

Ana Paula Peres Freschi

Uso de Marcadores de AFLP no Estudo do
Polimorfismo de DNA em *Drosophila saltans*,
Drosophila prosaltans e seus Híbridos em
Populações Experimentais





1910001062



ANA PAULA PERES FRESCHI

**Uso de Marcadores de AFLP no Estudo do
Polimorfismo de DNA em *Drosophila saltans*,
Drosophila prosaltans e seus Híbridos em
Populações Experimentais**



**Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Genética.**

**São José do Rio Preto - SP
2002**

Xeroxado

ANA PAULA PERES FRESCHI

**Uso de Marcadores de AFLP no Estudo do
Polimorfismo de DNA em *Drosophila saltans*,
Drosophila prosaltans e seus Híbridos em
Populações Experimentais**



Dissertação apresentada
para obtenção do Grau de
Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Marlene Kiyoni Hosaki Kobayashi

Co-Orientador: Prof. Dr. Wlademir João Tadei

São José do Rio Preto - SP

2002

575
F884u

20204000

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



unesp

Instituto De Biociências, Letras e Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Genética

ANA PAULA PERES FRESCI

Uso de Marcadores de AFLP no Estudo do Polimorfismo de DNA em *Drosophila saltans*, *Drosophila prosaltans* e seus híbridos em populações experimentais.

Freschi, Ana Paula Peres.

Uso de marcadores de AFLP no estudo do polimorfismo de DNA em *Drosophila saltans*, *Drosophila prosaltans* e seus híbridos em populações experimentais. / Ana Paula Peres Freschi. –São José do Rio Preto : [s.n.], 2002.

114 f. : il. : 30 cm.

Orientadora: Marlene Kiyoni Hosaki Kobayashi.

Co-Orientador: Wladimir João Tadei.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. *Drosophila*. 2. AFLP. 3. Híbridos. 4. Populações. 5. DNA; 6. Marcadores Moleculares. I. Hosaki-Kobayashi, Marlene Kiyoni. II. Tadei, Wladimir João. III. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas. IV. Título

CDU – 575

São José do Rio Preto - SP

2002



ANA PAULA PERES FRESCHI

**USO DE MARCADORES DE AFLP NO ESTUDO DO
POLIMORFISMO DE DNA EM *Drosophila saltans*, *Drosophila
prosaltans* E SEUS HÍBRIDOS EM POPULAÇÕES EXPERIMENTAIS**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador:.....

2° Examinador:.....

3° Examinador:.....

São José do Rio Preto, ____/____/____.

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – SP, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, sob a orientação da Profa. Dra. Marlene Kiyoni Hosaki Kobayashi e co-orientação do Prof. Dr. Wladimir João Tadei, com o auxílio-bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.



À minha Família.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado graças à colaboração, direta ou indireta, de pessoas que fizeram parte de minha vida, antes e durante o seu desenvolvimento. Esperando poder expressar sempre com gestos e atitudes, manifesto minha gratidão.

À querida orientadora Profa. Dra. Marlene Kiyoni Hosaki Kobayashi, pelo estímulo, otimismo e confiança em mim depositada em todas as etapas deste trabalho. Agradeço pela postura profissional e dedicação, não poupando esforços para a realização deste trabalho. E principalmente pela amizade, carinho e apoio, em nossa formação científica.

Ao Prof. Dr. Wladimir João Tadei, co-orientador deste trabalho, por ter confiado em mim desde os estágios de iniciação científica. Agradeço pelo incentivo, entusiasmo e dedicação irrestrita durante todo o tempo em que trabalhamos juntos. Considero mais que orientador, é o amigo de todas as horas, estando sempre disponível intelectualmente e moralmente, despertando-nos censo crítico e científico.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, pela utilização das instalações desta unidade.

Ao Conselho Nacional Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio financeiro.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Genética do IBILCE-UNESP, pelo apoio prestado sempre que solicitado.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pela boa vontade e disponibilidade na discussão de parte do trabalho além das valiosas

sugestões e também, pela utilização das dependências do Laboratório de Genética Molecular para o aprendizado da técnica.

À Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, pelo incentivo, sugestões e interesse demonstrados, e principalmente amizade e também, por acolher-me no Laboratório de Vetores para realização das análises moleculares.

Aos professores da Pós-graduação, pelo conhecimento e experiência profissional que me proporcionaram, em especial Prof. Dr. Antônio José Manzato, Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, Profa. Dra. Cláudia Márcia Carareto, Prof. Dr. José Osmar Gaspar, Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi, Profa. Dra. Maria Elisabete Jorge Amaral, Profa. Dra. Maria Tercília A. Vilela.

Aos senhores Paulo A. Mazieiro e Sebastião D. Barbosa pelo zelo na elaboração do meio de cultura.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Biologia do IBILCE – UNESP.

À Profa. Dra. Diva Cardoso de Camargo do Departamento de Letras, pela revisão do *Abstrat*.

Aos colegas de Pós-graduação: Adriana P. Nascimento, Alessandra A. Bernardo, Alessandra T. Laranja, Ana Cláudia Maritan, Ana Cristina G. César, Carina Giunco, Cássia Cardoso de Oliveira, Cláudia A. Pacheco, Grasiela D. de C. S. Aguiar, Lilian Castiglioni Ruiz, Luiz Gustavo da C. Galego, Paula J. Zamaro, Rita de Cássia de Sousa Polezzi, Sandra R. de C. Marchesin, Sylvia Cortezzi e Thaísa V. G. Arakawa, pela amizade e apoio que sempre me proporcionaram.

À *Life Technologies* pelo patrocínio de um Kit "AFLP Analysis System I".



Ao amigo Guilherme Rocha Lino de Souza, Universidade Federal de Uberlândia, pelo carinho e dedicação que teve por mim durante minha estada nesta instituição.

Às amigas Carla M. Y. Lemos e Janaína Radespiel, por todos os momentos que passamos juntas e todo o apoio que me foi dado.

À *Drosophila* que cedeu sua vida para o desenvolvimento da Genética.

Neste momento manifesto minha eterna gratidão àqueles que são para mim exemplo de dedicação, carinho e amor, meus pais Jandyra e Osório, por tudo o que fizeram para que eu chegasse até aqui e pelo amor que demonstram ter. A minha querida irmã Camila, por ser tão presente e amiga.

A todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

À Deus e à Espiritualidade Maior, agradeço, pela companhia e dedicação, e oportunidade de aprendizado e evolução.



SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO.....	1
II.	OBJETIVOS.....	16
III.	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
III.1.	Material Biológico.....	17
III.2.	Populações Experimentais.....	17
III.2.1	Longevidade.....	19
III.2.2	Análise Estatística.....	21
III.3.	Análise Molecular.....	22
III.3.1.	Grupo Externo.....	22
III.3.2.	Híbridos Interespecíficos.....	23
III.3.3.	Extração do DNA Genômico.....	24
III.3.3.1.	Quantificação do DNA.....	24
III.3.4	Princípios da Tecnologia de AFLP.....	25
III.3.4.1.	Restrição.....	25
III.3.4.2.	Ligação dos Adaptadores.....	26
III.3.4.3.	Pré-amplificação.....	26
III.3.4.4.	Amplificação Seletiva.....	27
III.3.4.5.	Separação dos Fragmentos Amplificados.....	28
III.3.4.6.	Coloração por Nitrato de Prata.....	29
III.3.4.7.	Análise Estatística dos resultados.....	30
IV.	RESULTADOS.....	31
IV.1.	Análise Populacional.....	31
IV.2.	Análise Molecular.....	55
V.	DISCUSSÃO.....	79

VI	CONCLUSÕES.....	79
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
VIII	RESUMO.....	101
IX	ABSTRACT.....	103

I. INTRODUÇÃO

O conceito de espécie mais aceito entre os biólogos evolucionistas é o conceito biológico de espécie, que enfatiza os mecanismos de isolamento reprodutivo para a manutenção de sua integridade. Assim, uma espécie pode ser definida como uma população ou grupos de populações naturais com características morfológicas semelhantes, constituídas por indivíduos que podem acasalar-se, real ou potencialmente, sendo isoladas reprodutivamente de outras populações semelhantes (Mayr 1940, 1963). A função dos mecanismos de isolamento reprodutivo seria impedir o fluxo gênico entre populações, evitando assim a destruição do sistema genético de uma espécie devidamente adaptada à determinados ambientes. Segundo Levin (1979), a aplicação do conceito para populações separadas espacialmente não é vantajosa, pois o fluxo gênico pode ser limitado a distâncias tão curtas que populações muito separadas podem, virtualmente, evoluir independentemente.

População pode ser definida segundo Mayr (1970), como uma comunidade de indivíduos de uma determinada localidade, potencialmente em cruzamento. Para Stebbins (1974), populações próximas podem viver separadas por longo tempo estando sujeitas a pressões seletivas diversas, possibilitando o surgimento de diferenças marcantes. Por outro lado, duas populações separadas podem adquirir alta taxa de fluxo gênico, levando à formação de uma única população intercruzante. Há ainda casos em que populações relacionadas ocupam a mesma área de distribuição geográfica e não se intercruzam.

Provavelmente é uma regra geral que as espécies difiram em suas constituições gênicas, sendo essas diferenças genéticas manifestas de diferentes formas nos indivíduos através de características



morfológicas, fisiológicas, comportamentais, etc. (Dobzhansky, 1973). A diferenciação genética entre as populações pode ser tão grande que caracteres que afetam o intercruzamento difiram tanto que as populações possam ser definidas como espécies distintas (Futuyma, 1997).

