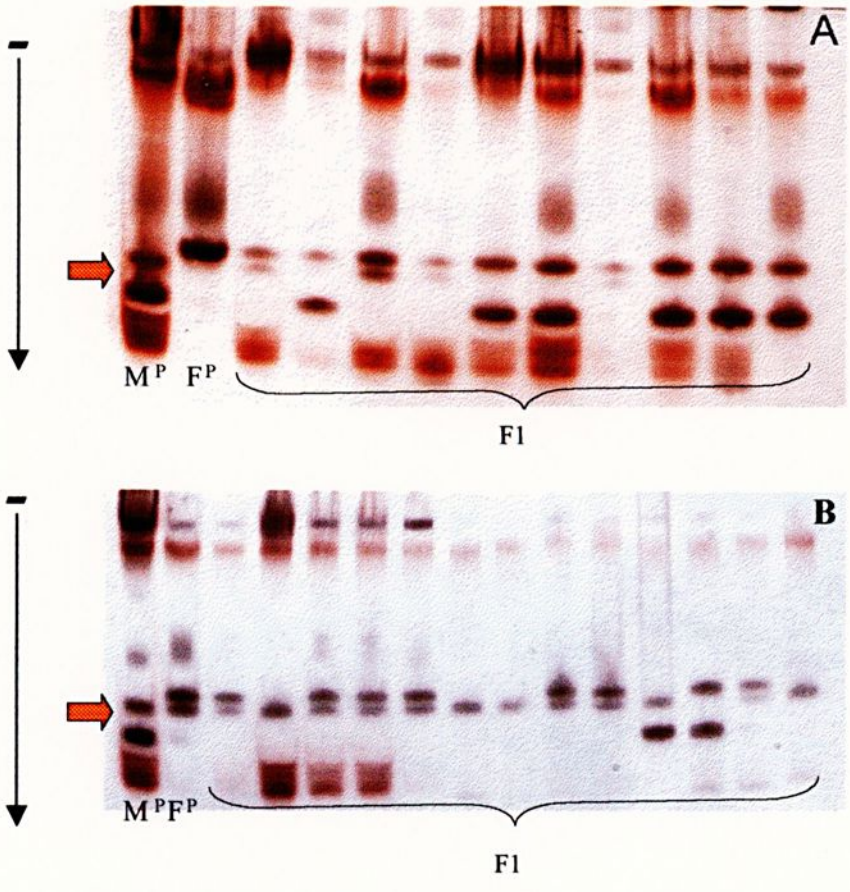


Figura 6. Comparação entre o padrão de bandas da esterase EST-2 de linhagem parental (M^P= Macho e F^P= Fêmea) e seus descendentes (F1). A seta vermelha indica o loco Est-2, analisado neste estudo. A) Pai heterozigoto para os alelos *2* e *4* e mãe homozigota para o alelo *1*, com descendentes portadores dos fenótipos *1 2* e *1 4*; B) Pai heterozigoto para os alelos *2* e *4* e mãe heterozigota para os alelos *1* e *2*, e F1 portadora dos fenótipos *1 2*, *1 4*, *2 2* e *2 4*.

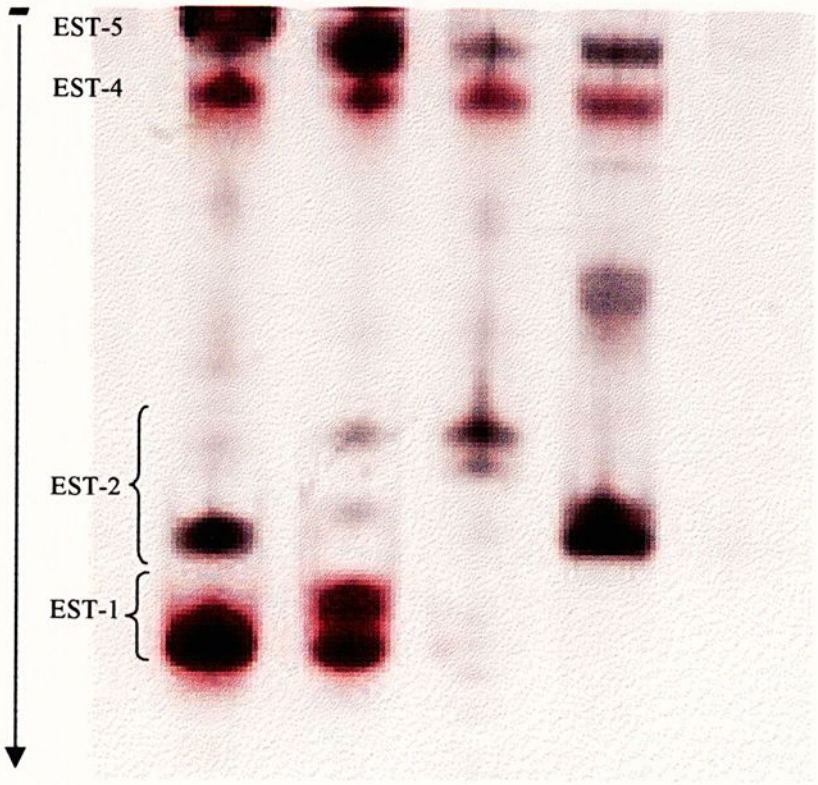


Figura 7. Expressão diferencial do loco Est-1 em machos e ausência de expressão em fêmeas em gel de poliacrilamida 10% (C = 5%) corado para esterases contendo, da esquerda para direita, dois machos e duas fêmeas de *Z. indianus.*

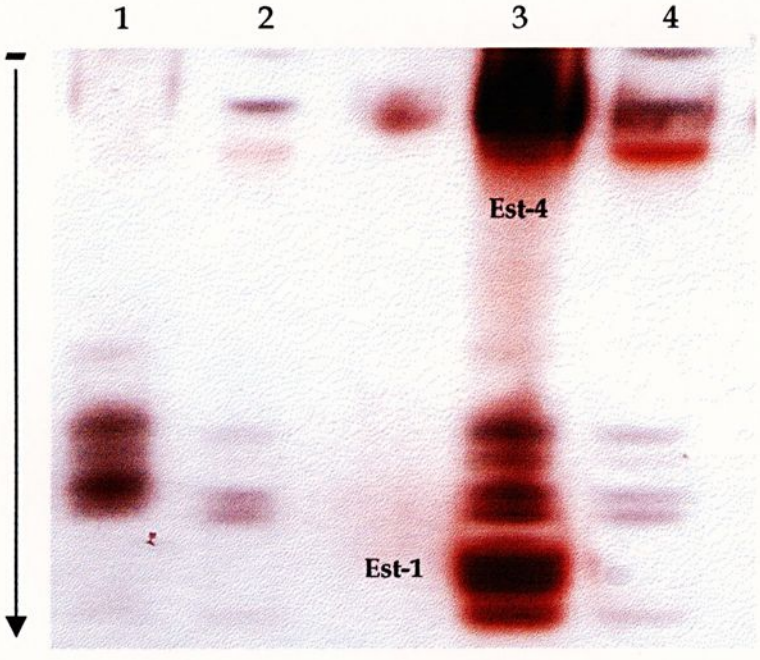


Figura 8. Expressão esterásica tecido-específica das esterases dos locos Est-1 e Est-4 em *Z. indianus* em gel de poliacrilamida a 10% (C = 5%). (**1**) cinco aparelhos reprodutores e (**2**) as respectivas cabeças de fêmeas e (**3**) cinco aparelhos reprodutores e (**4**) as respectivas cabeças de machos de *Z. indianus*.

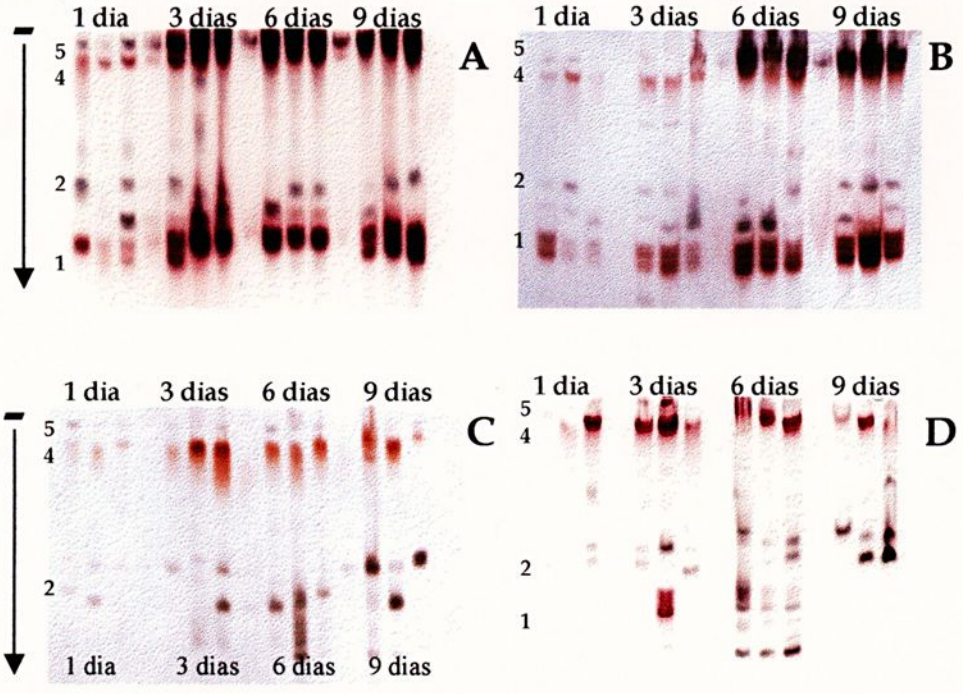


Figura 9. Expressão esterásica idade-específica em adultos de *Z. indianus* de 1 a 9 dias de idade em gel de poliacrilamida a 10% (C = 5%): **A.** Machos virgens de 1, 3, 6 e 9 dias; **B.** Machos de 1, 3, 6 e 9 dias expostos a fêmeas; **C.** Fêmeas virgens; de 1, 3, 6 e 9 dias **D.** Fêmeas de 1, 3, 6 e 9 dias expostas a machos. 1) Est-1; 2) Est-2; 4) Est-4 e 5) Est-5.

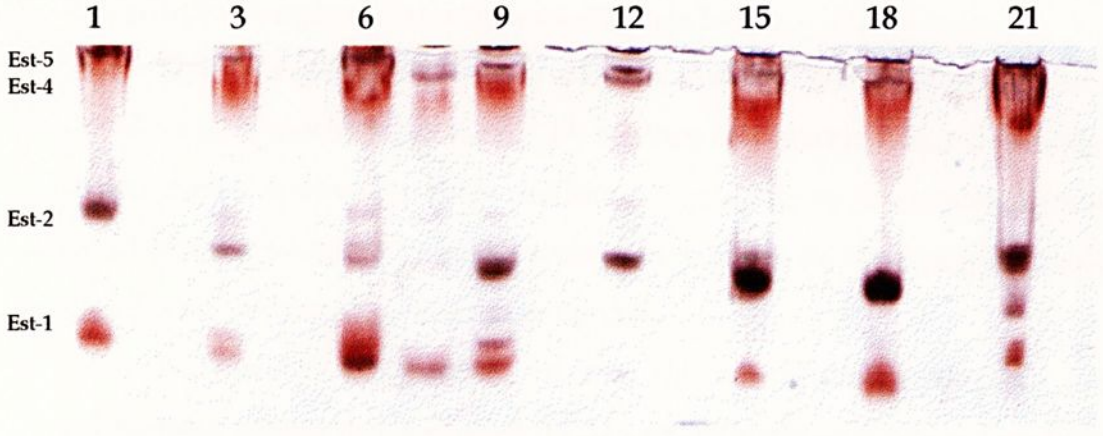


Figura 10. Expressão esterásica em fêmeas de *Z. indianus* com 1 a 21 dias de idade, selecionadas imediatamente após o término da cópula em gel de poliacrilamida a 10 % (C = 5%).

2. Variação Temporal das esterases do Loco Est-2.

O loco Est-2 foi escolhido para os estudos de variação temporal devido a dois motivos principais: 1º) é o loco com maior número de alelos dentre todos analisados neste estudo e 2º) dentre os locos polimórficos estudados no presente trabalho, somente os dados de Est-2 apresentaram uma maior precisão e definição de bandas.

A Tabela 3 apresenta o número de indivíduos amostrados, por coleta, para análise da quantificação da variabilidade genética apresentada pelo loco Est-2 e índice pluviométrico da cidade de Mirassol nos referidos meses (Outubro de 2001, Janeiro, Junho, Agosto, Novembro e Dezembro/2002). Janeiro de 2002 foi o mês que apresentou o maior índice pluviométrico, enquanto Junho de 2002 foi o que apresentou o menor.

A Figura 11A mostra a variação temporal dos alelos do loco Est-2 em seis meses (Outubro de 2001 e Janeiro, Junho, Agosto, Novembro e Dezembro de 2002) e a Figura 11B a variação alélica em agrupamentos de meses caracterizando períodos (Úmido 1, Seco e Úmido 2). O alelo mais freqüente em todas as coletas foi o *1*, sendo que suas freqüências variaram de 0,50, na coleta de Janeiro de 2002, a 0,35, em Novembro de 2002. O segundo e terceiros alelos mais freqüentes foram o *4* e o *2*. O alelo *4* teve sua maior freqüência em Outubro de 2001 (0,33) e a menor em Janeiro de 2002 (0,24), enquanto o alelo *2* teve a maior freqüência em Novembro de 2002 (0,26) e a menor em Janeiro de 2002 (0,12). A freqüência do último alelo, o 3, oscilou entre 0,09 (Agosto de 2002) e 0,14 (Junho de 2002). Este alelo apresentou a mesma freqüência (0,11) ao longo dos três períodos (Úmido 1, Seco e Úmido 2), porém o alelo *2* apresentou um aumento relativo da freqüência ao longo destes períodos: 0,18 no primeiro período úmido e 0,23 no segundo. As freqüências dos alelos *1* e *4* se comportaram de forma diferente das dos outros dois alelos citados: enquanto o alelo *1* apresentou uma maior freqüência no período Úmido 1 (0,41) e uma menor

no Úmido 2 (0,37), o alelo *4* apresentou freqüências mais altas em ambos os períodos úmidos (0,29) e mais baixa no período Seco (0,27).

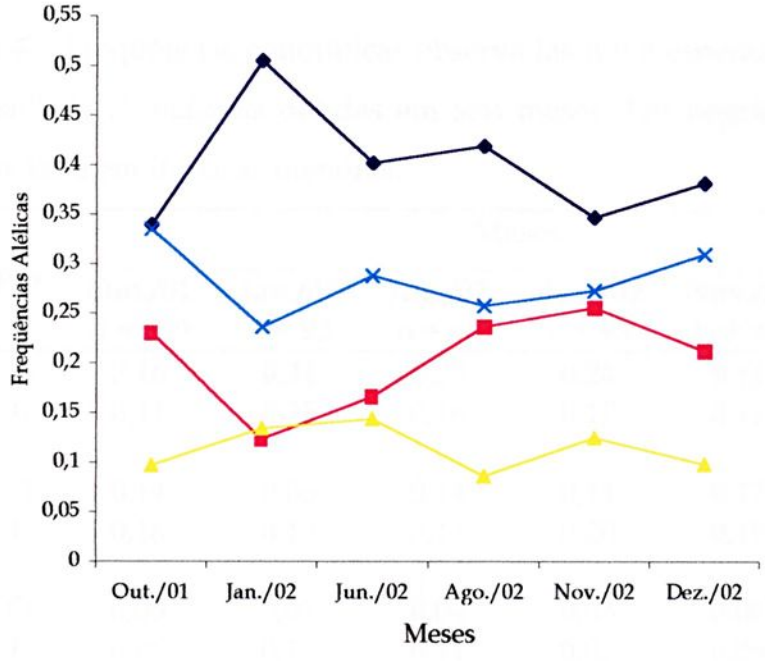
Em relação às freqüências genotípicas, as Tabelas 4 e 5 apresentam, respectivamente, para meses e períodos, os valores observados e esperados para cada um dos genótipos possíveis para o loco Est-2. Os genótipos mais freqüentemente observados foram o *1 1* e *1 4*, ao longo de praticamente todas as coletas: *1 1* só não esteve entre os mais freqüentes em Novembro de 2002, sendo o genótipo *1 4* o mais freqüente. O genótipo cuja freqüência esperada foi a mais alta em cada uma das coletas foi o *14*, exceto em Janeiro de 2002, enquanto a mais baixa foi a do *33*. As maiores freqüências genotípicas observadas por período foram as dos genótipos *1 1* e *1 4* enquanto as menores foram dos genótipos *2 3* (Úmido 1 e Úmido 2) e *3 3* (Seco e Úmido 2). As maiores freqüências esperadas foram as do genótipo *1 4* e as menores do genótipo *3 3*.

O teste para a verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o loco Est-2 em cada mês e em cada período analisado (Tabela 6) mostrou desvios significantes do esperado em Janeiro de 2002 ($P < 0,01$), em Agosto de 2002 ($P < 0,05$) e em Dezembro de 2002 ($P < 0,01$), e nos três períodos, Úmido 1 ($P < 0,001$), Seco ($P < 0,01$) e Úmido 2 ($P < 0,05$).

Por fim, o Teste Exato (Tabela 7) para verificação da diferenciação entre as coletas e a análise de agrupamento UPGMA (Figura 12), mostraram que a coleta realizada em Janeiro de 2002 foi a mais diferenciada das demais. Esta coleta foi agrupada como grupo externo na análise de UPGMA (Figura 12A). Porém, para os períodos, nenhum deles apresentou desvios estatisticamente significantes entre si no teste Exato (Seco X Úmido 1 = 0,8090; Seco X Úmido 2 = 0,6319; Úmido 1 X Úmido 2 = 0,1809; $p>0,05$), e a análise de UPGMA agrupou-os em ordem cronológica (Figura 12B).

Tabela 3. Número de indivíduos amostrados, por coleta, para análise da quantificação da variabilidade genética apresentada pelo loco Est-2 e índice pluviométrico da cidade de Mirassol nos referidos meses (Fonte: Casa da Agricultura de Mirassol).

Coleta	Nº de indivíduos amostrados	Índice Pluviométrico (mm^3)
Outubro/2001	109	101,5
Janeiro/2002	93	278,0
Junho/2002	66	000,0
Agosto/2002	93	35,0
Novembro/2002	88	134,0
Dezembro/2002	115	167,0



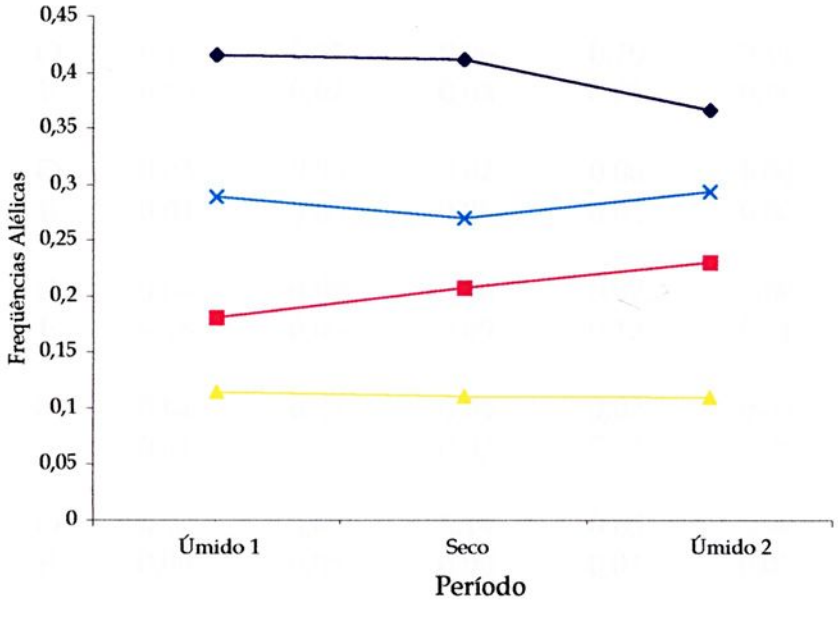


Figura 11. Variação temporal das freqüências alélicas do loco Est-2 de *Z. indianus*, por mês (A) e por período (B). ◆ = alelo *1*; ■ = alelo *2*; △ = alelo *3* e x = alelo *4*.

Tabela 4. . Freqüências genotípicas observadas (O) e esperadas (E) para o loco Est-2 de *Z. indianus* obtidas em seis meses. Em **negrito** as maiores freqüências e em *itálico* as menores.

Genótipos		Meses					
		Out./01 n = 109	**Jan./02** n = 93	**Jun./02** n = 66	**Ago./02** n = 93	**Nov./02** N = 88	**Dez./03** N = 115
1 1	O	0,16	**0,34**	0,20	**0,24**	0,14	**0,21**
	E	0,11	**0,25**	0,16	0,17	0,12	0,14
1 2	O	0,14	0,06	0,14	0,14	0,17	0,12
	E	0,16	0,13	0,13	0,20	0,18	0,16
1 3	O	0,05	0,07	0,04	0,03	0,06	0,05
	E	0,06	0,13	0,11	0,07	0,09	0,07
1 4	O	0,17	0,21	**0,23**	0,20	**0,19**	0,19
	E	**0,23**	0,24	**0,23**	**0,22**	**0,19**	**0,23**
2 2	O	0,13	0,05	0,06	0,10	0,11	0,08
	E	0,05	0,02	0,03	0,05	0,06	0,04
2 3	O	0,03	*0,03*	*0,02*	0,06	0,04	0,05
	E	0,04	0,03	0,05	0,04	0,06	0,04
2 4	O	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,10
	E	0,15	0,06	0,09	0,12	0,14	0,13
3 3	O	0,04	0,05	0,04	*0,02*	*0,03*	*0,03*
	E	*0,01*	*0,02*	*0,02*	*0,01*	*0,01*	*0,01*
3 4	O	*0,02*	0,06	0,14	0,05	0,09	0,05
	E	0,06	0,06	0,08	0,04	0,07	0,06
4 4	O	**0,22**	0,08	0,07	0,09	0,09	0,12
	E	0,11	0,06	0,08	0,07	0,07	0,10



Tabela 5. Freqüências genotípicas observadas (O) e esperadas (E) para o loco Est-2 de *Z. indianus* obtidas em três períodos de observação. Em **negrito** as maiores freqüências e em *itálico* as menores.

Genótipos		Períodos		
		Úmido 1 n = 202	Seco n = 159	Úmido 2 N = 203
1 1	O	**0,24**	**0,22**	**0,18**
	E	0,17	0,17	0,13
1 2	O	0,10	0,14	0,14
	E	0,15	0,17	0,17
1 3	O	0,06	0,04	0,05
	E	0,09	0,09	0,08
1 4	O	0,19	0,21	0,19
	E	**0,24**	**0,22**	**0,21**
2 2	O	0,09	0,08	0,09
	E	*0,03*	0,04	0,05
2 3	O	*0,03*	0,04	*0,04*
	E	0,04	0,04	0,05
2 4	O	0,04	0,07	0,09
	E	0,10	0,11	0,13
3 3	O	0,05	*0,02*	*0,04*
	E	*0,01*	*0,01*	*0,01*
3 4	O	0,05	0,09	0,07
	E	0,06	0,06	0,06
4 4	O	0,15	0,09	0,11
	E	0,08	0,07	0,08



Tabela 6. Valores obtidos para o teste de máxima verossimilhança (Teste G) para a verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg no loco Est-2 de *Z. indianus* em seis coletas e três períodos de observação.

Coletas		Teste G	P
MESES	Out./01	3,5353	0,0601
	Jan./02	9,1905	0,0024**
	Jun./02	1,4565	0,2275
	Ago./02	5,7996	0,0160*
	Nov./02	0,4487	0,5030
	Dez./02	7,0840	0,0078**
PERÍODOS	Úmido 1	14,3865	0,0001***
	Seco	6,8888	0,0087**
	Úmido 2	6,1854	0,0129*

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Tabela 7. Teste Exato (Raymond & Rousset, 1995) para diferenciação das freqüências alélicas e genotípicas nos meses de coleta, comparando-os de dois a dois.