O processo de especiação inicia-se pela ação dos mecanismos de isolamento reprodutivo que fecham sistemas genéticos coadaptados, protegendo-os de ruptura ou contaminação com outros sistemas genéticos pela hibridação, contribuindo para a manutenção da adaptação. O processo de adaptação leva ao aumento do valor adaptativo (W) resultando, assim, em elevação do estado-de-ser-adaptado. O processo pode levar a um aumento da taxa intrínseca de crescimento populacional através da frequência aumentada de indivíduos mais aptos a elevar o estado-de-ser-adaptado da população, pelo aumento da longevidade dos indivíduos, e pela produção de maior descendência em menor tempo.

Os modelos de especiação tem sido classificados historicamente pela localização geográfica das populações submetidas a processos de alopatria, simpatria e parapatría que direciona a processos inibitórios do fluxo gênico na evolução do isolamento reprodutivo. Alguns autores, como Via (2001), sugerem que uma classificação alternativa centralizada em mecanismos que dirigem a evolução do isolamento reprodutivo seria mais produtiva.

Há espécies que apresentam pequenas diferenças morfológicas, muitas vezes nenhuma diferença, ou que no conjunto pareçam idênticas, sendo estas conhecidas como espécies crípticas. Algumas espécies crípticas podem ter completado totalmente o processo de especiação e se tornado reprodutivamente isoladas sem adquirir diferenças morfológicas. O isolamento etológico é provavelmente o

principal mecanismo de isolamento reprodutivo que impede as trocas gênicas entre as populações de espécies crípticas na natureza. A evidência mais conclusiva da falta de fluxo gênico entre estas espécies é que cada uma delas tem seu próprio conjunto de polimorfismos cromossômicos, que não são encontrados na outra espécie críptica (Dobzhansky e Epling, 1944, *apud* Dobzhansky, 1973).

Espécies crípticas são conhecidas em todos os grupos animais, mas são raras entre os vertebrados, havendo alguns casos em mamíferos. Também são raras entre as aves, mas são comuns em anfíbios e peixes. Estas espécies são encontradas comumente em artrópodes como ácaros, aranhas e crustáceos, sendo ainda mais comum em invertebrados inferiores como moluscos e vermes. Nos insetos é grande a frequência de espécies crípticas, ocorrendo em praticamente todos os grupos. Nos dípteros ocorre um grande número destas espécies, sendo bastante estudadas devido a importância médica (*Anopheles*, *Aedes*, *Simulium*), genética (*Drosophila*), ou citológica (*Sciara* e *Chironomus*) (Mayr, 1970).

Vários complexos de espécies crípticas foram estudados no gênero *Drosophila*, como os grupos: *melanogaster* (Provine, 1991), *auraria* (Kurokawa, 1960), *willistoni* (Winge, 1965), *ananassae* (Futch, 1966), e *saltans* (Bicudo, 1973a).

Estudos de especiação com espécies crípticas de *Drosophila*, onde híbridos são produzidos, mostraram que estes podem ser férteis por resgate de mutações (Sawamura *et al.*, 2000).

Representantes de diferentes espécies, crípticas ou não, podem eventualmente quebrar as barreiras do isolamento reprodutivo e produzir descendentes. Os termos "hibridação" e "híbrido" têm sido usados por diferentes autores para designar, respectivamente, cruzamentos e produtos de cruzamentos, entre espécies, raças ou



mesmo indivíduos de mesma população que diferem por um ou mais genes marcadores. Para Mayr (1963) híbridos são os descendentes de cruzamentos entre indivíduos de duas espécies diferentes. Segundo Stebbins (1950), há evidências de que, em alguns casos, a hibridação pode resultar no aparecimento de tipos novos, os quais podem apresentar vários graus de divergência e distinção em relação às populações parentais. Ainda segundo o mesmo autor, talvez os tipos novos mais freqüentes sejam novas raças ou subespécies que podem surgir da hibridação entre raças de mesma espécie.

Qualquer que seja o modo como são produzidos, o efeito dos processos de hibridação é produzir novas variantes, algumas das quais podem apresentar condições de explorar novas oportunidades evolutivas.

A especiação por hibridação é um processo simpátrico, quase instantâneo que pode originar uma nova espécie combinando os genomas das duas espécies parentais distintas (Bullini, 1994). Para Barraclough & Nee (2001), especiação por hibridação ocorre quando a hibridação entre duas espécies leva à formação de uma terceira espécie.

A hibridação pode ocorrer quando as barreiras que separam duas populações de mesma espécie ou de espécies diferentes são rompidas. Populações alopátricas podem expandir sua área de distribuição e tornarem-se simpátricas, ou quando mudanças ambientais criam oportunidades para intercruzamento.

Sob condições de laboratório, e algumas vezes também na natureza, algumas espécies que normalmente não se cruzam poderão fazê-lo, transpondo qualquer uma das barreiras pós-copulatórias para a troca gênica. Os híbridos F_1 podem não se desenvolver, podem se desenvolver mas não sobreviver na natureza ou podem, ainda, ser

estéreis. Os híbridos podem também ser férteis, embora, muitas vezes, sua fertilidade seja reduzida na comparação com os parentais.

Genótipos recombinantes híbridos são, em geral, menos aptos que os indivíduos das espécies parentais, simplesmente porque a maioria nunca foi testado pela seleção natural. Entretanto, mesmo genótipos híbridos podem ser mais aptos que os parentais podendo levar, direta ou indiretamente, à evolução do isolamento reprodutivo (Turelli *et al.*, 2001). Johannesson (2001) também afirma que híbridos são tão viáveis quanto as espécies parentais, quando não mostram sinais de incompatibilidade entre ecótipos.

Stebbins ressaltou a importância do isolamento sexual entre os animais, "talvez o mecanismo mais efetivo de isolamento", como fator que limita a hibridação. Esse mecanismo, pela sua natureza, não existe entre os vegetais. A hibridação natural é registrada nos vários grupos animais com diferentes freqüências. Em *Drosophila*, alguns casos de hibridação natural foram detectados pela análise de arranjos gênicos dos cromossomos das glândulas salivares, ou por meio de caracteres morfológicos. Para Stebbins (1959), a hibridação, no gênero *Drosophila*, parece ser tão rara que é difícil imaginar uma influência pronunciada desse processo na sua evolução. A literatura registra híbridos naturais entre várias espécies, tais como entre *D. mulleri* e *D. aldrichi* e entre *D. texana* e *D. flavomontana* (Patterson, 1952), entre *D. melanogaster* e *D. simulans* (Mourad & Mallah, 1960; Sperlich, 1962; Tracey *et al.*, 1973), entre *D. athabasca* e *D. azteca* (Sulerud & Muller, 1966), entre *D. pseudoobscura* e *D. persimilis* (Dobzhansky, 1973).

Dobzhansky (1936) analisando híbridos F₁ entre *Drosophila pseudoobscura* e *D. persimilis* admitiu que a esterilidade e inviabilidade freqüentemente surgem como um produto pleiotrópico de



evolução independente em linhagens geograficamente separadas: alelos que melhoram o valor adaptativo em um "background" genético "normal" podem ocasionalmente diminuir o valor adaptativo quando colocados juntos em híbridos com alelos de outra espécie.

A evolução do isolamento reprodutivo pode diferir da evolução de outras características entre as espécies. Parece provável que diferenças morfológicas ou fisiológicas entre as espécies geralmente aumentam em proporção ao número de substituições afetando tais características. O isolamento reprodutivo deve, contudo, aumentar rapidamente linearmente com o tempo.

O rompimento das barreiras de isolamento em experimentos de laboratório tem sido obtido com certa frequência em alguns grupos de espécies de *Drosophila*, relatado, como por exemplo, por Singh & Chatterjee (1987) e Carracedo *et al.*, (1998), embora a fertilidade, nestes casos, muitas vezes se mostra reduzida quando comparada com a dos parentais (Moraes, 1992; Marin *et al.*, 1993; Madi-Ravazzi *et al.*, 1997).

Hirai (1997) trabalhando com cruzamentos entre duas variantes de cor de corpo de *D. elegans* (preta e marrom) de diferentes regiões geográficas, constatou o desenvolvimento de isolamento reprodutivo pré-copulatório entre as variantes preta e marrom da mesma localidade, mas não entre linhagens de diferentes localidades da mesma variante.

Genes que afetam a inviabilidade de híbridos geralmente afetam ambos os sexos, enquanto genes que causam esterilidade normalmente afetam apenas um dos sexos. Machos híbridos podem acumular substituições durante a evolução mais rapidamente que as fêmeas (Orr, 1999). A esterilidade e a inviabilidade de híbridos envolve forte epistasia, com interações entre alelos de mesma espécie e alelos de espécies diferentes (Orr, 2001).



Hutter (1997) relata vários estudos sobre inviabilidade de híbridos entre espécies de *Drosophila*, citando os trabalhos de Sturtevant (1919, 1920, 1921) e Provine (1991) com híbridos entre *D. melanogaster* e *D. simulans*; Crow (1942) entre *D. mulleri* e *D. aldrichi*, Patterson & Griffen (1944); Yang & Wheeler (1969) entre *D. montana* e *D. americana*, *D. crucigera* e *D. bostrycha*; Mitrofanov e Sidorova (1981) entre *D. virilis* e *D. lummei* e Carvajal *et al.*, (1996) e Machado (1998) entre *D. buzzatii* e *D. koepferae*.