Meses	Jan./02	Jun./02	Ago./02	Nov./02	Dez./02
Out./01	0***	0,2167	0,2511	0,4829	0,8076
Jan./02		0,2856	0,0165*	0,0035**	0,0089**
Jun./02			0,2484	0,3408	0,4262
Ago./02				0,3984	0,6024
Nov./02					0,4795
Todas os meses	0,0159*				

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

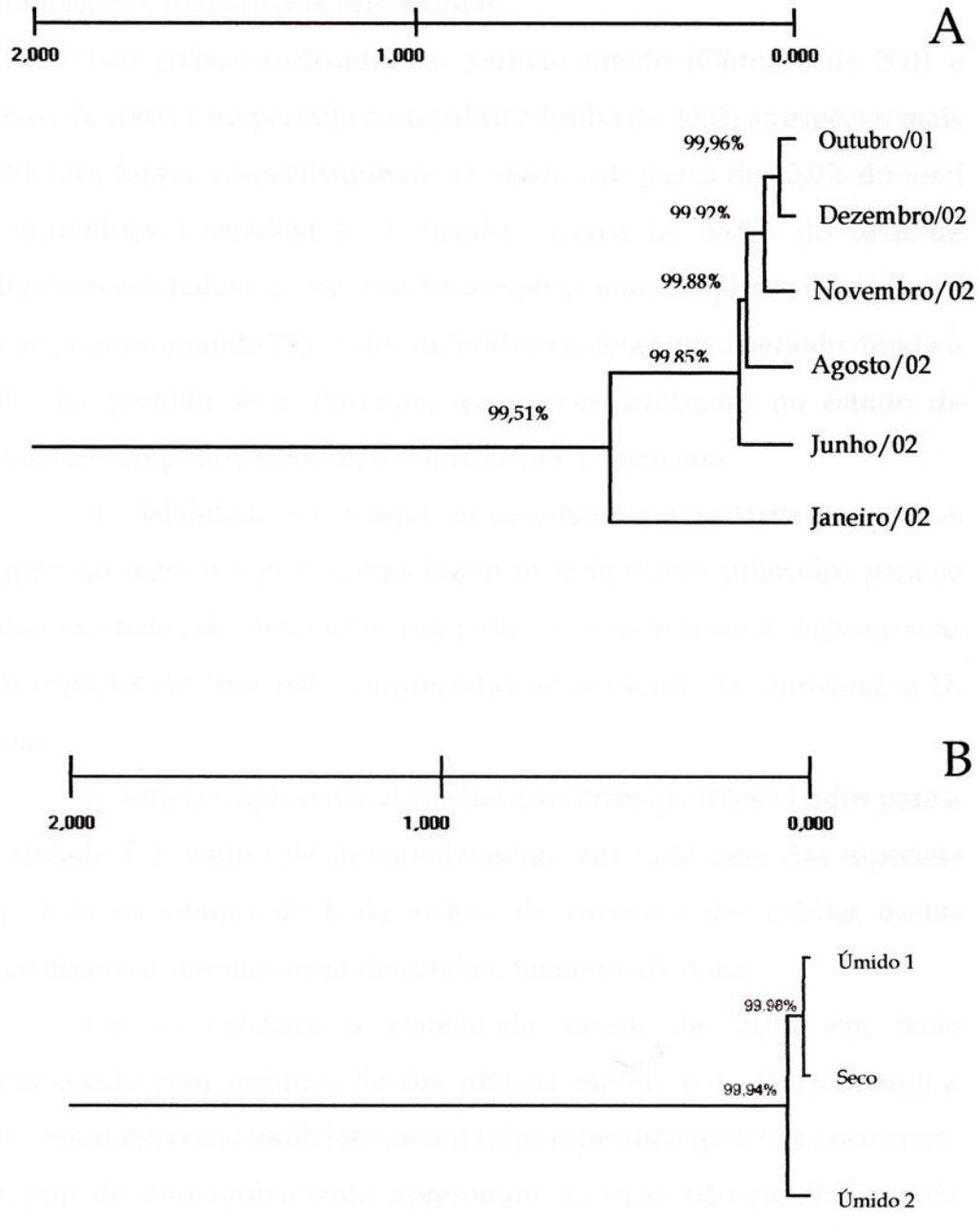


Figura 12. Análise de agrupamento UPGMA para todos os meses (A) e períodos (B), utilizando-se a distância de Nei (1972).

3. Interações Competitivas Pré-Adultas

Nas coletas realizadas no período úmido (Outubro de 2001 e Janeiro de 2002) e no período seco (Abril e Junho de 2002) as espécies mais freqüentes foram, respectivamente, *D. sturtevanti* (cerca de 15,0% do total de indivíduos coletados) e *D. simulans* (cerca de 35,0% do total de indivíduos coletados). *Z. indianus* foi a espécie mais freqüente em todas as coletas, representando 75,0% dos indivíduos coletados no período úmido e 55,0% no período seco. Portanto, as espécies utilizadas no estudo de interações competitivas foram *D. sturtevanti* e *D. simulans.*

A viabilidade e o tempo de desenvolvimento larva-imago e as freqüências alélicas e genotípicas foram os indicadores utilizados para se avaliar os efeitos das interações competitivas larvais entre *Z. indianus* e as duas espécies de *Drosophila* empregadas neste estudo, *D. sturtevanti* e *D. simulans.*

A Tabela 8 apresenta as médias e os erros-padrões obtidos para a viabilidade e o tempo de desenvolvimento em cada uma das espécies-alvo, bem os valores de F da análise de variância das médias destas variáveis nos diferentes tipos de condicionamento de meio.

Em *Z. indianus*, a viabilidade variou de 50,0% em meio condicionado com resíduos de sua própria espécie e de *D. sturtevanti* a 70,0% em meio com condicionamento intra-específico ($p<0,01$); entretanto, o tempo de desenvolvimento apresentou variação não significante, de 19,06 dias na condição interespecífica com *D. simulans* a 20,24 dias em meio condicionado com *D. sturtevanti.*

A viabilidade de *D. sturtevanti* variou de 73,0% em meio condicionado com resíduos de sua própria espécie a 87,5% quando se desenvolveu em meio não-condicionado, mas estas médias não diferiram estatisticamente. Já, a variação das médias do tempo de desenvolvimento desta espécie foi altamente significante ($p< 0,001$), sendo o menor tempo

observado em meio condicionado com resíduos interespecífico de *Z. indianus* (18,91 dias) e o maior em meio não-condicionado (21,86 dias).

Para *D. simulans*, a viabilidade variou de 55,0% em meio condicionado com *Z. indianus* a 74,5% em meio condicionado com larvas de sua própria espécie (intra-específico) e interespecífico com *Z. indianus* ($p<0,01$). Também significantes foram as variações das médias do tempo de desenvolvimento: 10,91 dias em condicionamento intra e interespecífico com *Z. indianus* a 11,04 dias em meio não condicionado.

As médias das viabilidades e dos tempos de desenvolvimento foram também comparadas duas a duas por meio do teste *t* de Tukey, com taxa de erro de 5,0%. A Tabela 9 indica as diferenças significantes ou não para cada par de comparações em relação à espécie-alvo em cada um dos tipos de meio condicionado e a Tabela 10 os apresenta em relação as três espécies-alvo frente a um mesmo tipo de condicionamento de meio.

O agrupamento gerado pela análise multivariada, realizada para avaliar a similaridade dos efeitos dos diferentes tipos de condicionamento do meio sobre as variáveis estudadas (tempo de desenvolvimento e viabilidade) de *Z. indianus*, é apresentado na Figura 13. Para que estes dois parâmetros pudessem ser utilizados em uma análise multivariada, as médias da viabilidade e do tempo de desenvolvimento, obtidas para os diferentes tipos de condicionamento, foram transformadas em um índice tomando-se cada uma como porcentagem da maior média obtida. Foram agrupados como mais similares entre si os resultados obtidos nos meios com resíduos interespecíficos de *D. simulans* e com resíduos intra e interespecíficos de *D. simulans* (92,23%), que possuem similaridade de 90,18% com os resultados obtidos para o meio não condicionado. Por sua vez, os resultados para o meio com resíduos intra e interespecíficos de *D. sturtevantis* teve 77,11% de similaridade aos das outras três condições citadas. Por fim, os resultados obtidos para o meio com resíduos intra-

específicos (52,35%) e os para o meio com resíduos de *D. simulans* (24,57%) foram os menos similares aos demais.

Em relação à influência do meio condicionado sobre a freqüência dos alelos do loco Est-2 de *Z. indianus*, a Figura 14 ilustra a distribuição de cada um dos quatro alelos nos diferentes tipos de condicionamento. O alelo *1* apresentou freqüências altas e aproximadas (0,3182 a 0,3929) nas seis condições de meio, enquanto que o alelo *2* foi muito freqüente no meio controle (0,3182) e o alelo *4* nos meios condicionados com *Z. indianus* (0,4211) e *Z. indianus* + D. *simulans* (0,3800). O alelo *3* foi o mais raro dos quatro, porém apresentou freqüências proporcionalmente mais altas nos indivíduos submetidos ao meio condicionado com *D. simulans* (0,1471).

A Tabela 11 contém as freqüências genotípicas observadas e esperadas nas amostras de *Z. indianus* submetidas aos diferentes tipos de condicionamento. Os genótipos observados com maior freqüência no meio não-condicionado foram o *1 1*, o *2 2* e o *1 4* e com menor freqüência foram os *1 3* e *3 3*. Estes dois genótipos não foram detectados nos indivíduos submetidos aos meios com condicionamento intra-específico, intra e interespecífico com *D. sturtevanti* e interespecífico com *D. simulans*. O genótipo *3 3* também não foi observado nos indivíduos provenientes dos demais tipos de meios condicionados Os genótipos *2 2* e *2 4* não foram observados nos indivíduos submetidos ao meio com resíduos intra-específicos, sendo que o primeiro também não foi detectado nos indivíduos oriundos do meio condicionado com *Z. indianus* + *D. simulans* e o segundo não o foi no meio com resíduos de *D. simulans*. Os indivíduos provenientes do meio condicionado com *Z. indianus* e *D. simulans* também não apresentaram os genótipos *2 2* e *2 3*. O genótipo com menor freqüência esperada em todos os tipos de condicionamento foi o *3 3*.

O genótipo *1 4* foi o mais freqüente nos indivíduos originários do meio não-condicionado e dos meios condicionados com *Z. indianus* + *D. sturtevanti*, com *Z. indianus* + *D. simulans* e com *D. simulans*. O genótipo *2 2* foi muito freqüente no meio não-condicionado e o *4 4* no meio com resíduos larvais intra-específicos. O genótipo com a maior freqüência esperada, em todos os tipos de condicionamento, foi o *1 4* enquanto que a freqüência esperada do genótipo *1 2* foi uma das maiores no meio não-condicionado e no meio com resíduos larvais de *D. sturtevanti*.

Os valores do teste de máxima verossimilhança (teste G) aplicado para a verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os alelos do loco Est-2 mostrou desvio significante das freqüências genotípicas esperadas para o loco Est-2 de *Z. indianus* somente para os indivíduos submetidos aos resíduos larvais intra-específicos ($p < 0,05$). Para os indivíduos submetidos aos demais tipos de condicionamento, a diferença foi não-significante.

As comparações realizadas por meio do Teste Exato (Tabela 12), para diferenciação do efeito dos diferentes tratamentos de meio condicionado sobre as freqüências alélicas e genotípicas, indicaram ausência de diferenças significantes destas freqüências.

unesp

Tabela 8. Médias (X) e erros-padrões (SE) da viabilidade larva-imago (%) por tubo e do tempo de desenvolvimento larva-imago (em dias) das espécies-alvo *Z. indianus* (*zp*), *D. sturtevanti* (*st*) e *D. simulans* (*sm*) submetidas ao tratamento com meio-condicionado (F para homogeneidade das médias em cada espécie-alvo e de cada um delas nos diferentes tipos de meio condicionado; NC = não condicionado; Inter = interespecífico; Intra = intra-específico; Intra + Inter = intra e interespecífico).

Espécie-Alvo	Tipos de Condicionamento	Viabilidade (X ± SE)	Tempo de Desenvolvimento (X ± SE)
Z. indianus	NC	67,0 ± 2,9	19,61 ± 0,369
	Intra	70,0 ± 3,2	19,76 ± 0,237
	Inter (*st*)	57,5 ± 3,0	20,24 ± 0,323
	Inter (*sm*)	64,0 ± 3,8	19,06 ± 0,207
	Intra + Inter (*zp* + *st*)	50,0 ± 2,4	19,50 ± 0,211
	Intra e Inter (*zp* + *sm*)	59,5 ± 2,2	19,53 ± 0,223
	$F_{6;54}$	7,77**	2,04
D. sturtevanti	NC	87,5 ± 2,4	21,86 ± 0,324
	Intra	76,0 ± 4,5	18,91 ± 0,345
	Inter (*zp*)	73,0 ± 4,7	19,97 ± 0,366
	Intra + Inter (*zp* + *st*)	84,0 ± 3,7	20,80 ± 0,317
	$F_{3;36}$	2,71	13,66***
D. simulans	NC	70,0 ± 4,5	11,51 ± 0,112
	Intra	67,0 ± 3,6	11,04 ± 0,055
	Inter (*zp*)	55,0 ± 4,1	11,10 ± 0,103
	Intra e Inter (*zp* + *sm*)	74,5 ± 2,0	10,91 ± 0,041
	$F_{3;36}$	5,06**	9,72***
	NC	$F_{2;27}$: 17,80***	$F_{1;18}$: 13,46***
	Intra	$F_{2;27}$: 1,72	$F_{1;18}$: 3,06
	Inter (*st* e *sm*)	$F_{3;36}$: 7,76***	$F_{2;27}$: 4,07*
	Intra e Inter (*zp* + *st* e *zp* + *sm*)	$F_{3;36}$: 15,41***	$F_{2;27}$: 8,46**

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Tabela 9. Comparações dois a dois dos efeitos dos tipos de condicionamento sobre a viabilidade e o tempo de desenvolvimento das espécies-alvo por meio do Teste de Tukey (erro = 5,0%; NC: não condicionado; Intra: intra-específico; Inter: interespecífico).