As espécies da mesma localidade parecem ser mais isoladas reprodutivamente entre si que espécies de localidades geográficas distintas (Tomisic *et al.*, 2001)

Em espécies do grupo saltans de *Drosophila*, os estudos do isolamento reprodutivo entre *D. prosaltans* e *D. saltans* mostraram que ambas as espécies são intercruzáveis em laboratório, mas a frequência de cruzamentos férteis (que produzem descendentes), varia conforme a procedência geográfica das linhagens (Bicudo, 1967, 1973a). As linhagens procedentes da Costa Rica, onde essas espécies são simpátricas, mostraram isolamento reprodutivo completo em laboratório. Quando alopátricas, híbridos F₁ machos e fêmeas são férteis em cruzamentos entre fêmeas de *Drosophila prosaltans* e machos de *D. saltans*, mas machos híbridos são estéreis no cruzamento recíproco.

Introgressão e hibridação são processos que podem ser responsáveis por grande parte da diversidade animal. Hibridação pode produzir diretamente táxons distintos, através de poliploidização ou produto de clones através de reprodução unisexual. Por sua vez, introgressão poderia eventualmente levar à estabilidade linhagens independentes definidas por uma única combinação de características. Em outro caso, diversificação taxonômica é melhor vista como um

sub-produto incidental, resultante de acúmulo de diferenças genéticas distintas e independência evolutiva (Dowling & Secor, 1997).

Hibridação introgressiva foi um termo proposto por Anderson e Hubricht (1938) para denominar um tipo especial de hibridação onde ocorre a "infiltração gradual do plasma germinativo de uma espécie em outra, como consequência da hibridação e retrocruzamentos repetidos". Isto significa que o processo ocorre quando híbridos F_1 são férteis e produzem alguma progênie F_2 em retrocruzamentos com uma ou outra espécie parental. A continuidade dos retrocruzamentos nas gerações subseqüentes tem, como consequência, a formação de genótipos recombinantes. A seleção preserva os recombinantes em que prevalecem genes da espécie parental envolvida nos retrocruzamentos. O resultado final dependerá de um balanço entre os genes deletérios e vantajosos do plasma germinativo estranho, nas áreas onde a hibridação ocorreu, ou nas áreas para as quais os híbridos puderam se estender.

A introgressão pode ser considerada um tipo especial de recombinação da qual resulta uma variabilidade maior que a resultante de recombinação intraespecífica. Isto porque, no primeiro caso, as trocas gênicas ocorrem entre populações de espécies que exploram o ambiente de algum modo diferentemente entre si, isto é, ocupam, na terminologia de Wright (1932, *apud* Dobzhansky, 1973), "picos adaptativos" diferentes, enquanto nas recombinações intraespecíficas as trocas gênicas ocorrem entre populações que ocupam um mesmo pico adaptativo (Sibley, 1954).

No gênero *Drosophila*, há alguns casos descritos de hibridação introgressiva natural, como os registros de Patterson & Stone (1952) envolvendo *D. americana*, *D. novamexicana* e *D. texana*. Há um

número relativamente maior de casos mencionados na literatura, porém resultam de experimentações em laboratório.

Atualmente, indivíduos não previamente identificados como produtos de introgressão podem ser detectados por técnicas moleculares como tendo características gênicas introgridas. Com advento de análises genéticas moleculares, agora é possível não só documentar a extensão da introgressão entre populações, mas também em nível de gêneros a que pertencem os indivíduos híbridos (Rhymer & Simberloff, 1996).

A introdução de dados moleculares no estudo taxônomico deve ajudar na resolução de algumas questões complexas, entretanto, até agora não foram resolvidas nem questões simples das relações filogenéticas. Por exemplo, dados moleculares geralmente contradizem aspectos muito importantes das revisões de Grimaldi da filogenia de *Drosophila* (Kwiatowski, 1999).

De acordo com Dowing & Secor (1997), táxons recombinantes estáveis têm sido estudados com base em vários tipos de características, incluindo morfologia, cromossomos, aloenzimas e DNA. Espera-se que híbridos sejam intermediários entre as formas parentais para características complexas, tais como as variações morfológicas. Entretanto, híbridos não são sempre morfológicamente intermediários entre os parentais (Neff & Smith, 1978; Ross & Cavender, 1981), e também, nem todos os intermediários morfológicos são híbridos (White, 1978; Wilson, 1992). Para as características mais simples (como por exemplo, aloenzimas e cariótipos) as populações poderiam apresentar uma distribuição equilibrada dessas variantes herdadas de todas as formas parentais. Por causa da proporção de variantes específicas que seriam influenciadas pela seleção e deriva, as contribuições parentais não persistiriam para

todos os conjuntos de caracteres, mas estes poderiam ser detectados por outros caracteres que poderiam ser identificados utilizando-se um diagnóstico alternativo para um ou mais *loci* aloenzimático ou pela análise de DNA mitocondrial de um táxon parental.

Com a utilização de marcadores isoenzimáticos foi possível entender um pouco mais sobre a estrutura genética de populações naturais analisando o fluxo gênico entre populações e os processos de hibridação natural (Van Heusden & Bachmam, 1992). A técnica é eficiente para se fazer estimativa direta de parâmetros, como frequências alélicas e determinar os coeficientes de diversidade gênica e heterozigose. A limitação da técnica pode residir em um número reduzido de *loci* enzimáticos e também muitas vezes, na ausência de polimorfismos.

Há várias vantagens na análise de DNA quando comparada com as técnicas de análise de proteínas. É possível fazer uma análise mais precisa do genótipo ao invés do fenótipo; determinadas seqüências gênicas podem ser selecionadas com base na taxa evolutiva ou modo de herança; em princípio, as técnicas são aplicáveis a qualquer tipo de organismo com DNA, até mesmo em quantidades muito pequenas.

Uma das aplicações mais comuns das técnicas moleculares baseadas em DNA, tem sido no estudo de filogenias (Hillis *et al.*, 1996). Atualmente, existem diversos métodos para a detecção de polimorfismo genético diretamente em nível de DNA. Em populações onde a variabilidade isoenzimática é baixa, análises com marcadores de DNA tornaram-se mais adequadas para pesquisar polimorfismos.

Na identificação de indivíduos híbridos, são necessários uma ou mais análises de marcadores nucleares tais como aqueles revelados pelo estudo de aloenzimas, DNA microssatélites, RAPD, e DNA nuclear de cópia única. Após cruzamentos a primeira geração de



híbridos (F_1) terá todos os seus *loci* heterozigotos com alelos específicos da população. Retrocruzamentos individuais entre as populações híbridas e parental terão varias combinações de genótipos dependendo do cruzamento e dos resultados da segregação mendeliana (Rhymer & Simberloff, 1996).

Segundo Grodzicher *et al.*, (1974) o primeiro marcador molecular em nível de DNA foi gerado a partir da clivagem enzimática desta molécula, com as chamadas enzimas de restrição, o que permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (Gibson, 1989; Gibson & Whittington, 1993; Hide *et al.*, 1994).

Várias outras técnicas de manipulação de material genético continuaram sendo desenvolvidas utilizando a combinação da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar seqüências específicas de DNA genômico.

Pequenas modificações na técnica de PCR original, levaram à descrição de outras classes de marcadores moleculares, como por exemplo, microssatélites (Beckmann & Soller, 1990; Su & Wellems, 1996; Wang *et al.*, 1999); RAPD - DNA polimórfico amplificado ao acaso - (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990; Waitumbi & Murphy, 1993) e mais recentemente, a técnica de AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição amplificados), descrita por Vos *et al.*, (1995).

O mais importante, do ponto de vista da genética da conservação, é o fato de que marcadores moleculares diferentes podem ter taxas de substituição/evolução diferentes, de modo que, através de uma escolha judiciosa desses marcadores, pode-se estudar desde problemas de identificação de indivíduos à identificação de espécies



crípticas ou formulação de hipóteses filogenéticas em grupos supraespecíficos (Matioli, 2001)

Segundo Maughan *et al.*, (1996), análise de segregação e estudos de ligação indicaram que marcadores de AFLP são herdados de maneira mendeliana e que eles segregam independentes uns dos outros. Todos os marcadores de AFLP examinados por ele mostraram um padrão de segregação dominante.

Marcadores moleculares disponíveis atualmente podem ser classificados como dominantes (RAPD e AFLP) ou codominantes (RFLP, microssatélite, aloenzimas). Marcadores codominantes são preferíveis à marcadores dominantes devido à maior informação contida. Um marcador molecular codominante mostra a descrição de genótipos homozigotos e heterozigotos em um gel de eletroforese. Para marcadores dominantes homozigotos dominantes e heterozigotos não podem ser distinguidos com base na presença ou ausência de bandas (Piepho & Koch, 2000). Entretanto, Reineke (1998) afirma que, marcadores de AFLP são codominantes, sendo importantes para o uso em organismos diplóides, tais como plantas e insetos.

Piepho & Koch (2000) estudando genotipagem de plantas, utilizaram populações F_2 de beterraba para descrever um método de análise codominante de dados de bandamento em um sistema de marcadores dominantes, quantificando o grau de amplificação de um fragmento. Este mesmo método também foi utilizado, em tomate, por Jansen *et al.*, (2001).

Cada uma das técnicas moleculares que estão disponíveis no momento, tem um poder de resolução específico, de modo que, nenhuma delas por si só é universalmente ideal, todas apresentam vantagens e desvantagens. O emprego de uma ou de outra, depende da aplicação que se quer fazer do DNA genômico (por exemplo, tipagem



do DNA ou mapeamento de marcadores de DNA), do tipo de organismo a ser investigado e da capacidade do laboratório. Por exemplo, marcadores de RAPD tem sido propostos como uma alternativa para marcadores de RFLP pois requerem pouco DNA, não necessitam de "Southern blotting" e marcação radioativa, e a sua metodologia é relativamente simples (Mackill, 1996).