Espécie-Alvo / Tipo de Condicionamento	Tipos de Condicionamento	Viabilidade	Tempo de Desenvolvimento
Z. indianus			
NC	Intra	NS	NS
	Inter (*st*)	*	NS
	Intra e Inter (*zp* + *st*)	NS	NS
	Inter (*sm*)	NS	NS
	Intra e Inter (*zp* + *sm*)	NS	NS
Intra	Inter (*st*)	*	NS
	Intra e Inter (*zp* + *st*)	*	NS
	Inter (*sm*)	NS	NS
	Intra e Inter (*zp* + *sm*)	NS	NS
Inter (*st*)	Intra e Inter (*zp* + *st*)	NS	NS
	Intra e Inter (*zp* + *sm*)	NS	NS
	Inter (*sm*)	NS	NS
Intra/Inter (*st*)	Intra e Inter (*zp* + *sm*)	NS	NS
	Inter (*sm*)	NS	NS
Inter (*sm*)	Intra e Inter (*zp* + *sm*)	NS	NS
D. sturtevanti			
NC	Intra	NS	*
	Inter (*zp*)	NS	*
	Intra e Inter (*zp* + *st*)	NS	*
Intra	Inter (*zp*)	NS	NS
	Intra e Inter (*zp* + *st*)	NS	*
Inter (*zp*)	Intra e Inter (*zp* + *st*)	NS	NS
D. simulans			
NC	Intra	NS	*
	Inter (*zp*)	*	*
	Intra e Inter (*zp* + *sm*)	NS	NS
Intra	Inter (*sm*)	NS	NS
	Intra e Inter (*zp* + *sm*)	NS	NS
Inter (*zp*)	Intra e Inter (*zp* + *sm*)	*	

*p<0,05; NS: não significante; *zp: Z.indianus; st: D. sturtevanti; sm: D. simulans.*

Tabela 10. Comparação dois a dois dos efeitos do mesmo tipo de condicionamento sobre a viabilidade e o tempo de desenvolvimento das espécies-alvo *Z. indianus* (*zp*), *D. sturtevanti* (*st*) e *D. simulans* (*sm*) por meio do Teste de Tukey (erro = 5,0%; NC: não condicionado; Intra: intra-específico; Inter: interespecífico).

Tipos de Condicionamento	Tipos de Condicionamento	Viabilidade	Tempo de Desenvolvimento
NC (*zp*)	NC (*st*)	*	*
	NC (*sm*)	NS	-
NC (*st*)	NC (*sm*)	*	-
Intra (*zp*)	Intra (*st*)	NS	NS
	Intra (*sm*)	NS	*
Intra (*st*)	Intra (*sm*)	NS	*
Inter (*zp* => *st*)	Inter (*zp* => *sm*)	*	*
	Inter (*st* =>*zp*)	*	NS
	Inter (*sm* => *zp*)	NS	-
Inter (*zp* =>*sm*)	Inter (*st* =>*zp*)	NS	NS
	Inter (*sm* => *zp*)	NS	-
Inter (*st* =>*zp*)	Inter (*sm* => *zp*)	*	-
Intra e Inter (*zp* => *zp* + *st*)	Intra e Inter (*zp* => *zp* + *sm*)	NS	NS
	Intra e Inter (*st* => *st* + *zp*)	*	*
	Intra e Inter (*sm* => *sm* + *zp*)	*	-
Intra e Inter (*zp* => *zp* + *sm*)	Intra e Inter (*st* => *st* + *zp*)	*	*
	Intra e Inter (*sm* => *sm* + *zp*)	*	-
Intra e Inter (*st* => *st* + *zp*)	Intra e Inter (*sm* => *sm* + *zp*)		-

*p<0,05; NS: não significante; - : não analisado; => submetido a resíduos larvais de.

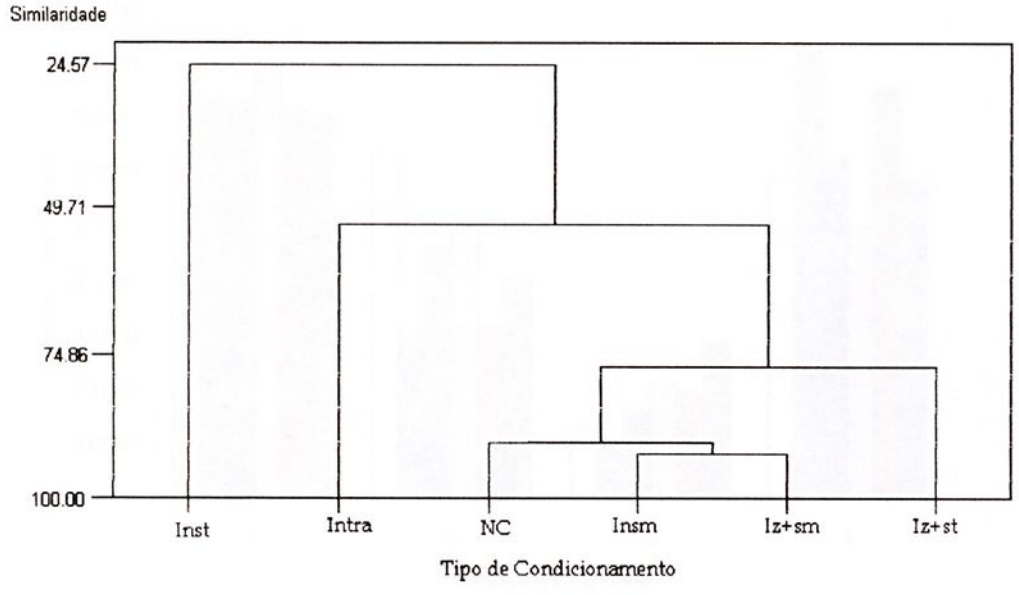


Figura 13. Dendograma da análise multivariada para a verificação dada similaridade (99,0%) entre os diferentes tipos de condicionamento e a viabilidade larva-imago e tempo de desenvolvimento em *Z. indianus*. Insm = Interespecífico com *D. simulans*; NC = Não condicionado; Intra = Intra-específico; Inst = Interespecífico com *D. sturtevanti*; Iz+st = Intra e Interespecífico com *Z. indianus* + *D. sturtevanti;* Iz+sm = Intra e Interespecífico com *Z. indianus* + *D. simulans.*

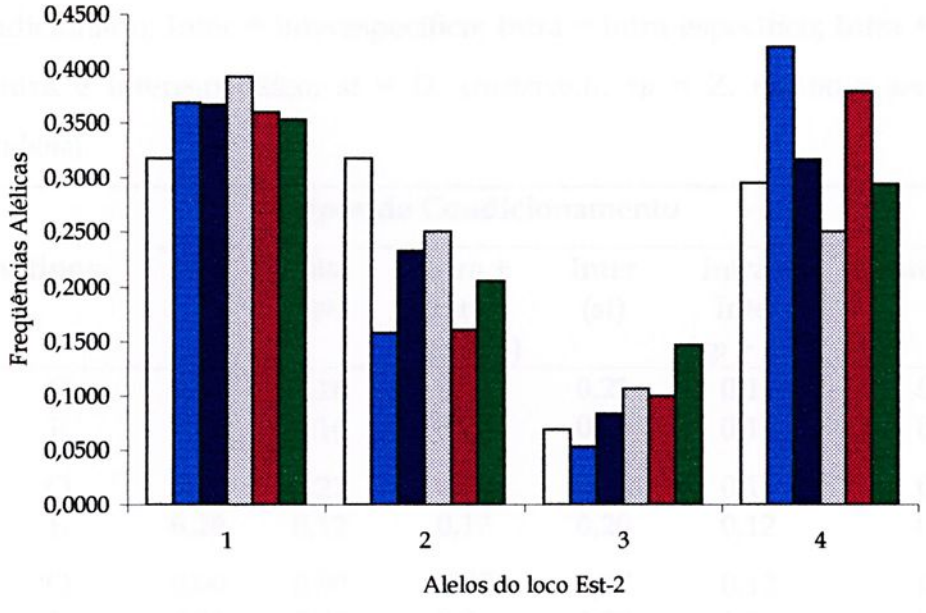


Figura 14. Freqüências dos alelos do loco Est-2 de *Z. indianus* em cada tipo de meio condicionado: □ = não condicionado; ■ = condicionamento intra-específico (*Z. indianus*); ■ = condicionamento intra e interespecífico (*Z. indianus* + *D. sturtevanti*); □ = condicionamento interespecífico (*D. sturtevanti*); ■ = condicionamento intra e interespecífico (*Z. indianus* + *D. simulans*) ; ■ = condicionamento interespecífico (*D. simulans*).

Tabela 11. Freqüências genotípicas observadas (O) e esperadas (E) para o loco Est-2 de *Z. indianus*, conforme o tipo de condicionamento de meio. Em **negrito** as maiores freqüências e em *itálico* as menores (NC = não condicionado; Inter = interespecífico; Intra = intra-específico; Intra + Inter = intra e interespecífico; *st* = *D. sturtevanti*; *zp* = *Z. indianus*; *sm* = *D. simulans*).

Genótipos		Tipos de Condicionamento					
		NC	Intra (*zp*)	Intra + Inter (*zp* + *st*)	Inter (st)	Intra + Inter (*zp* + *sm*)	Inter (*sm*)
1 1	O	**0,18**	0,16	0,10	**0,21**	0,12	0,18
	E	0,10	0,14	0,13	0,15	0,13	0,12
1 2	O	0,09	0,21	**0,23**	0,14	0,16	0,12
	E	**0,20**	0,12	0,17	**0,20**	0,12	0,15
1 3	O	*0,00*	*0,00*	*0,00*	0,07	0,12	*0,00*
	E	0,04	0,04	0,06	0,08	0,07	0,10
1 4	O	**0,18**	0,21	**0,30**	0,14	**0,20**	**0,24**
	E	**0,19**	**0,31**	**0,23**	**0,20**	**0,27**	**0,21**
2 2	O	**0,18**	*0,00*	0,07	0,07	*0,00*	0,12
	E	0,10	0,02	0,05	0,06	0,03	0,04
2 3	O	0,09	0,11	0,03	0,07	*0,00*	0,06
	E	0,04	0,02	0,04	0,05	0,03	0,06
2 4	O	0,09	*0,00*	0,07	0,14	0,16	*0,00*
	E	**0,19**	0,13	0,15	0,13	0,12	0,12
3 3	O	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*
	E	*0,00*	*0,00*	*0,01*	*0,01*	*0,01*	*0,02*
3 4	O	0,05	*0,00*	0,13	0,07	0,08	0,24
	E	0,04	0,04	0,05	0,05	0,08	0,09
4 4	O	0,14	**0,32**	0,07	0,07	0,16	0,06
	E	0,09	0,18	0,10	0,06	0,14	0,09



Tabela 12. Teste Exato (Raymond & Rousset, 1995) para diferenciação do efeito dos diferentes tratamentos de meio condicionado sobre as freqüências alélicas e genotípicas, comparando-os dois a dois (NC = não condicionado; Inter = interespecífico; Intra = intra-específico; Intra + Inter = intra e interespecífico; *st* = *D. sturtevanti*; *zp* = *Z. indianus*; *sm* = *D. simulans*).

Condicionamento	**Intra**	**Intra e Inter (*zp* + *st*)**	**Inter (*st*)**	**Intra e Inter (*zp* + *st*)**	**Inter (*sm*)**
NC	0,3557	0,8442	0,8357	0,3442	0,5789
Intra		0,6800	0,4586	0,9143	0,4674
Intra e Inter (*zp* + *st*)			0,9163	0,7936	0,8006
Inter (*st*)				0,6470	0,9174
Intra e Inter (*zp* + *sm*)					0,7851

V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

As isoenzimas são uma importante ferramenta para estudos evolutivos, visto que elas têm um papel considerável na composição do conjunto de polimorfismos protéicos e enzimáticos existentes nas espécies. Além disso, elas são amplamente utilizadas em estudos de duplicação gênica, regulação e síntese protéica, variação gênica em populações e sistemática (Wagner & Selander, 1974). Em insetos, várias isoenzimas são estudadas e, dentre elas, as esterases constituem grupos de isoenzimas que são amplamente utilizadas.

A população de *Z. indianus* utilizada neste estudo apresentou cinco locos: Est-1, Est-2, Est-3, Est-4 e Est-5. Dois deles, Est-1 e Est-2, apresentaram polimorfismos. Este polimorfismo em 40% dos locos encontrados está de acordo com estudos que admitem que as esterases constituem um dos grupos mais polimórficos de aloenzimas em insetos (Johnson, 1974). Os locos polimórficos encontrados no presente estudo caracterizaram-se pela produção de enzimas monoméricas.

Por outro lado, os locos Est-3, Est-4 e Est-5, foram monomórficos, sendo que raramente as enzimas do loco Est-3 foram detectadas. As enzimas deste loco caracterizaram-se por produzirem bandas difusas, quando detectadas, com maior afinidade pelo α-naftilacetato, produzindo sempre marcação negra. Nos géis populacionais, somente algumas amostras apresentaram bandas EST-3. Porém, todos as amostras provenientes de indivíduos utilizados nos blocos experimentais de interações competitivas, incluindo os oriundos do meio não condicionado com resíduos larvais, apresentaram esta enzima. Considerando-se que mesmo os indivíduos provenientes do meio não condicionado apresentaram a enzima EST-3, é possível que esta enzima esteja mais relacionada a alguma resposta biológica ao efeito da degradação natural

do meio de cultura sobre os organismos do que ao efeito dos resíduos larvais.

Parkash & Yadav (1993) estudaram 20 populações indianas de *Z. indianus* quanto aos polimorfismos esterásicos e constataram a existência de pelo menos sete locos esterásicos polimórficos, os quais foram por eles denominados Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-5, Est-6 e Est-7. As enzimas EST-1 e EST-2 foram classificadas como β-esterases do tipo carboxilesterases, enquanto EST-3 e EST-4 como α-esterases do tipo carboxilesterases e EST-5, EST-6 e EST-7 como α-esterases do tipo colinesterases. A distribuição destas esterases em gel de poliacrilamida se dá do pólo positivo para o negativo, de forma decrescente, de forma que EST-1 é mais próxima do pólo negativo e EST-7 do positivo. Esta distribuição das esterases e a caracterização delas não são concordantes com os resultados obtidos no presente estudo em vários aspectos: 1) os autores encontraram enzimas para os sete locos em todas as populações e no presente trabalho foram identificados somente cinco locos; 2) Parkash & Yadav (1993) descreveram dois locos apresentando enzimas com padrão dimérico de esterases (Est-1 e Est-2), no presente trabalho não foi detectada nenhuma enzima com esta característica; 3) os autores detectaram três locos com enzimas colinesterases (EST-5, EST-6 e EST-7) e no presente trabalho foi detectada somente uma (EST-5); 4) as duas β-esterases por eles descritas (EST-1 e EST-2) estão próximas uma da outra, indicando que elas possuem peso molecular semelhante e as descritas aqui (EST-1 e EST-4) diferem entre si, em relação ao peso molecular, em pelo menos 100 KDa. Estas diferenças entre os resultados obtidos por Parkash & Yadav (1993) e os do presente estudo talvez sejam decorrentes (1) da origem da populações brasileiras ser africana ou indiana, (2) das condições experimentais, visto que os autores utilizaram géis de amido em seus

estudos, e o presente trabalho foi realizado com géis de poliacrilamida que permitem melhor caracterização do padrão de bandas esterásicas, ou ainda, as discordâncias no número e características dos locos esterásicos podem significar que (3) a espécie estudada neste trabalho e por Parkash & Yadav (1993) sejam na realidade não a mesma, mas duas espécies crípticas, ocorrência não incomum entre as espécies do gênero *Zaprionus* (Tsacas, 1985).

Possíveis relações entre as esterases descritas por Parkash & Yadav (1993) provenientes de populações indianas de *Z. indianus* e as descritas e caracterizadas neste trabalho, com uma população brasileira, serão estabelecidas oportunamente no decorrer desta discussão.

Neste trabalho as enzimas produzidas pelos locos Est-1, Est-2, Est-4 e Est-5 de *Z. indianus* foram caracterizadas, segundo o padrão de resposta a inibidores, o peso molecular e a afinidade pelos substratos α e β-naftilacetatos. Esta última caracterização está relacionada à hidrólise destes substratos e, conseqüentemente, a semelhanças na estrutura terciária e na seqüência de aminoácidos destas enzimas (Oakeshott *et al.*, 1993), que permite agrupá-las em dois *clusters* principais: o α, contendo as α-esterases e o β, contendo as β-esterases. Ainda, a expressão tecido-específica, idade-específica e relacionada à atividade sexual foram estudadas para a EST-2 e EST-4.

Abaixo segue a caracterização geral das enzimas de cada um dos locos esterásicos detectados na população de *Z. indianus* estudada no presente trabalho.

A enzima EST-5 apresentou maior afinidade pelo α-naftilacetato e foi inibida pelo malathion e pelo sulfato de eserina, não o sendo pelo PMSF, o que a caracteriza como uma colinesterase de peso molecular aproximado de 159 KDa. Ela parece estar relacionada com alguma das

colinesterases (EST-5, EST-6 e EST-7) descritas por Parkash & Yadav (1993), em populações indianas de *Z. indianus* e com a AChE de *D. melanogaster*. A AChE apresentou, no presente estudo, o mesmo padrão de respostas a inibidores e peso molecular aproximado de 160 KDa, muito próximo ao obtido para a EST-5. Além disso, a enzima EST-5 descrita no presente trabalho para *Z. indianus* e a AChE de *D. melanogaster* são encontradas em maior quantidade na cabeça de ambas espécies. Estas similaridades sugerem uma homologia entre a EST-5 de *Z. indianus* e a AChE de *D. melanogaster*, e, considerando-se que a AChE é uma das colinesterases mais conservadas no gênero *Drosophila* (Oakeshott, 1993) esta hipótese se torna ainda mais plausível. Porém, estudos comparativos entre as seqüências dos aminoácidos e dos nucleotídeos destas duas enzimas são necessários para que respostas mais efetivas em relação a esta homologia sejam obtidas. Em decorrência dessa possível homologia, é também possível sugerir que a EST-5 apresente uma homologia funcional a AChE e esteja relacionada à transmissão do impulso nervoso e à resistência a inseticidas conforme é comumente observado em outras colinesterases (Fournier *et al.*, 1988; Mourya *et al.*, 1993; Guerrero *et al.*, 1999).

Por outro lado, as enzimas EST-1 e EST-4 apresentaram maior afinidade pelo β-naftilacetato, e foram classificadas como β-esterases. Elas foram inibidas pelo malathion, mas não pelos demais inibidores utilizados no presente trabalho, sendo também classificadas como carboxilesterases. O peso molecular das enzimas monoméricas EST-1 foi de cerca de 42 KDa e da EST-4 126 KDa. Exceto pelo peso molecular, elas apresentaram o mesmo tipo de afinidade por substrato e o mesmo padrão de inibição da EST-6 de *D. melanogaster*. Segundo vários autores (Mane *et al.*, 1983; Danford & Beardmore, 1979) esta carboxilesterase é uma enzima monomérica, característica que compartilha com a EST-1 de *Z. indianus*, de

cerca de 65 KDa. A EST-6 possui maior expressão em machos (Sheehan, Richmond & Cochrane, 1979; Richmond *et al.*, 1980) e altas concentrações desta enzima foram detectadas no fluído seminal e no ducto ejaculatório, sugerindo um possível papel da EST-6 na biologia reprodutiva de *D. melanogaster*.

No presente estudo, amostras contendo aparelhos reprodutores masculinos de *Z. indianus* apresentaram forte marcação para β-esterases, quando submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, fornecendo evidências que a EST-1 e a EST-4 sejam expressas em tecidos do aparelho reprodutor. Tanto a EST-1 quanto a EST-4 apresentaram expressão aumentada em machos, a partir do 3º dia de emergência; além disso, a EST-1 foi restrita aos machos, com exceção de fêmeas que foram imediatamente coletadas após a cópula, sugerindo uma possível transferência da mesma às fêmeas pelos machos, como acontece com a EST-F em *D. aldrichi* (Kambysellis *et al.*, 1968) e com a EST-S de *D. viriilis* (Korochkin *et al.*, 1990 *apud* Sergeev *et al.*, 1993). Esterases macho-específicas pertencentes ao *cluster* β são freqüentes no gênero *Drosophila*, sendo encontradas em *D. duni* (Carrasco *et al.*, 1984), *D. virilis* (Korochkin *et al.*, 1990 *apud* Sergeev *et al.*, 1993), *D. arizonae* (Ceron, 1988) e espécies do *cluster buzzatti* (Lapenta *et al.*, 1998). Da mesma forma, apesar de não ser restrita a machos, EST-4 foi mais expressa nestes, fato este compartilhado com a EST-6 de *D. melanogaster*.

Vários estudos correlacionam a EST-6 com diferentes β-esterases em outras espécies de *Drosophila*, sugerindo uma provável homologia entre a EST-6 e estas esterases. Por exemplo, Brady *et al.* (1990), mostraram existir uma grande semelhança estrutural entre a EST-5 de *D. pseudoobscura* e a EST-6 de *D. melanogaster*, apesar de haver uma grande diferença entre o peso molecular de ambas e número considerável de substituições de aminoácidos entre estas duas esterases, com a presença de muitos resíduos

aromáticos semelhantes no sítio ativo destas enzimas e a afinidade pelo substrato β-naftilacetato. Já Morton & Singh (1985) e Karotan *et al.* (1993) estudaram, comparativamente, a estrutura da EST-6 das espécies crípticas *D. simulans* e *D. mauritiana* com a da EST-6 de *D. melanogaster* e detectaram uma diferença de cerca de 30 aminoácidos entre as enzimas destas três espécies e mudanças menos radicais em termos de respostas físico-químicas, sendo que as diferenças entre elas não estão relacionadas a estruturas específicas, não tendo muito impacto na função destas enzimas.

Há uma grande semelhança entre os genes das β-esterases em *Drosophila* (Oakeshott *et al.*, 1993), sendo que estes genes, na maior parte das vezes, estão estreitamente ligados e orientados na mesma direção. Assim, a hipótese mais provável é que estes genes tenham surgido por meio de duplicação gênica. Brady *et al.* (1990) e Brady & Richmond (1992) propuseram um modelo de duplicação em *D. pseudoobscura* e *D. melanogaster*, no qual um primeiro evento de duplicação teria ocorrido entre a divergência entre *D. melanogaster* e *D. pseudoobscura*, provavelmente há 20 e 40 milhões de anos atrás. Esta duplicação teria originado os genes Est-5A e Est-5B em *D. pseudoobscura* e Est-P e Est-6 em *D. melanogaster*, a primeira restrita ao estágio larval e a segunda presente durante todo o ciclo de vida em cada uma das espécies. Já Est-5C teria se originado por meio de uma duplicação mais recente da Est-5B. As relações entre os pesos moleculares de EST-1 e EST-4 para *Z. indianus*, e o padrão de expressão diferencial destas β-esterases em machos, sugerem que eventos semelhantes possam ter ocorrido nesta espécie: duplicação por recombinação desigual, evento comum na formação de famílias gênicas, envolvendo o gene Est-4 pode ter originado o gene Est-1, de menor tamanho e com expressão restrita aos machos. A perda de função deste

gene em fêmeas poderia ser atribuída a eventos de regulação gênica transcricionais ou pós-transcricionais.

Outro aspecto ressaltado por Brady & Richmond (1992), é a possibilidade de haver uma relação entre a duplicação que originou os pares de β-esterases Est-P/Est-6 e Est-5A/Est-5B e os demais pares "esterase restrita à fase larval"/"esterase presente durante todo o ciclo de vida" de outros membros do gênero *Drosophila*, sugerindo que estas duplicações estiveram presentes em uma espécie ancestral. Os dados obtidos no presente estudo para as β-esterases de *Z. indianus*, EST-1 e EST-4, podem refletir uma possível relação de ancestralidade com o gene da EST-6, o que justifica a necessidade de realização de estudos mais acurados sobre a similaridade dos genes da EST-1 e EST-4 com o da EST-6, tais como análises de seqüências nucleotídeos e de aminoácido, de tipos de domínios e características do sítio ativo, para que se possam estabelecer as relações filogenéticas entre estes locos gênicos.

Considerando as enzimas monoméricas do loco Est-2 de *Z. indianus* descritas neste trabalho, elas são carboxilesterases com serina no sítio-ativo (serino-esterases), devido a sua inibição pelo malathion e pelo PMSF, mas não pelo sulfato de eserina, com afinidade pelo α-naftilacetato (α-esterase), e com peso molecular aproximado de 57 KDa. Carboxilesterases com serina no sítio-ativo (serino-esterases) geralmente estão relacionadas à atividade proteolítica (Mateus *et al.*, 1996), sugerindo uma possível função digestiva ou de degradação de proteínas que contenham ésteres de ácidos carboxílicos em suas moléculas. As carboxilesterases também estão relacionadas a degradação de peptídeos e amidas (Walker & Mackness, 1983). Parkash & Yadav (1993) descreveram duas carboxilesterases monoméricas em *Z. indianus* com afinidade pelo α-naftilacetato, EST-3 e EST-4, que parecem estar relacionadas às enzimas do loco Est-2 descritas

neste trabalho. Porém, estes autores descreveram dois locos próximos com estas características, cada um com dois alelos, e apenas um loco com quatro alelos foi encontrado na população de Z. *indianus* analisada neste trabalho. Os resultados obtidos para os cruzamentos enfocando o loco Est-2 indicam a existência de um único loco, visto que os descendentes apresentaram, considerando o genótipo dos pais, distribuição do padrão de bandas conforme esperado pela 1ª Lei de Mendel. Portanto, a descrição feita por Parkash & Yadav (1993) da existência de dois locos codificadores de carboxilesterases monoméricas em *Z. indianus*, cada qual contendo até dois alelos diferentes pode ser equivocada visto que os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram a existência de um único loco de alelos múltiplos, com quatro alelos possíveis. Esta discordância reforça a necessidade de um estudo comparativo entre as populações indianas e as que agora se dispersam pelo continente sul-americano.