Miyashita (1999) afirma que a tecnologia de AFLP combina estratégias de RFLP e PCR. Em vários estudos, AFLP detectou um grande número de polimorfismo mais eficientemente que outras tecnologias de DNA, tais como RFLP, RAPD, e microssatélites ou SSR (análise de polimorfismo de sequência simples repetida). Comparada a essas outras tecnologias de marcadores moleculares, AFLP apresenta igual ou maior performance em termos de reprodutibilidade, resolução e tempo eficiente. Provavelmente a maior vantagem da tecnologia de AFLP está na sensibilidade e detecção de polimorfismos com genoma total.

A repetibilidade dos marcadores de AFLP é muito alta, resultando em maior sustentação às conclusões derivadas desta análise (Tome *et al.*, 1996). AFLP tem a capacidade de detectar um número muito maior de polimorfismo por *loci* que outras técnicas baseadas em PCR usadas correntemente. (Thomas *et al.*, 1995, Mackill *et al.*, 1996, Cervera *et al.*, 1996)

A técnica do polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) é amplamente utilizada no estudo de genomas de uma grande variedade de plantas e de microorganismos, contudo é um método relativamente novo na análise de DNA de outros organismos. Recentemente o uso de marcadores de AFLP tem sido estendido para animais: rato (Otsen *et al.*, 1996), bovino (Nijman *et al.*, 1999), galinha (Herbergs *et al.*, 1999; Knorr *et al.*, 2001), suíno (Óvilo *et al.*, 2000),

truta arco-íris (Bagley, *et al.*, 2001) e tilápia (Agresti, *et al.*, 2000); entre os insetos: abelha (Sauzo & Hall, 1999), bicho da seda (Yasukochi, 1998), borboleta (Reineke & Karlovsky, 2000), carrapato (Souza, 2001), besouro (Hawthorne, 2001), grilo (Parson & Shaw, 2001) e *Aedes aegypti* (Ravel *et al.*, 2001).

Marcadores de AFLP podem ser utilizados na construção de mapas de ligação de uma grande variedade de organismos agronomicamente importantes (Tan *et al.*, 2001).

Marcadores de AFLP têm encontrado ampla aplicação na análise de variação genética em nível inferior à de espécie, particularmente em investigações de estrutura e diferenciação populacional (Roupe Van Der Voort *et al.*, 1997; Mueller & Wolfenbarger, 1999; Heum *et al.*, 1997; Arens *et al.*, 1998), e da variação genética dentro das populações (Semblat *et al.*, 1998; Travis *et al.*, 1998).

Além desses aspectos da estrutura de populações e variações que podem ser analisados, os marcadores moleculares têm sido aplicados para avaliar situações de: fluxo gênico e dispersão (Semblat *et al.*, 1998; Arens *et al.*, 1988; Travis *et al.*, 1998), intercruzamentos (Gaiotto *et al.*, 1997), introgressão (Tohme *et al.*, 1996) e casos de hibridação (Arens *et al.*, 1998; Mueller & Wolfenbarger, 1999).

A tecnologia de AFLP pode ser considerada um modelo molecular para investigação de variações em sistemática e genética de populações. Para Schmidt & Jensen (2000), devido ao seu alto potencial de descoberta de variações genéticas em alguma parte do genoma, esta técnica é uma ferramenta de grande eficácia para estudos de genética de populações.

Populações experimentais de longo termo, fundadas com híbridos de *Drosophila*, podem-se constituir em excelente material para aplicação de marcadores moleculares visando o estudo das



modificações ocorridas no genoma dos indivíduos ao longo do tempo. Tadei (1974, 1977), Tadei e Bicudo (1981) analisaram populações experimentais de *D. prosaltans*, *D. saltans* e de híbridos entre as duas espécies, acompanhados de censos citológicos periódicos para verificação, através dos pareamentos cromossômicos, da origem específica dos cromossomos. Nas populações H₂ e H₃, o conjunto cromossômico dos indivíduos proporcionou um aumento da variabilidade por introdução de material genético de origens específicas diferentes, ocorrendo uma quebra do conjunto gênico coadaptado de *prosaltans*, esse aumento da variabilidade foi acompanhado por uma melhora do estado-de-ser-adaptado. Na população H₄, com base em estudos citogenéticos, os autores demonstraram que foi reconstituído o genoma de *Drosophila saltans*, não conservando nenhum trecho dos cromossomos de *prosaltans*.



II. OBJETIVOS

Historicamente as populações denominadas H₂, H₃ e H₄ foram fundadas com híbridos F₁ de fêmeas de *Drosophila prosaltans* e machos de *D. saltans*. Estas populações foram mantidas por 170 semanas pela técnica da transferência seriada com um censo semanal, contando-se e pesando-se separadamente adultos e jovens.

Foram efetuados estudos relativos à evolução dos parâmetros do estado-de-ser-adaptado das populações, que evoluíram de modo diferente (Tadei, 1974 e 1977, e Tadei & Bicudo, 1981).

Por cerca de 25 anos, essas mesmas populações foram mantidas apenas com transferências semanais para garrafas com meio de cultura novo. A constituição cromossômica dessas três populações analisadas por Tadei (1974 e 1977) e Tadei & Bicudo (1981) mostrou que H₄ reconstituiu completamente o cariótipo de *D. saltans*, enquanto que, H₂ e H₃, cariótipos de *D. prosaltans* foram reconstituídos, mas, trechos cromossômicos de *D. saltans* foram mantidos.

Com a retomada dos censos semanais completos, a partir de maio de 1999, estudou-se as populações H₂, H₃ e H₄ em seu atual estágio de desenvolvimento genético, analisando os mesmos parâmetros populacionais: tamanho populacional, produtividade, mortalidade e longevidade.

Em nível molecular, avaliou-se a variabilidade genética, comparando indivíduos das três populações (H₂, H₃ e H₄) através da técnica de AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) com indivíduos das espécies parentais (*Drosophila prosaltans*, linhagem P₇₆, e *D. saltans*, linhagem S₆), com descendentes F₁ dos cruzamentos recíprocos de P₇₆×S₆, e com o forídeo *Megaselia scalaris*, que constituiu o grupo externo.



III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Material Biológico

No presente trabalho foram utilizadas duas espécies crípticas de *Drosophila*, pertencentes ao grupo e subgrupo de mesmo nome, saltans: *D. prosaltans* e *D. saltans* que vem sendo mantidas em laboratório a longo tempo.

D. saltans Sturtevant, 1916, da qual utilizou-se a linhagem S₆, é procedente de Huychiuayan, México. Cromossomicamente mostra homozigose para os arranjos padrões nos braços XL, IIR e III; para o arranjo determinado pela inversão SXRa no braço XR e para o arranjo determinado pela inversão SIIIa, no braço IIL (Bicudo, 1967, 1973b; Tadei, 1974).

De *D. prosaltans* Duda, 1927, utilizou-se a linhagem P₇₆ que é resultante da mistura de duas linhagens brasileiras: P₇ (Eldorado, RS) e P₆ (Belém, PA). Cromossomicamente são homozigotas para os arranjos padrão nos cromossomos X e II, e heterozigota para o arranjo determinado pela inversão PIIIb no cromossomo III (Tadei, 1974).

A primeira etapa deste trabalho envolveu a análise de populações experimentais de longo termo, fundadas com híbridos F₁ entre essas duas espécies por Tadei (1974): H₂, H₃ e H₄. Em outra etapa, o DNA das duas espécies, seus híbridos F₁ e indivíduos das três populações foram analisados molecularmente.

III.2. Populações experimentais

As populações experimentais híbridas de *Drosophila saltans* e *D. prosaltans* denominadas H₂, H₃ e H₄ foram fundadas por Tadei



(1974) com 300 fêmeas e 300 machos F_1 resultantes do cruzamento de fêmeas P_{76} com machos S_6 . Essas populações foram mantidas em garrafas de um quarto de litro em câmara temperatura constante a $25 \pm 1,0^\circ\text{C}$, sendo recenseadas semanalmente pelo autor até 1977 pela técnica da transferência seriada (Buzzati-Traverso, 1955, cf. Tadei e Mourão, 1981). Esta técnica consiste basicamente nos seguintes procedimentos: as moscas fundadoras foram colocadas em uma garrafa de um quarto de litro com meio de cultura onde permaneceram durante uma semana, depositando ovos. Na semana seguinte, as moscas foram eterizadas, contadas, pesadas e, em seguida, transferidas para uma garrafa nova. Quando as moscas começaram a nascer nas garrafas anteriores, também foram eterizadas, contadas, pesadas e transferidas, juntamente com as moscas adultas sobreviventes, para uma nova garrafa até completarem cinco garrafas. A partir desse ponto, toda vez que a população era recenseada, uma nova garrafa era introduzida e a mais velha era descartada. Dessa forma, a parcela adulta da população (que define o tamanho populacional) fica sempre restrita à garrafa nova, enquanto que as quatro garrafas mais velhas contêm ovos, larvas, pupas e moscas recém-emergidas. As moscas recém-emergidas nestas garrafas constituem a parcela jovem da população (produtividade). De 1977 a abril de 1999, as populações foram mantidas apenas com transferências semanais. A partir de maio de 1999, essas populações começaram a ser novamente recenseadas semanalmente para a obtenção de dados de tamanho populacional e produtividade, quanto ao número de indivíduos e biomassa úmida, mantendo-se os mesmos procedimentos da análise anterior.

O tempo de eterização utilizado durante os censos foi de 90 segundos, em todos os casos.



As populações foram mantidas em câmara de temperatura constante ($25 \pm 1,0^\circ\text{C}$), sempre nos mesmos lugares das prateleiras, sendo os censos realizados aproximadamente nos mesmos horários.

A análise populacional neste trabalho, teve por objetivo fazer uma comparação com os dados obtidos por Tadei (1974, 1977) quanto ao estágio atual de desenvolvimento.

III.2.1. Longevidade

A estimativa da longevidade média das moscas das populações H_2 , H_3 e H_4 foi feita através do método de Levene (apêndice *in* Dobzhansky & Pavlovsky, 1961). O método foi desenvolvido para a determinação da longevidade em populações onde os processos de nascimento e morte são considerados processos estocásticos estacionários contínuos. Neste caso a longevidade média bruta (a) é dada pelo número de indivíduos sobreviventes (N), dividido pelo número médio de indivíduos nascidos num intervalo de tempo unitário (B). Em populações experimentais mantidas pela técnica da transferência seriada, o processo de nascimento é essencialmente discreto, pois este não é o tempo biológico do nascimento dos indivíduos, mas sim o momento em que são adicionados à parcela adulta da população, e as mortes serão consideradas só a partir deste momento. A mortalidade também é um processo discreto, pois as mortes são computadas em intervalos regulares, somente no momento dos censos.

Se a longevidade média for muito maior que o intervalo de tempo entre nascimentos, ela pode ser calculada pelo valor a descrito acima, mas caso contrário, a estimativa da longevidade média das moscas requer correção. O fator de correção depende da distribuição



do tempo de morte, e adotando o modelo de distribuição exponencial, a probabilidade de que um indivíduo nascido no tempo zero, morra no tempo t é $1 - e^{-\frac{t}{m}}$, sendo m a longevidade média corrigida expressa na mesma unidade de t . Esta distribuição considera que a probabilidade de uma mosca viver um tempo t , e morrer entre t e $t + \Delta t$ é $\Delta t / m$, independentemente da idade da mosca.

As moscas sendo adicionadas em intervalos uniformes de tempo c , o número esperado de moscas presentes no começo do intervalo, que morrem no decorrer do mesmo, é $(N + B)(1 - e^{-\frac{c}{m}})$, e a proporção viva restante é $N = (N + B)e^{-\frac{c}{m}}$, sendo $N+B$ o número de moscas vivas no início do período. Quando um tamanho estável de população é alcançado, o número de indivíduos nascidos no início de cada período deve ser $B = (N + B)(1 - e^{-\frac{c}{m}})$, e determinando para o próximo período o número de moscas

$$N + B = (N + B)e^{-\frac{c}{m}} + (N + B)(1 - e^{-\frac{c}{m}}).$$

A relação entre a longevidade média a e a longevidade média corrigida m , no intervalo de tempo unitário c , é dada por:

$$\frac{a}{c} = \frac{N}{B} = \frac{Ne^{-\frac{c}{m}}}{Be^{-\frac{c}{m}}} = \frac{Ne^{-\frac{c}{m}}}{N(1 - e^{-\frac{c}{m}})} = \frac{e^{-\frac{c}{m}}}{(1 - e^{-\frac{c}{m}})} \neq \frac{m}{c}$$

A relação entre a e m é não linear, e a proximidade entre ambos depende da razão $r = \frac{m}{c}$, sendo o erro $m - a$ tanto menor, quanto maior for a longevidade média em relação ao intervalo de tempo c .

Com duas transferências semanais, respectivamente com intervalos de c e d dias, considerando que o número médio de nascimentos diários seja de b moscas, têm-se cb o número de nascimentos em c dias e db o número de nascimentos em d dias. Neste caso a relação de equilíbrio é dada por:

$$N = [(N + cb)e^{-\frac{c}{m}} + db]e^{-\frac{c}{m}}$$

Sendo a longevidade média a em dias dada por $a = \frac{N}{b}$, tem-se $N = ab$. Fazendo a substituição para o valor de N na expressão acima estabelece-se a relação entre a e m , que é dada por:

$$a = \frac{ce^{-\frac{c+d}{m}} + de^{-\frac{c}{m}}}{1 - e^{-\frac{c+d}{m}}}$$

Neste trabalho, propõe-se a aplicação do modelo de Levene para populações com uma transferência semanal. Admitindo as premissas do modelo, a expressão para a obtenção do valor a é dada por:

$$a = \frac{e^{-\frac{c}{m}}}{1 - e^{-\frac{c}{m}}}$$

Através da expressão acima, o valor m em função de a é dado por:

$$m = \left[\ln \left(\frac{1+a}{a} \right) \right]^{-1}$$

III.2.2. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o “software” estatístico Minitab for Windows 10.1. Foram obtidas primeiramente as estatísticas descritivas para número de machos, fêmeas, total de moscas, biomassa total e biomassa individual das variáveis tamanho populacional, produtividade e mortalidade das três populações, destacando-se as médias e erros padrões. Para comparações entre as médias, visando verificar se as diferenças eram estatisticamente significativas, foram utilizados o teste t de Student, Análise de Variância e teste de Tukey.

A existência ou não de associação entre as variáveis foi verificada por análise de correlação, calculando-se o índice de

correlação de Pearson. Foram feitos diagramas de dispersão para a representação gráfica destes testes.

III.3. Análise Molecular

Para análise molecular, machos de cada uma das linhagens foram retirados dos estoques aleatoriamente, colocados em microtubos de 1,5 ml e congelados à -20°C para posterior análise através da técnica de AFLP. As espécies de cada uma das linhagens foram analisadas através de um *pool* de indivíduos. O número de moscas contidas no *pool* foi determinado previamente através de um experimento, onde foram analisados *pools* de 5, 7, 10, 15 e 20 indivíduos. O *pool* que teve a variabilidade genética das populações melhor representada foi escolhido para todas as análises.

III.3.1. Grupo externo

O uso de informações sobre grupos externos permite o estabelecimento da direção das modificações evolutivas, determinando os estados primitivos ou derivados de um certo caráter (Matiolli, 2001).

Neste trabalho foi utilizada como grupo externo o díptero forídeo *Megaselia scalaris* Loew, 1866 (linhagem CP), proveniente da cidade de Campinas, SP, e mantida nos estoques do Departamento de Biologia da UNESP de São José do Rio Preto. Dentre as espécies do gênero, *M. scalaris*, é considerada a mais polífaga e cosmopolita de todas, com distribuição tropical e subtropical principalmente em ambientes modificados pelo homem (Vetorazzi, 1993). Foram encontradas espécies de *Megaselia* em material biológico em



decomposição, fezes humanas e de animais, parasitando colônias de insetos e outros invertebrados, cultura de milho e de cogumelo e causando miíase no homem e em outros animais.

III.3.2. Híbridos Interespecíficos

Estudos do isolamento reprodutivo dessas espécies, realizados por Bicudo (1967, 1973a), mostraram que elas são intercruzáveis em laboratório, mas, a frequência de cruzamentos férteis varia conforme a origem geográfica das linhagens. As linhagens procedentes de regiões onde essas espécies são simpátricas (Costa Rica), mostraram isolamento reprodutivo completo em laboratório. Em cruzamentos interespecíficos, com progênie, os descendentes F_1 do cruzamento de fêmeas *prosaltans* com machos *saltans* são férteis, porém, no cruzamento recíproco os machos são estéreis.

Para a obtenção de indivíduos híbridos, nas duas direções de cruzamento, machos e fêmeas, logo após a emergência, foram separados dos estoques de cada uma das espécies e colocados em tubos de vidro contendo meio de cultura de banana-agar, onde permaneceram isolados durante 5 a 7 dias para a maturação sexual.

Cruzamentos interespecíficos por casal foram realizados em ambas as direções. Cada casal foi colocado em um tubo de vidro com meio de cultura de banana-agar permanecendo por 2 dias. Foram realizados dois repiques a intervalos de dois dias cada, garantindo a oviposição em 3 tubos. Todos os cruzamentos foram mantidos em câmara de temperatura constante de $25 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

Dos cruzamentos férteis, somente os machos foram separados e colocados individualmente em microtubos de 1,5 ml e mantidos congelados até o momento da extração do DNA.



III.3.3. Extração do DNA genômico

As moscas machos das espécies parentais, híbridos F_1 , populações e do grupo externo foram separadas, eterizadas, colocadas em microtubos de 1,5 ml e congeladas individualmente a -20°C para posterior extração do DNA genômico total.

As moscas foram maceradas individualmente em microtubos de 1,5 ml contendo 250 μl de tampão SET (NaCl 0,15M, Tris 0,02M e EDTA 1 mM pH 8,0) com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, em cada amostra foram adicionados 9 μl de proteinase K (10 mg/ml) e 11 μl de SDS 25%, logo após, foram agitadas por inversão, e posteriormente submetidas à incubação a 55°C , por 2 horas.

Decorrido o tempo de incubação, às amostras adicionou-se 430 μl de NaCl 6M e centrifugou-se por 10 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 40 μl de acetato de sódio 3M e o seu volume foi completado com isopropanol gelado (-20°C). Imediatamente as amostras foram colocadas no *freezer* por pelo menos 20 minutos, e depois centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos. O *pellet* formado foi isolado descartando-se o sobrenadante e lavado com etanol 70%. Em seguida, o sobrenadante foi novamente desprezado e o *pellet* seco à temperatura ambiente, e depois ressuspendido em tampão 100 μl de tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM) depois de seco.