Desde que as análises eletroforéticas das variações protéicas na década de 1960 revelaram que os polimorfismos eram abundantes nas populações (Hubby & Lewontin, 1966; Lewontin & Hubby, 1966), tem se mantido o debate "neutralista-selecionista" sobre como interpretar a variação em nível molecular dentro e entre espécies (Kimura, 1983; Lewontin, 1974). "Neutralistas" afirmam que a maioria das mutações é deletéria, e são eliminadas ou mantidas a freqüências muito baixas pela seleção natural, ou são seletivamente neutras. Desta forma, mutações neutras mudando em freqüência pela deriva genética, seriam a principal determinante da variação dentro e entre espécies. Os abundantes polimorfismos observados nas populações seriam uma fase da evolução; molecular entre a origem das variantes alélicas por mutação e eliminação ou fixação pela deriva genética. "Selecionistas", em contraste, afirmam que a seleção natural mantém muito dos polimorfismos nas populações e constituem a causa de muitas diferenças entre espécies.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Diversos estudos bioquímicos mostram que as aloenzimas diferem em propriedades funcionais e que as diferenças correspondem a prevalência de diferentes alelos nas populações que vivem em diferentes ambientes (Meritt, 1972; Place & Powers, 1979) e que estas variantes enzimáticas afetam o valor adaptativo (Bijlsma-Meeles & Van Delden, 1974), enquanto outros, ao contrário, indicam que variantes aloenzimáticas são seletivamente neutras (Yamazaki, 1971).

O polimorfismo apresentado pelo loco Est-2 permitiu avaliar as modificações evolutivas da população natural de *Z. indianus* durante um ano, bem como dos efeitos de resíduos larvais intra e interespecíficos sobre as freqüências de suas quatro formas aloenzimáticas que são codificadas por este loco esterásico.

Existem alguns estudos em drosofilídeos que correlacionam variação temporal ou espacial com freqüências aloenzimáticas (Barker *et* al, 1986; Parkash & Yadav, 1993; Yadav & Parkash, 1993; Moraes, 2000; Mateus, 2001). Yadav & Parkash (1993) estudaram a variabilidade de sete sistemas enzimáticos diferentes em indivíduos de *Z. indianus* provenientes de doze regiões indianas localizadas em latitudes diferentes, e obtiveram uma distribuição clinal da variação, sugerindo efeito de seleção natural sobre estes locos aloenzimáticos. Mateus (2001), por outro lado, em seu estudo com populações temporais de *D. antonietae*, notou uma pequena variação genética ao longo de um ano em relação a 14 locos aloenzimáticos utilizados em seu trabalho, variação esta não suficiente para determinar diferenciação da população. Porém, a variação genética temporal encontrada por esse autor foi associada a variações ambientais, principalmente a umidade, e um padrão cíclico desta variação foi encontrado, sendo que o mês mais úmido apresentou a maior variação entre as freqüências alélicas e genotípicas daquela população.



As freqüências alélicas do loco Est-2 apresentaram pouca variação ao longo das coletas, exceto pelo pico na freqüência do alelo *1* na coleta de Janeiro de 2002, e a queda na freqüência dos alelos *2* e *4* em resposta a esta variação do alelo *1*. O alelo *3* não apresentou variação em suas freqüências. O mês de Janeiro de 2002 foi o mais úmido de todo o período de coletas, e foi também a coleta mais diferenciada das demais, segundo os resultados obtidos pelo teste de homogeneidade de freqüências alélicas e genotípicas (Teste Exato) e pela análise de agrupamento UPGMA. Nesta coleta, além das coletas de Agosto de 2002 e Dezembro de 2002, também se verificou desvio significante das freqüências para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg é baseado nas freqüências observadas e esperadas de genótipos que, em última análise, refletem a distribuição das freqüências alélicas. Desta forma, desvios nesse equilíbrio representam algum grau de alteração nas freqüências, alterações estas que poderiam ser produto da ação de algum fator evolutivo, tais como, seleção natural atuando a partir de variáveis climáticas, efeito carona, fluxo gênico, mutações ou mesmo deriva genética.

O principal fator evolutivo a ser considerado como provável causa dos desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg detectados neste trabalho é a ação da seleção natural por meio de pressões ambientais, visto que ocorreram variações no índice pluviométrico ao longo dos períodos das coletas. Barker *et al.* (1986), Moraes (2000) e Mateus (2001) estudaram a variação aloenzimática em diferentes populações e espécies do *cluster buzzatti* do grupo *repleta* de *Drosophila*. Todos esses autores encontraram variação significativa nas freqüências alélicas, porém somente o terceiro encontrou uma variação cíclica delas. Porém, Moraes (2000) encontrou uma associação maior entre freqüências obtidas em períodos secos e em períodos úmidos do que entre períodos diferentes. Segundo Futuyma (1992), quando variações em freqüências alélicas são causadas por seleção

natural, a taxa de variação depende da magnitude das diferenças no valor adaptativo dos genótipos, das freqüências alélicas iniciais e das relações de dominância entre os alelos.

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, os meses mais úmidos (Janeiro de 2002 e Dezembro de 2002) e o mês antecedido por um longo período de seca (Agosto de 2002) apresentaram picos na freqüência do alelo *1*. É possível sugerir um certo grau de associação entre umidade e a variação alélica do loco Est-2. Porém, estes picos foram muito sutis nos meses de Agosto de 2002 e em Dezembro de 2002, e as freqüências deste alelo sempre foram mais altas do que os demais alelos em todas as coletas realizadas, podendo a alta freqüência inicial do alelo *1* estar atuando como fator decisivo na produção destes picos e não respostas seletivas às variações da umidade ambiental. Não se pode descartar, entretanto, que as variações observadas nas freqüências dos alelos do loco Est-2 sejam devidas à atuação da seleção não diretamente sobre o loco aloenzimático foco do estudo, mas em algum outro loco em desequilíbrio de ligação com o primeiro, o "efeito carona". Estudos associando vários locos e mesmo estudos considerando inversões cromossômicas relacionadas a estes locos permitiriam caracterizar melhor o efeito carona.

O outro processo que poderia causar o desvio significante no Equilíbrio de Hardy-Weinberg encontrado nas coletas de Janeiro, Agosto e Dezembro de 2002 é a deriva genética. Este fator acarreta mudanças casuais nas freqüências alélicas ao longo das gerações, principalmente nas populações pequenas, sem a participação da seleção natural, admitindo que os alelos seriam seletivamente neutros. O termo neutro não significa que todos os alelos de um determinado loco possuam a mesma adaptabilidade e sim que a diferença entre eles é tão pequena, como acontece com muitas aloenzimas, que a seleção atuaria de forma pouco intensa, não interferindo na manutenção ou eliminação de polimorfismos.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Desta forma, a deriva genética e a taxa de mutação é que seriam os fatores determinantes da variação das freqüências dos alelos do loco Est-2. Simulações em computador mostraram que a evolução de locos enzimáticos é mais provável ser limitada pela taxa de mutação do que por seleção natural (Skibinsk & Ward, 1998), que atuaria modificando freqüências aloenzimáticas, mas não o suficiente para determinar a evolução delas, sendo mais provável a interferência da taxa de mutação.

A taxa de mutação, porém, não explica o desvio significante no Equilíbrio de Hardy-Weinberg apresentado na amostragem dos indivíduos submetidos a resíduos larvais intra-específicos. Apesar desse desvio relacionado ao meio com resíduos intra-específicos, a distribuição das freqüências de cada um dos alelos nos outros tipos de meio condicionado não foi muito variável. Além disso, o Teste Exato para a comparação da homogeneidade das freqüências alélicas e genotípicas não acusou desvio significante em nenhuma das comparações envolvendo os resultados obtidos para os diferentes tipos de meio, indicando que o desvio no Equilíbrio de Hardy-Weinberg é meramente casual, e que os resíduos larvais intra e interespecíficos não atuaram seletivamente sobre o polimorfismo.

Em larvas de drosofilídeos, a competição pode se processar tanto devido a uma elevada densidade larval, reduzindo o alimento disponível (Amoudi *et al.*, 1993) quanto pela liberação de resíduos e resíduos larvais produzidos pelas larvas no meio onde ocorre a interação entre elas (Barker, 1983; Budnik & Cifuentes, 1993; Budnik *et al.*, 2001). Estes resíduos interfeririam ou promoveriam o crescimento de leveduras ou outros recursos alimentares necessários à sobrevivência e ao desenvolvimento destes drosofilídeos, reduzindo ou facilitando o desenvolvimento destes (Weisbrot, 1966).

unesp

O tempo de desenvolvimento de *Z. indianus* não foi afetado por nenhum tipo de competição, porém a viabilidade sim. No meio não condicionado e no com resíduos intra-específicos, indivíduos de *Z. indianus* apresentaram praticamente a mesma viabilidade, porém, nos meios contendo resíduos de *D. sturtevanti*, ocorreu redução na viabilidade, indicando um possível efeito deletério deles sobre a viabilidade de *Z. indianus*. Nenhum tipo de condicionamento afetou significantemente a viabilidade de *D. sturtevanti*, porém o tempo de desenvolvimento desta espécie foi reduzido na presença de resíduos larvais tanto intra quanto interespecíficos, sugerindo um possível papel facilitador dos resíduos larvais existentes no meio condicionado, sobretudo o proveniente de *D. sturtevanti*. O mesmo ocorreu com *D. simulans*, que teve seu tempo de desenvolvimento reduzido quando exposta a algum tipo de resíduo larval. Porém, a presença de resíduos de *Z. indianus* no meio reduziu significantemente a viabilidade de *D. simulans*.

Sang (1949, *apud* Budnik *et al.*, 2001) afirmou que os resíduos larvais não somente podem estar relacionados a fatores que reduzam a viabilidade e aumentem o tempo de desenvolvimento como também podem atuar como facilitadores. Por exemplo, a viabilidade pré-adulta é aumentada em *D. willistoni* e *D. simulans* quando elas crescem em um meio com resíduos de sua própria espécie (Budnik & Brncic, 1976; Budnik, 1980), mas em *D. pavani*, ocorreu a redução da viabilidade quando exposta a resíduos larvais intra-específicos (Budnik, 1977).

Budnik & Cifuentes (1995) encontraram diferentes padrões de viabilidade e tempo de desenvolvimento em estudos de competição interespecífica envolvendo *D. pseudoobscura* de diferentes regiões geográficas. Os autores concluíram que cada população geográfica tem seu próprio reservatório genético como resposta à história das interações entre espécies que habitam uma mesma região geográfica. Considerando



esta afirmação, para melhor se entender a dinâmica das populações de *Z. indianus* ao que se refere à resposta a competidores, seria necessário estudar, em várias populações, o grau de decomposição do meio de cultura, o tempo de estabelecimento dos estoques em estudo, bem como um conhecimento prévio a respeito da composição genética dos indivíduos que emergem do meio condicionado, entre outras variáveis.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as interações entre os estádios pré-adultos de *Z. indianus*, *D. sturtevanti* e *D. simulans* nos ambientes de ovoposição podem afetar a abundância relativa de cada uma das três espécies ao longo do tempo, levando à eliminação de uma ou mais espécies competidoras ou à coexistência entre elas. Outras espécies invasoras de drosofilídeos, tais como *D. simulans* e *D. malerkotliana*, entraram em equilíbrio com populações nativas, após uma explosão demográfica das populações destas espécies. Evento semelhante poderá ocorrer também com as populações brasileiras de *Z. indianus*.