III.3.3.1. Quantificação do DNA

As amostras de DNA genômico, foram submetidas à análise em espectrofotômetro com fator de diluição 100 para a detecção da



concentração de DNA e proteínas. Todas elas apresentaram altas concentrações de DNA, em média 80 ng/ μ l de solução. Além disso, a razão DNA/proteínas mostrou-se adequada para a metodologia utilizada, por volta de 1,9.

Após a quantificação, foram misturados 3 μ l de cada uma das 10 amostras para a confecção dos *pools*.

III.3.4. Princípios da tecnologia de AFLP

Todos os *pool* de DNA foram analisados utilizando-se o “AFLP[®] Analysis System I” da Gibco BRL Products, em um termociclador (MJ Research Minicycler). O protocolo da técnica de AFLP utilizado no presente trabalho foi o descrito por Vos *et al.* (1995) e o modificado por Vandermark (1999). A técnica consiste basicamente nas seguintes etapas nesta sequência: restrição, ligação de adaptadores, pré-amplificação e amplificação seletiva, descritas detalhadamente à seguir.

III.3.4.1. Restrição

Para esta etapa, foram adicionados em cada microtubo de 0,2 ml, 25U de *EcoR I*, 1,25U de *Mse I*, 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM de acetato de magnésio e 250 mM de acetato de potássio, em seguida, foram acrescentados 250 ng de DNA e água MiliQ autoclavada até o volume final de 25 μ l. As amostras foram incubadas no termociclador durante duas horas e 30 minutos a 37°C e quinze minutos a 72°C para inativação das enzimas de restrição.

Neste processo o DNA genômico foi digerido por duas enzimas de restrição: a *EcoR I* (E) que reconhece o sítio de seis bases



GAATTC; e a enzima *Mse I* (M) que reconhece o sítio de quatro bases, TTAA. A digestão por estas endonucleases resulta em três tipos de fragmentos, definidos pelos seus sítios de restrição: E-E, E-M e M-M.

III.3.4.2. Ligação dos adaptadores

Os adaptadores são pequenas seqüências de fita dupla complementares às extremidades dos fragmentos resultantes da digestão do DNA pelas enzimas de restrição. A função desses adaptadores é facilitar a amplificação por PCR. Uma mudança de base no sítio de clivagem de uma enzima impede o seu reconhecimento impossibilitando a ligação

Em cada microtubo contendo o DNA digerido pelas enzimas de restrição, foram adicionados os adaptadores das duas enzimas, 0,4 mM de ATP, 10mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de acetato de magnésio, 50 mM de acetato de potássio, 1U de T4 DNA ligase, totalizando 50 µl no volume final. As amostras foram incubadas a 20°C por 2 horas.

III.3.4.3. Pré-amplificação

Na reação de pré-amplificação, o DNA genômico foi amplificado com iniciadores (*primers*) das duas enzimas contendo apenas um nucleotídeo seletivo (*EcoR I* - A e *Mse I* - C). As reações foram feitas com 40 µl de “AFLP Primer pre-amp Mix I” (componente do Kit “AFLP® Analysis System I”), 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 15 mM de cloreto de magnésio, 500 mM de cloreto de potássio, 1U de *Taq* DNA polimerase e 5 µl de DNA já cortado pelas



endonucleases de restrição e ligado aos adaptadores, contabilizando-se um volume final de 50 µl. As amostras foram submetidas a 30 ciclos de replicação, sendo que cada ciclo consistiu de 30 segundos a 94°C para a desnaturação do DNA, 1 minuto a 50°C para o anelamento dos iniciadores e 1 minuto a 72°C para a extensão das cadeias.

III.3.4.4. Amplificação seletiva

Na amplificação seletiva, outros *primers* (iniciadores), os quais são complementares aos adaptadores, apresentam em sua extremidade 3' de um a três nucleotídeos seletivos. São possíveis 64 combinações de iniciadores para as duas enzimas que geram diferentes quantidades de polimorfismo. O uso destes *primers* varia conforme a complexidade do genoma a ser estudado. Geralmente para organismos eucariotos, utiliza-se *primers* com 3 nucleotídeos seletivos.

As reações de amplificação seletiva foram realizadas em um volume final de 20 µl contendo: 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 15 mM de cloreto de magnésio, 500 mM de cloreto de potássio, 5 ng de iniciador *EcoR I*, 30 ng de iniciador *Mse I*, 5U de *Taq* DNA polimerase e 5 µl de DNA pré-amplificado. No termociclador as amostras foram submetidas a 35 ciclos, sendo os 6 primeiros de 30 segundos a 94°C para a separação das fitas, de 30 segundos a 65°C para o anelamento dos iniciadores e 1 minuto a 72°C para a extensão das cadeias, os 6 ciclos seguintes de 30 segundos a 94°C, de 30 segundos a 60°C e 1 minuto a 72°C, e os últimos 23 ciclos de 30 segundos a 94°C, de 30 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C para a extensão das cadeias, completando os 35 ciclos necessários. Por fim, um último ciclo de 5 minutos a 72°C permitiu a extensão final das cadeias.



Em todas as reações de amplificação foi utilizado um microtubo contendo todos os reagentes, exceto o DNA molde, que serviu de controle negativo para excluir a possibilidade de contaminação das soluções com DNA.

No presente trabalho foram testados 15 combinações de *primers* para a amplificação seletiva.

Primer 1 → E-ACA/M-CAC

Primer 2 → E-AAC/M-CTT

Primer 3 → E-AAG/M-CTC

Primer 4 → E-ACC/M-CTA

Primer 5 → E-AGC/M-CTG

Primer 6 → E-AGG/M-CAG

Primer 7 → E-ACT/M-CAA

Primer 8 → E-ACG/M-CAT

Primer 9 → E-AAC/M-CTC

Primer 10 → E-AAG/M-CAG

Primer 11 → E-ACA/M-CAC

Primer 12 → E-ACC/M-CTG

Primer 13 → E-AGG/M-CTT

Primer 14 → E-AGC/M-CAA

Primer 15 → E-ACA/M-CAC

III.3.4.5. Separação dos fragmentos amplificados

A separação por eletroforese dos fragmentos amplificados foi feita em gel de poliacrilamida desnaturante a 8%. As amostras após serem amplificadas foram diluídas na proporção 5:1 em solução contendo glicerol 30%, xilenocianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%. Em seguida, as amostras sofreram desnaturação por aquecimento durante 3 minutos a 90°C e, logo após, transferidas imediatamente para gelo a fim de impedir a renaturação, para posteriormente serem aplicadas no gel. O gel foi polimerizado em placas de vidro medindo 17,0 x 28,0 cm com espaçadores de 0,65 mm de espessura.



A corrida foi feita em cuba contendo tampão TBE 1X (100mM de Tris, 80mM de ácido bórico e 1mM de EDTA) a 25°C, com corrente elétrica de 600V, 100 mA e 100W (fonte Pharmacia EPS 3501), até que o corante xilenocianol atingisse o nível desejado de corrida aproximadamente 14 centímetros antes da base do gel (cerca de 3 horas).

Em cada canaleta foram aplicados 7 µl de DNA amplificado de cada amostra, inclusive dos controles negativos. Sempre na primeira canaleta da esquerda para a direita foi adicionado aproximadamente 400 ng do marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb (GIBCO BRL).

III.4.2.6. Coloração por nitrato de prata (AgNO_3)

Após a eletroforese, cada gel foi colocado em um recipiente plástico proporcional ao seu tamanho, onde procedeu-se a coloração por nitrato de prata com o intuito de evidenciar as bandas correspondentes aos fragmentos amplificados. Este procedimento inclui em primeira etapa, a fixação do gel em solução contendo etanol 30% e ácido acético 0,75% por 10 minutos, agitando-se o recipiente algumas vezes. Em seguida, foi realizada a coloração do gel por solução de nitrato de prata 0,2% por 10 minutos, também agitando-se algumas vezes. O excesso do corante foi retirado com lavagem em água destilada. Em seguida foi adicionada, sob agitação constante dos géis, solução reveladora contendo hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,3% por tempo suficiente para que as bandas fossem visualizadas. O bloqueio da revelação foi feito adicionando-se solução fixadora inicial.



O gel corado foi seco entre duas folhas de papel celofane e gelatina 5% e arquivados para análise posterior.

III.4.2.7. Análise estatística dos resultados

Os géis , depois de secos, foram analisados em um transiluminador equipado com luz fluorescente para classificação das bandas quanto à presença (1) ou ausência (0), gerando matrizes de dados.

Estas matrizes foram analisadas utilizando-se *software* Statistica 4.5 A (1993) para o cálculo da distância genética e análise de *clusters*. As distâncias genéticas foram calculadas pelo método de porcentagem de desacordo (Puterka *et al.* 1993). A reconstrução filogenética foi feita pelo método não ponderado de agrupamento aos pares utilizando-se as médias aritméticas UPGMA (*unweghted pair group method with arithmetic means*), agrupando indivíduos ou grupos mais similares até os mais distantes



IV. RESULTADOS

IV.1. Análise Populacional

No presente trabalho foram realizados 100 censos semanais completos contando-se e pesando-se moscas adultas e jovens das populações H₂, H₃ e H₄. Estas populações foram fundadas 30 anos atrás por Tadei (1974), com 600 indivíduos híbridos F₁ descendentes de cruzamentos entre fêmeas de *Drosophila prosaltans* e machos de *D. saltans*. Após os estudos citogenéticos e populacionais de Tadei (1974, 1977), estas populações continuaram sendo mantidas apenas com transferências semanais, até serem retomados os censos completos em maio de 1999.