Este estudo teve o objetivo de analisar o polimorfismo de *Z. indianus*, nas fases iniciais da colonização, bem como, se uma população recém-estabelecida poderia exercer algum impacto sobre as populações locais de drosofilídeos. Análises das variações temporais da variabilidade genética, da abundância e da interferência de populações de *Z. indianus* sobre as populações de espécies locais, em diferentes regiões geográficas, podem fornecer informações importantes para se avaliar o impacto das atividades humanas sobre a fauna e flora nativas.

unesp

VI. CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

Em relação à população de *Z. indianus* estudada neste trabalho é possível se traçar as seguintes conclusões:

1) apresenta cinco locos esterásicos diferentes sendo três deles monomórficos, Est-3, Est-4 e Est-5; e dois polimórficos, Est-1, Est-2, com dois e quatro alelos, respectivamente;
2) a enzima EST-5 é uma colinesterase do *cluster* α, com possível relação filogenética com a AChE de *D. melanogaster*, e em decorrência, sua função pode estar relacionada à transmissão do impulso nervoso;
3) as enzimas EST-1 e EST-4 são carboxilesterases do *cluster* β, a primeira com expressão restrita a machos e a segunda com expressão aumentadas nestes, com um possível papel na biologia reprodutiva da espécie;
4) a enzima EST-3 é do *cluster* α, com possível atividade e expressão relacionadas a indivíduos expostos a condições ambientais mais drásticas, tais como estresse hídrico e alimentar;
5) as enzimas provenientes do loco Est-2 são carboxilesterases do *cluster* α, com o aminoácido serina em seu sítio ativo e com provável função relacionada à degradação de proteínas portadoras de grupos ésteres ligados a grupos de ácidos carboxílicos. A associação entre maior umidade ambiental e maior freqüência do alelo *1* deste loco sugere que esta variante ambiental possa atuar como fator seletivo, não sendo excluídos entretanto efeitos de outros fatores evolutivos. Meio de cultura contendo resíduos larvais de diferentes espécies não influenciou a distribuição das freqüências dos alelos do loco Est-2;



6) resíduos de *Z. indianus* afetam viabilidade e tempo de desenvolvimento de *D. simulans* e estes componentes do valor adaptativo também são afetados, em *Z. indianus*, por resíduos de *D. sturtevanti*. Estes efeitos sobre componentes do valor adaptativo podem levar, ao longo da evolução das interações competitivas entre *Z. indianus*, *D. sturtevanti* e *D. simulans*, dentre outros drosofilídeos que ocupem o mesmo nicho que *Z. indianus*, à eliminação de uma ou mais espécies competidoras ou à coexistência entre elas. Como outras espécies invasoras de drosofilídeos entraram em equilíbrio com populações nativas, é provável que evento semelhante possa ocorrer também com as populações brasileiras de *Z. indianus*.

VII. RESUMO

VII. RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética de uma população de *Zaprionus indianus*, espécie recém-introduzida no Brasil, e suas interrelações pré-adultas com outros drosofilídeos. As esterases foram caracterizadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida para avaliar a ocorrência de polimorfismos, bem como o efeito de resíduos larvais e a variação temporal do polimorfismo do loco Est-2. Os efeitos destes resíduos na viabilidade e no tempo de desenvolvimento em *Z. indianus*, *D. simulans* e *D. sturtevanti* foram utilizados para avaliar interações competitivas pré-adultas através de condicionamento do meio de cultura com resíduos larvais.

As análises detectaram polimorfismo para dois (Est-1 e Est-2) e monomorfismo para três (Est-3, Est-4 e Est-5) dos locos esterásicos. EST-1 e EST-4, β-esterases (carboxilesterases), foram mais expressas em machos, porém EST-1 foi restrita a eles ou a fêmeas recém-copuladas, indicando algum papel na reprodução. EST-2 (carboxilesterase/serino-esterase), EST-3 e EST-5 (colinesterase) são do *cluster* α. EST-3 raramente foi detectada, podendo sua expressão estar relacionada a estresse alimentar. EST-5 tem possível atividade neurotransmissora e alguma relação com a AChE de *D. melanogaster* e EST-2 tem provável papel na degradação de substratos protéicos.

Dos quatro alelos identificados no loco Est-2, os alelos *1* e *4* foram os mais freqüentes entre Outubro/2001 e Dezembro/2002, sendo suas freqüências possivelmente afetadas pela umidade ambiental, mas não pelos resíduos larvais intra e interespecíficos contidos no meio de cultura. Os dados indicaram as interações pré-adultas entre *Z. indianus*, *D. sturtevanti* e *D. simulans* poderão afetar a abundância relativa destas espécies ao longo do tempo, pois a viabilidade de *Z. indianus* foi reduzida

por resíduos de *D. sturtevanti*, e seus resíduos produziram redução da viabilidade em *D. simulans*.

Palavras-Chaves: *Zaprionus*; esterases; polimorfismo; valor adaptativo, interações competitivas.

VIII ABSTRACT

VIII. ABSTRACT

VIII. ABSTRACT

This study had as a goal to analyse the genetic variability of a *Zaprionus indianus* population, a recently-introduced species in Brazil, and the preadult interrelations among other *Drosophilidae*. The esterases were characterized through poliacrilamide gel electrophoresis to evaluate the occurrence of polymorphisms, as well as effects of larval residues and the time variation of the polymorphisms in the *locus* Est-2. The effects of these residues in the viability and in the developmental time in *Z. indianus*, *D. simulans* ad *D. sturtevanti* were used to evaluate preadult competitive interactions through to the conditioning of the culture medium with larval residues.

The analyses detected polymorphism for two (Est-1 and Est-2) and monomorphism for three (Est-3, Est-4 e Est-5) of the esterase *loci*. EST-1 and EST-4, β-esterases (carboxylesterases), were more expressed in males, yet EST-1 was restricted to them or to recently-copulated females, indicating a certain role in the reproduction. EST-2 (carboxylesterase/serino-esterase), EST-3 and EST-5 (cholinesterase) are from *cluster* α. EST-3 was rarely detected and its expression might be related to food stress. EST-5 has possible neurotransmissional activity and some relation with the AChE of *D. melanogaster* and EST-2 probably performs a role in the hydrolyse esters of protein.

From the four aleles identified in the *locus* Est-2, aleles 1 and 4 were the most frequent ones between October/2001 and December/2002, and their frequencies were possibly affected by the environmental humidity, but not by the intra and interspecific larval residues countained in the culture medium.. The data indicated that the preadult interactions among *Z. indianus*, *D. sturtevanti* e *D. simulans* may affect the relative abundance of these species throughout time, for the viability of *Z. indianus* was

reduced by residues of *D. sturtevanti*, and its residues produced the redution of the viability in *D. simulans*.

Key-Words: *Zaprionus*; esterases; polymorphism; fitness, competitive interactions.

unesp

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOUDI, M.A. *et al.* Effects of larval population density on the life cycle parameters in *Zaprionus indiana* Gupta (Diptera: Drosophilidae). *Pakistan J. Zool.*, v. 25 (1), p. 37-40, 1993.

AMOUDI, M.A. *et al. Zaprionus indiana* (Diptera: Drosophilidae) in Saudi Arabia and the effect of temperature on the life cycle. *J. King Saud Univ. Sci.*, v. 3, p. 25-35, 1991.

ATKINSON, W.D. A field investigation of larval competition in domestic Drosophila. *J. Anim. Ecol.*, v. 48(1), p. 91—102, 1979.

BARKER, J.F.S. Sequential gel electrophoretic analysis of esterase-2 in two populations of *Drosophila buzzatii. Genetica (Dordrecht)*, v.92, n.3, p.165-175, 1994.

BARKER, J.S.F. *et al.* Temporal and microgeographic variation in allozyme frequencies in a natural populations of *Drosophila buzzatti. Genetics*, v. 112, p.577-611, 1986.

BARKER, J.S.F. Interspecific competition. *Ashburner, Carson, Thompson*, 285--341, 1983.

BARKER, J.S.F., EAST, P.D., WEIR, B.S. Temporal and microgeographic variation in allozyme frequencies in a natural population of Drosophila buzzatii. *Genetics*, v. 112, p.577--612, 1986.

BENNET-CLARK, H.C.; LE ROY, Y.; TSACAS, L. Species and sex specific songs and courtship behaviour in the genus *Zaprionus* (Diptera: Drosophilidae). *Anim. Behav.*, v.28, p.230-235, 1980.

BOS, M. Mutual facilitation between larvae of *D.melanogaster* cultured. In sterol mutante. *Evolution*, v.33, p. 768-771, 1979.

BRADY, J.P. *at al.* Clonig of the esterase-5 locus from Drosophila pseudoobscura and comparison with its homologue in *D. melanogaster. Mol. Biol. Evol.*, v.7, p.525-546, 1990.

BRADY, J.P. e RICHMOND, R.C. Molecular analysis of evolutionary changes in the expression of *Drosophila* esterases. *Proc. Nat. Acad. Sci.* USA, v.87, p.8217-8221. 1990.

BRADY, J.P.; RICHMOND, R.C. An evolutionary model for the duplication and divergence of esterase genes in *Drosophila. J. Mol. Evol.*, v.34, n.6, p.506-521, 1992.

BRNCIC, D. Coexistencia de diferentes especies de Drosophila en frutas fermentadas naturalmente. *Médio Ambiente*, v. 8, p. 3-9, 1987.

BRNCIC, D. e BUDNICK, M. Effects of larval biotic residues on chromossomal polymorphism of *Drosophila pavani. Evolution*, v. 30, p. 146-151, 1976.

BUDNIK, M. & BRNCIC, D. Effects of larval biotic residues on chromosomal polymorphism of *Drosophila pavani*. *Evolution*, v. 30, p. 146-151, 1975.

BUDNIK, M. & BRNCIC, D. Effects of larval biotic residues on viability in four species of *Drosophila*. *Evolution*, v. 29, p. 777-780, 1976.

BUDNIK, M. & BRNCIC, D. Preadult competition between colonizing populations of *Drosophila subobscura* and established populations of *Drosophila simulans* in Chile. *Oecology*, v. 58, p. 137-140, 1983.

BUDNIK, M. & BRNCIC, D. Preadult competition between *Drosophila pavani* and *D. Melanogaster*, *D. simulans* and *D. wilistoni*. *Ecology*, v. 55, p. 657-661, 1974.

BUDNIK, M. *et al.* Preadult interactions between Drosophila simulans and D.willistoni (Diptera: drosophilidae) emerged from the same substrata. *Acta ent. Chil*, v. 25, p.21—26, 2001.

BUDNIK, M. The inhibition of Drosophila pavani preadult viability by different concentrations of larval biotic residues.*Cienc. e Cult.*, v. 29, p. 675--676, 1977.

BUDNIK, M., CIFUENTES, L. Further studies of preadult competition between European and Chilean stocks of Drosophila subobscura and the Chilean species Drosophila pavani. *Evol. Biol., Bogota*, v.8-9, p.37--47, 1995.

CERON, C. R. et al. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in embroiderin hoop. *Rev. Brasil. Genet.*, v.15, p.201-3, 1992.

CERON, C.R. Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri, D. arizonensis* e seus híbridos. 1988. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética) – Instituto de Biociências (USP). Ribeirão Preto (SP).

CHASSAGNARD, M. Les espèces africaines du sous-genre *Zaprionus* S.STR. à six bandes thoraciques (Diptera: Drosophilidae) *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, v. 32, n. 1, p. 59-65. 1996.

CHASSAGNARD, M. & TSACAS, L. Les sous-genre *Zaprionus* S.STR. Définition de groupes d'espèces et révision du sous-groupe *vittiger* (Diptera: Drosophilidae) *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, v. 29, n. 2, p. 173-194. 1993.

DANFORD, N.D., & BEARDMORE, J.A. Biochemical properties of Esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, v. 17, p.1-22, 1979.

DAWOOD, M.M., STRICKBERGER, M.W. The effect of larval interaction on viability in Drosophila melanogaster. *Genetics*, v. 63, p.201—211, 1969.

DOBZHANSKY, T. *Genetics of the evolutinary process.* Columbia University Press: New York, 1970.

EAST, P.D. Non-specific esterases of Drosophila buzzatii. In: Ecological genetics ond evolution. The cactus-yeast-*Drosophila* model system. I.S.F. Baker and W.T. Stamer editors. Academic press, Australia, p.323-338,1982.

ECONOMOS, A.C., LINTS, C.V., LINTS, F.A. Temperature and larval density effects on Drosophila development: novel studies of underlying

mechanisms employing control of the amount of yeast and medium consumed by the larvae. *Europ. Dros. Res. Conf.*, v. 7, 1981.

FOUNIER, D. et al. Biochemical characterization of the esterases A1 and B1 associated wth organophosphate resistence in *Culex pipiens* L. complex. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v.27, p.211-217, 1987.

FUTUYMA, D. J. Biologia Evolutiva. Ribeirão Preto: SBG, 1992. 635p.

GEER, B.W.; DYBAS, L.; SHANNER, L.J. Alcohol dehydrogenase and ethanol tolerance at the celular level in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.*, v.250, p.22-29, 1989.

GIBSON, J.B. *et al.* Genetic variation at the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster* in relation to enviromental variation: Ethanol levels in breeding sites and allozyme frequencies. *Oecologica*, v.51, p.191-198, 1981.

GONZÁLES-CANDELAS, F.; MÉNSUA, J.L.; MOYA, A. Larval competition in *Drosophila melanogaster*: effects on development time. *Genetica*, v. 82, p.33-44, 1990.

GRADBOLE, N.N. & VAIDYA, V.G. A new species of Drosophilidae from Poona (Índia): *Zaprionus* (*Zaprionus*) *paravittiger* sp. nov. *Drosophila Information Service*, v. 48, p. 135-136, 1972.