A tabela I apresenta, para os 100 censos realizados, as médias e erros padrões do número de moscas, biomassa total e biomassa individual para adultos (tamanho populacional) e jovens (produtividade) das três populações. Observa-se para o número total de moscas que H₂ apresenta o maior tamanho populacional em relação às outras duas populações. Quanto à produtividade, H₂ e H₃ apresentam números semelhantes, enquanto que H₄ tem produtividade menor. Apesar de apresentar a menor produtividade, H₄ mantém tamanho populacional entre o das outras duas populações.

O teste *t* de Student foi utilizado na comparação dos números médios entre machos e fêmeas. Os resultados foram estatisticamente significativos ao nível de 0,001 para adultos e jovens de H₂ e H₃, sendo o número de fêmeas maior. Para a população H₄, tanto para adultos quanto para jovens, os valores não apresentam diferenças estatisticamente significativas, contudo, nesta população, o número



médio de machos é sempre maior que o de fêmeas para adultos e jovens.

A tabela I também contém os valores das médias e erros padrões da biomassa total, em miligramas, e biomassa individual, em $\text{mg} \times 10^{-3}$, de adultos e jovens destas populações. Nos adultos a biomassa total de H_2 é maior que de H_3 e H_4 . Para os jovens os números médios de H_2 e H_3 são semelhantes, sendo o de H_4 menor, confirmando os dados referentes ao número total de moscas produzidas. Quanto à biomassa individual, H_4 apresenta o menor valor, tendo H_2 valor intermediário, tanto para adultos como para jovens.

Os valores de F , para 2 e 297 graus de liberdade, das análises de variância dos parâmetros estudados estão na tabela II, sendo todos estatisticamente significativos ao nível de 0,001.

Devido aos valores significativos de F foi utilizado o teste de Tukey para identificar as médias de quais populações diferiam. Para adultos (tabela III) o número total de moscas e número de machos apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre todas as populações; para o número de fêmeas e biomassa total H_3 não difere de H_4 e ambas diferem de H_2 , e na biomassa individual houve diferença significativa entre H_3 e H_4 , mas ambas não diferem de H_2 . Nos jovens (tabela IV), H_4 apresentou diferenças significativas em todos os parâmetros em relação às populações H_2 e H_3 que não diferiram entre si, exceto para biomassa individual.

As figuras 1, 2 e 3 mostram o andamento dos censos semanais das populações H_2 , H_3 e H_4 , respectivamente. Verifica-se nas figuras 1 e 2 que os machos permanecem sempre em estratos inferiores em relação às fêmeas tanto nos adultos como nos jovens, exceto em

alguns censos. O inverso ocorre em H_4 (figura 3), onde os machos ficam em estratos superiores, principalmente nos adultos.

As figuras 4 a 6 apresentam os dados referentes ao andamento dos censos para biomassa total e individual de H_2 , H_3 e H_4 . Observa-se que a biomassa total de adultos é maior que a de jovens nas três populações, sendo essa diferença consideravelmente menor em H_3 (figura 5), onde as linhas correspondentes à biomassa de adultos e jovens aparecem imbricadas em alguns censos. Para biomassa individual a situação se modifica, pois as três populações apresentam o mesmo perfil, ficando a biomassa individual de adultos em níveis superiores.

Na figura 7A são mostradas graficamente as médias e erros padrões para o número de moscas adultas e jovens das três populações. Para o número total de moscas H_2 tem tamanho populacional maior que H_3 e H_4 ; H_3 tem tamanho populacional menor que H_4 , mas sua produtividade é equivalente à população H_2 . A população H_4 tem a menor produtividade das três, mas mantém tamanho populacional intermediário ao das outras duas populações, evidenciando maior longevidade.

Pode ser observado na figura 7B que moscas jovens de H_3 tem maior biomassa total que as moscas de H_2 e H_4 , mas quando adultas apresentam biomassa total menor que das outras duas populações. Em H_4 ocorre o inverso, quando jovens as moscas apresentam a menor biomassa total e quando adultas biomassa total intermediária, apresentando maior ganho de biomassa úmida das três populações. Para biomassa individual (figura 7C) as moscas de H_3 apresentam a maior biomassa tanto nos adultos quanto nos jovens, mas são as que menos ganham massa quando comparadas com H_2 e H_4 . Em H_4 as

moscas tem menor biomassa individual nos jovens e adultos, mas estas são as que mais ganham massa quando adultas, em relação a H₂ e H₃.

Os parâmetros número total de moscas e biomassa total de adultos e jovens de H₂, H₃ e H₄, foram analisados através dos índices de correlação de Pearson (r), sendo todos os valores positivos e altamente significativos. Nos testes realizados houve forte correlação entre número total de adultos e biomassa total de adultos para H₂ ($r=0,970$; $t_{98}=38,8$; $P<0,001$), H₃ ($r=0,965$; $t_{98}=37,1$; $P<0,001$) e H₄ ($r=0,956$; $t_{98}=31,9$; $P<0,001$), e entre número total de jovens e biomassa total de jovens para H₂ ($r=0,949$; $t_{98}=29,7$; $P<0,001$), H₃ ($r=0,939$; $t_{98}=26,8$; $P<0,001$) e H₄ ($r=0,955$; $t_{98}=31,8$; $P<0,001$). Os diagramas de dispersão para estas duas variáveis são apresentados na figura 8, para adultos (A, B, C) e jovens (D, E, F).

Índices de correlação de Pearson (r) também foram calculados para os parâmetros número total de moscas e biomassa individual de adultos e jovens das três populações. Para adultos, as correlações são todas negativas e estatisticamente significativas: $r = -0,229$; $t_{98}=2,3$; $P<0,05$ para H₂, $r = -0,216$; $t_{98}=2,2$; $P<0,05$ para H₃ e $r = -0,259$; $t_{98}=2,6$; $P<0,01$ para H₄. Para jovens, contudo, as correlações são não significativas para H₂ ($r=0,029$; $t_{98}=0,3$; $P>0,50$) e H₃ ($r = -0,128$; $t_{98}=1,3$; $P>0,20$) e positiva e significativa para H₄ ($r=0,274$; $t_{98}=2,8$; $P<0,01$). Na figura 9 são apresentados os diagramas de dispersão entre o número total de moscas e biomassa individual de adultos (A,B,C) e de jovens (D,E,F) das três populações.

Os valores médios e erros padrões para mortalidade das três populações são apresentados na tabela V. As populações H₂ e H₃ apresentam valores médios muito próximos e maiores que os de H₄ para a mortalidade de machos, fêmeas e total. Considerando-se as

populações individualmente, a mortalidade de fêmeas em relação à de machos, é maior em H_2 e H_3 , ocorrendo o inverso em H_4 . As comparações pelo teste t de Student mostraram que as diferenças entre os números médios de machos e fêmeas são estatisticamente significativas ao nível de 0,001 para H_2 e H_3 , enquanto que em H_4 não diferiram significativamente.

Na tabela V também estão descritos os valores $F_{2;297}$ da análise de variância para mortalidade de machos, fêmeas e total de moscas das três populações. As diferenças são significativas ao nível de 1% para machos e de 0,1% para fêmeas e total de moscas. Devido aos valores significativos de F foi realizado o teste de Tukey (tabela VI). As populações H_2 e H_3 não diferem entre si mas ambas diferem de H_4 , para machos, fêmeas e total.

Na figura 10 está representada graficamente a mortalidade de machos, fêmeas e total das três populações durante os 100 censos realizados. Em H_2 e H_3 , os machos mantêm-se em estratos inferiores em relação às fêmeas, ocorrendo o contrário em H_4 na maioria dos censos. A mortalidade total em H_4 , salvo algumas exceções, está sempre abaixo de 200 indivíduos, enquanto que em H_2 e H_3 apresenta-se quase sempre acima desse valor.

A comparação entre mortalidade e natalidade média das três populações mostrou que ambas apresentam valores muito próximos (figura 11). As populações H_2 e H_3 não diferem entre si, apresentando taxas de natalidade e mortalidade semelhantes. Em H_4 as taxas de natalidade e mortalidade são menores, e ao contrário de H_2 e H_3 , as fêmeas nascem e morrem em número menor que os machos. Mesmo tendo taxas de mortalidade e natalidade muito próximas de H_2 e maiores que H_4 , H_3 mantém o menor tamanho populacional.



Numericamente as médias podem ser observadas comparando-se as tabelas I e V.

Na tabela VII encontram-se os valores obtidos pelo método de Levene para a estimativa da longevidade média bruta (a) e corrigida (m) na unidade de tempo dos censos (semanas) e também os valores em dias para a longevidade média corrigida (m^*), longevidade mínima e máxima de machos, fêmeas e total de moscas das populações H_2 , H_3 e H_4 . Observa-se nestas populações que a longevidade média é dada pela ordem $H_4 > H_2 > H_3$, destacando-se H_4 das demais. O intervalo de variação das médias extremas ($H_4 - H_3$) é de 7,6 dias para machos, de 6,5 dias para fêmeas e de 7,2 dias para o total de moscas. Em relação à população H_3 há um aumento na longevidade média de H_4 de 38,2% para machos, 33,2% para fêmeas e de 36,2% para o total de moscas.