GUERRERO, F. D et al. Esterase profiles of diazion-susceptible and-resistant horn flies (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.*, v.92, p.286-292, 1999.

GUPTA, J.P. Description of a new species of *Phorticella Zaprionus* (Drosophilidae) from India. *Proceedings of the Indian Science Academy*, v. 36B, p. 62-70, 1970.

HEALY, M.J. *at al* Biochemical and phisiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster, Biochem. Genet.*, v.29, n.7/8, p.365-388, 1991.

HEDRICK, J.L., SMITH, A.J. Size and chjarge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, V.126, p. 155-164, 1968.

HEINSTRA, P.W.H. Evolutionary genetics of *Drosophila* alcohol desidrogenase gene-enzyme system. *Genetica.*, v.92, p.1-22, 1993.

HEINSTRA, P.W.H. *et al.* Metabolic physiology of alcohol desidrogenase and adaptation in *Drosophila* larvae as studied by means of carbon-13 nuclear n/magnetic resonance spectroscopy. *Insect Biochem.*, v.20, p.343-348, 1990.

HEMMAT, M., EGGLESTON, P. Competitive interactions in Drosophila melanogaster: genetic variation for interference through media conditioning. *Heredity*, v. 61, p.347—354, 1988.

HOPKINSON, D.A. Isosymes. *J. Clin. Pathol.* v.24 (suppl.), n.8, p.122-127, 1974.

HUANG, S.L., SINGH, M.; KOJIMA, K. A study of frequency dependent selection observed in the esterase-6 locus of *Drososphila melanogaster* using a conditioned media method. *Genetics*, v.68, 97-104, 1971.

HUBBY, J.L., LEWONTIN, R.C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural population. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura. Genetics*, v. 54, p.577-594, 1966.

JOHNSON, F. M., BALLE, S. Isoenzyme variability in species of the genus *Drosophila*. V. Ejaculatory bulb esterases in *Drosophila* phylogeny. *Biochem Genet*. v.2, p.1-18, 1968.

JONES, G. *et al.* Structure, expression and gene sequence of a juvenile hormone esterase-related protein form metamorphosing larvae of *Tricoplusia ni. Biochem. J.*, v. 83. P.398-407,1999.

KAMBYSELLIS, M.P. e*t al.* Isozyme variability ins 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.249-265, 1968.

KARAN, D. *et al.* Geographical clines for quantitative traits in natural populations of a tropical drosophilid: *Zaprionus indianus. Genetica*. v. 108, p. 91-100, 2000.

KAROTAM, J. et al Nucleotide variation at the hypervariable estarase 6 osozyme locus of *Drosophila simulans. Mol. Biol. Evol.*, v.12, n.1, p.113-122, 1995.

KAROTAM, J., OAKESHOTT, J.G. Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. *Heredity*, v.71, p.41-50, 1993.

KAUR, P. & PARKASH, R. Developmental variation & tissue localization of esterases in *Zaprionus paravittiger*. *Indian Journal of Experimental Biology*, v.17, p. 537-538, 1978.

KAUR, P. & PARKASH, R. Ontogenetic esterase isozymes & their significance in *Zaprionus paravittiger*. *Indian Journal of Experimental Biology*, v.17, p. 644-646, 1979.

KIMURA, M. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge Univ. Press, Cambridge 1983.

KREITMAN, M. Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *D. melanogaster*. *Nature*, v.304, p.412-7,1983.

LACHAISE, D. Anatomie de l'appareil reproducteur et foncionnement des pièces génitales chez *Zaprionus inermis* (Diptera: Drosophilidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, v. 8, p. 127-139. 1972.

LAPENTA, A.S. Caracterização de espécies de *Drosophila* do "cluster" buzzatii, com base nos padrões de esterases, Tese de Doutorado, Dpto. de Biologia, Instituito de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, 1998.

LAPENTA, A.S. *et al.* Esterase patterns and phylogenetic relationships of species and strains included in the *Drosophila buzzatti cluster*. *Cytobios*, v. 96(382), p. 95-107, 1998.

LAPENTA,A.S. et al Esterase pattens of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. *Cytobios*, v.84, p.13-29, 1995.

LEWONTIN, R.C. The genetics basis of evolutionary change. Columbia Univ. Press, New York, 1974.

LEWONTIN, R.C., HUBBY, J.L. A molecular approach to the study og genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, v.54, p.595-609, 1966.

MANE, S.D. *et al.* Studies of esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, v. 21, p.1019-1040, 1983.

MARKERT, C.L., MULLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specifc patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci,*, USA, v.45, p.753-763, 1959.

MATEUS, R.P. Variação enzimática em populações naturais de*Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). Tese de doutorado, Dpeto. de Genética, Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto. 2001.

MATEUS, R.P. *et al.* Caracterização da esterase larval em diversas espécies d*rosophila* do complexo mulleri (grupo repleta). *Rev. Bras. Gen.*; v.19 (suplemento), p.263, 1996.

MÉNSUA, J.L. e MOYA, A. Stopped development in overcroded cultures of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*. V. 51, p.347-352, 1983.

MERÇOT, H. *et al.* Alcohol tolerance, ADH activity and ecological niche of *Drosophila* species. *Evolution*, v.48, p.747-757, 1994.

MILLER, M.P. Tool for population genetic analyses - TFPGA - 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author, 1997.

MITROFANOV, V.G., BRODSKAYA, T.V. Influence of the temperature and population density of the larvae on the appearance of mutations in Drosophila virilis. *Sov. Genet.*, v. 11(10), p.1244—1247, 1976.

MORAES, E.M. Estrutura de reprodução em uma população isolada de *Drosophila* sp. B, Dissertação de mestrado, Dpeto. de Genética, Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto. 2000.

MORALES, A.C. Dinâmica populacional em uma zona de contato entre espécies cactófilas de Drosophila nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Dissertação de Mestrado, Depto. de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, Ribeirão Preto, 2001.

MORTON, R. A., SINGH, R.S. The association betwen malathion resistance and acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster. Biochem. Genet.*, v.20, p.179, 1985.

MOURYA, D. T. et al. Changes in enzyme titres with age in four geographical strains of Aedes aegytpi and their association with insecticide resistance. *Med. Vet. Entomol.*, v.7, p.11-16, 1993.

NASCIMENTO, A.P. & CAMPOS BICUDO, H.E.M. Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the *saltans* subgroup (*saltans* group). *Genetica*, v. 114, 41-51, 2002.

OAKESHOTT, J.g. et al Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica*, v.90, p.239-268, 1993.

OAKESHOTT, J.G. et al. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica*, v.90, p.239-268, 1993.

OHBA, S. Analytical studies on the experimental popultion of *Drosophila*. 1.The effect of larval population density upon the pre-adult growth in *D. melanogaster* e *D. virilis* with special reference to their nutritional conditions. *Biol. J. Okayama Univ.* v. 7, p.87-125, 1961.

PALABOST, L. Inhibition et facilitation du développement lors de mise em compétition de deux souches de *D. Melanogaster. Arch. Zool. Exp. Gén*, v.114, p.491-512, 1973.

PARKASH, R & YADAV, J.P. Latitudinal clinal variation in *Zaprionus indianus* populations. *DIS*, v. 72, p.150-152, 1993.

PARKASH, R. et al Allozymic polymorphism in Indian natural populations of *Drosophila melanogaster. Korean Jorunal of Genetics*, v.15, n.3, p.187-202, 1993.

PARKASH, R. *et al.* Electrophoretic and cryptic genic variability in natural populations of *Zaprionus indianus. Proc. Indian Natn. Sci. Acad.*, v. B60, p. 75-82, 1994.

PARKASH, R.; YADAV, J.P. Geographical clinal variation at seven esterase encoding loci in Indian populations of *Zaprionus indianus*. *Hereditas*, v.119, p. 161-173, 1993.

PECSENYE, K. e MEGLÉCZ, E. Enzyme polimorphism in *Drosophila melanogaster* populations collected in two different habitats in Hungary. *Genetica*, v.96, 257-268, 1995.

PLACE, A.R., POWERS, D.A., SOFER, W. Structural basis of an alcohol dehydrogenase null mutant from Drosophila melanogaster. *Fed. Proc.*, v. 38(3 Pt 1):497, 1979.

POLETTI, C.A. et al Molecular weight estimation of esterase isoenzymes from *Drosophila mulleri* by non-denaturating slab PAGE. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 26, 1997, Caxambu - MG. Programas e Resumos. Caxambu: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1997, p.18.

RAUSCHENBACH, I.Y. *et al.* Role of pupal esterase in regulation of hormonal status in two *Drosophila virilis* stocks differing in response to high temperature. *Develop. Genet.*, v.22, p. 65-80, 1994.

RAYMOND, M.L., ROUSSET, F. An exact test for population defferentiation. *Evolution*, v.49, p.1280-1283, 1995.

RICHMOND, R.C. SENIOR, A. Esterase 6 of Drosophila melanogaster: kinetics of transfer to females, decay in famales end males recovery. *J. Insect Physiol.*, v.27, p.849-853, 1991.

SCIANDRA, R.J.; ABDEL-HAMEED, F.; BENNET, J. Chromossome complement of *Zaprionus multistritus*. *J. Hered.*, v. 64, p.31-34, 1974.

SERGEEV, P. V. et al. Regulation of tisse-specifc expression of the esterase S gene in *Drosophila virilis*. *Nucl. Acids Res.*, v.21, n.15, p.3545-3551, 1993.

SHEEHAN, K., RICHMOND, R.C., COCHRANE, B.J. Studies of esterase 6 in Drosophila melanogaster. *Insect Biochem.*, v. 9(5), p.443--450, 1979.

SKIBINSKI, D.O. F.; WARD, R.D. Are polymorphism and evolutionary rate of allozyme proteins limited by mutation or selection? *Heredity*, v.81, p.692-702, 1998.

SOMERO, G.N. Temperature adaptation of enzymes: biological optimization through structure-function compromises. *Annu. Ver. Ecol. Syst.*, v. 9, p. 1-17, 1978.

SPACKMAN, M.E. *et al.* A cluster of esterases genes on chromossome 3R of *D. melanogaster* includes homologues of esterases genes confering inseticidae resistance in *Lucila cuprina*. *Biochem. Genet.*, v.32, p.39-62,1994.

STEIN, C. P. *et al.* Mosca do figo *Zaprionus indianus*. *IAC-Boletim eletrônico* (http://www.iac.br/~cenfit/artigos/zaprionus/index.htm), 15/03/2000.

SWOFFORD, D.L., OLSEN, G.J. Phylogeny reconstruction. In: Hillis, D. M. and Moritz, C. (eds.), *Molecular Systematics*, Sinaur Associates Inc., Sunderland, p.411-501, 1990.

TADEI, W. J. Aptidão competitiva e coexistência em populações experimentais de *Drosophila*. 92 f. Tese (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Ribeirão Preto, 1973.

TSACAS, L. Family Drosophilidae, *In:*: R.W. CROSSKEY, Catalogue of the Diptera of de Afrotropical Region. British Museum: London, 1980a.

TSACAS, L. L´identité de *Zaprionus vittiger* Coquillet et révision des espèces afrotropicales affines. *Bull. Soc. Ent. Fr.*, v. 85, p. 141-153, 1980b.

TSACAS, L. *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 noveau nom pour le plus commum des *Zaprionus* africains (Diptera: Drosophilidae). *Annls. Soc. Ent. Fr.*, v. 21 (3), p. 343-344, 1985.

TSACAS, L.; LACHAISE, D.; DAVID, J. Composition and biogeography of the afrotropical drosophilid fauna. In: ASHBURNER, M.; CARSON, H.L.I.; THOMPSON, J.N. (eds). *The genetics and biology of Drosophila*. v.3ª, Londres: Academic Press, p.197-259, 1981.

VILELA, C.R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? *Drosophila Inf. Serv.*, v. 82, 1999.

WAGNER, R.P., SELANDER, R. K. Isozymes in insects and their significance. *Ann. Rev. of Entomol.*, v.19, p.117-139, 1974.

WALKER, C.H., MACKNESS, M.I. Esterases: problems of identification and classification. *Biochem Pharmacol.*, v.32, p.3265-3269, 1983.

WALKER, R.P., SELANDER, R.K. Isozymes in insects and their significance. *Annual Review of Enmtomology*, v.19, p.117-138, 1974.

WEISBROT, D.R. Genotypic interactions among competing strains and species of Drosophila. *Genetics*, v. 53, p.427—435, 1966.

YADAV, J.P. & PARKASH, R Ethanol tolerance and ADH gene frequencies in Indian populations of *Zaprionus indianus*. *DIS*, v. 72, p.152-154, 1993.

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.

Autorizo a reprodução em fotocópia deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa.

São José do Rio Preto, 26 de fevereiro de 2003.

Luis Gustavo da Conceição Galego