TABELA I. Números médios e erros padrões ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) para tamanho populacional e produtividade das populações fundadas com híbridos de *Drosophila prosaltans* e *D. saltans*. Teste *t* de Student para a comparação das médias de machos e fêmeas. N = 100 censos semanais. T= total, M= machos, F= fêmeas. *** = $P < 0,001$; ^{NS} = não significativo

População		Tamanho Populacional			Produtividade		
		Nº de moscas	Biomassa (mg)	Biom. Individual (mg x 10 ⁻³)	Nº de moscas	Biomassa (mg)	Biom. Individual (mg x 10 ⁻³)
H ₂	T	354,0±8,5	346,0±8,3	0,981±0,007	224,0±7,2	173,1±5,8	0,773±0,007
	M	147,9±4,2			99,6±3,5		
	F	205,8±4,9			125,6±4,0		
	<i>t</i> ₁₉₈ : MxF	9,03 ***			4,92 ***		
H ₃	T	281,8±8.5	279,7±8,45	1,000±0,008	217,5±6,9	178,9±5,4	0,816±0,009
	M	115,4±4,1			96,5±3,4		
	F	165,6±5,4			124,2±3,8		
	<i>t</i> ₁₉₈ : MxF	7,40 ***			5,48 ***		
H ₄	T	321,8±9,7	305,8±8,7	0,958±0,009	156,7±7,1	113,9±5,6	0,716±0,009
	M	166,6±5,6			80,9±3,6		
	F	154,5±4,8			75,9±3,8		
	<i>t</i> ₁₉₈ : MxF	1,65 ^{NS}			0,97 ^{NS}		



Tabela II. Valores de $F_{2,297}$ da análise de variância para a comparação das médias das populações experimentais H_2 , H_3 e H_4 . *** = $P < 0,001$

	Nº de moscas	Biomassa (mg)	Biom. Individual (mg x 10^{-3})
TAMANHO POPULACIONAL			
Total	16,42 ***	15,36***	6,93***
Machos	30,75 ***		
Fêmeas	28,87 ***		
PRODUTIVIDADE			
Total	27,55 ***	41,13***	38,41***
Machos	8,42 ***		
Fêmeas	53,42 ***		



TABELA III. Valores absolutos das diferenças entre pares de médias referentes ao tamanho populacional (adultos) das populações H₂, H₃ e H₄. d.m.s. = diferença mínima significativa do teste Tukey. * = $P < 0,05$

População	H ₂	H ₃
Número total de moscas. d.m.s.=29,64		
H ₃	72,21 *	
H ₄	32,22 *	39,99 *
Número de machos. d.m.s.=15,46		
H ₃	32,47 *	
H ₄	18,72 *	51,19 *
Número de fêmeas. d.m.s.=16,62		
H ₃	40,24 *	
H ₄	51,28 *	11,04
Biomassa total. d.m.s.=28,18		
H ₃	96,25 *	
H ₄	40,15 *	26,10
Biomassa individual. d.m.s.=0,0267		
H ₃	0,0197	
H ₄	0,0227	0,0424 *



TABELA IV. Valores absolutos das diferenças entre pares de médias referentes à produtividade (jovens) das populações H₂, H₃ e H₄. d.m.s. = diferença mínima significativa do teste Tukey. * = $P < 0,05$

População	H ₂	H ₃
Número total de moscas. d.m.s.=23,41		
H ₃	6,45	
H ₄	67,28 *	60,83 *
Número de machos. d.m.s.=11,42		
H ₃	3,16	
H ₄	18,70 *	15,54 *
Número de fêmeas. d.m.s.=12,83		
H ₃	1,40	
H ₄	49,76 *	48,36 *
Biomassa total. d.m.s.=18,57		
H ₃	5,84	
H ₄	59,21 *	65,05 *
Biomassa individual. d.m.s.=0,0268		
H ₃	0,0434 *	
H ₄	0,0566 *	0,1001 *

TABELA V. Mortalidade média ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) para machos, fêmeas e total de H₂, H₃ e H₄. Valores de F_{2;297} para a comparação das médias das três populações e de *t* de Student (*t*₁₉₈) para a comparação de machos e fêmeas de cada população. ** = P < 0,01; *** = P < 0,001; ^{NS} = não significativo

População	N	Machos	Fêmeas	Total	<i>t</i> ₁₉₈
H ₂	100	99,50±3,94	125,64±4,23	223,87±7,67	4,52 ***
H ₃	100	95,43±3,81	125,51±4,39	220,98±7,24	5,17 ***
H ₄	100	80,40±4,73	75,61±4,61	155,92±8,33	0,73 ^{NS}
F _{2;297}		5,80 **	42,71 ***	24,50 ***	

TABELA VI. Valores absolutos das diferenças entre pares de médias referentes à mortalidade das populações H₂, H₃ e H₄. d.m.s. = diferença mínima significativa do teste Tukey. * = P < 0,05

População	H ₂	H ₃
Número total de moscas. d.m.s.=25,69		
H ₃	2,89	
H ₄	67,95 *	65,06 *
Número de machos. d.m.s.=13,83		
H ₃	4,07	
H ₄	19,10 *	15,03 *
Número de fêmeas. d.m.s.=7,72		
H ₃	0,13	
H ₄	50,03 *	49,90 *

Tabela VII. Estimativas da longevidade média a e m , em semanas, e valores médio, mínimo e máximo da longevidade em dias, das populações H₂, H₃ e H₄, obtidos pelo método de Levene.

Populações		Longevidade				
		semanas		dias		
		a	m	m^*	min.	máx.
H ₂	Total	1,686	2,148	15,0	9	27
	Machos	1,609	2,069	14,5	7	30
	Fêmeas	1,737	2,199	15,4	8	28
H ₃	Total	1,365	1,812	12,7	7	24
	Machos	1,308	1,761	12,3	5	25
	Fêmeas	1,418	1,874	13,1	6	27
H ₄	Total	2,379	2,850	19,9	9	66
	Machos	2,373	2,844	19,9	9	63
	Fêmeas	2,326	2,796	19,6	10	66

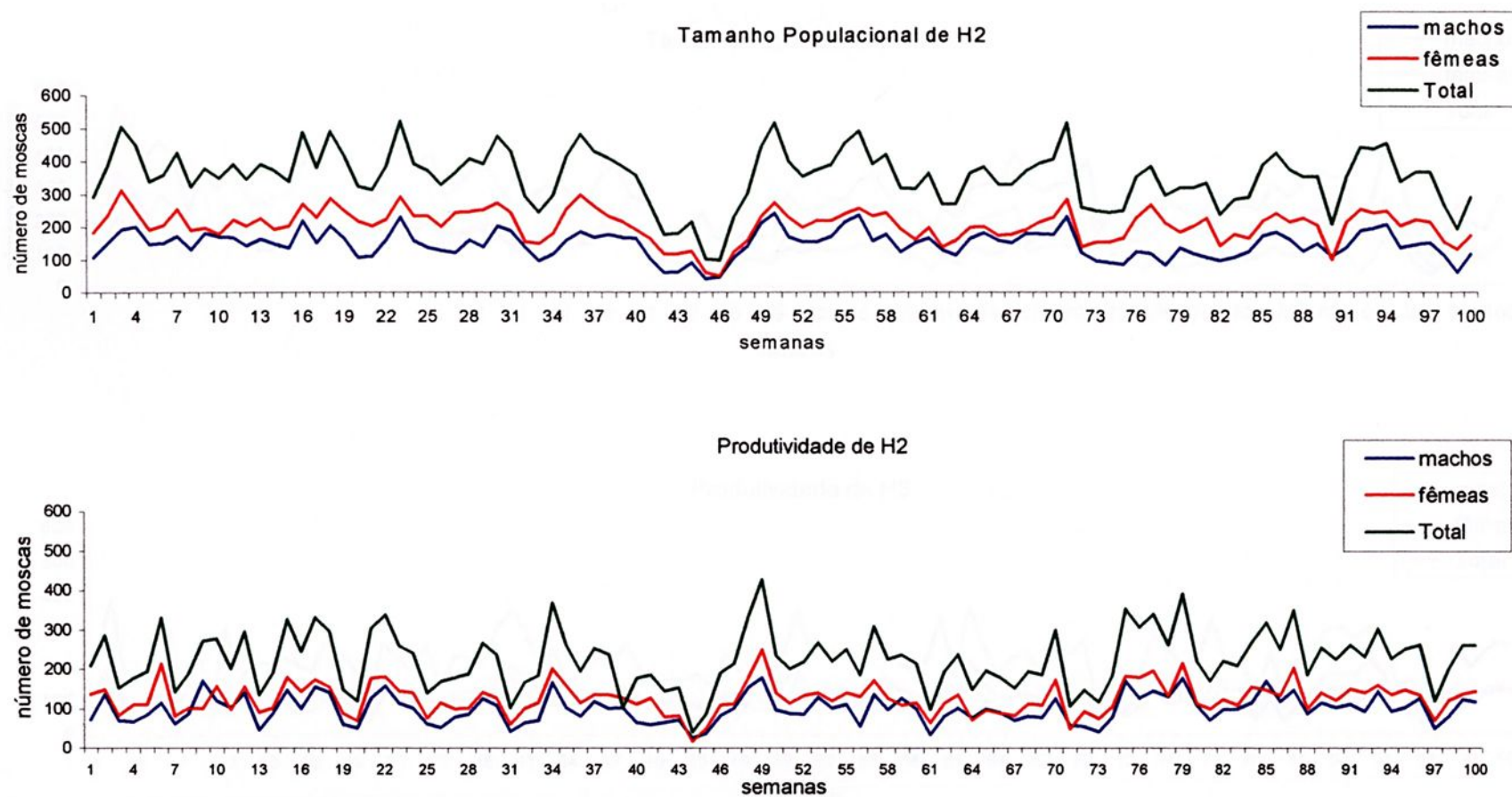


Figura 1. Número total de moscas, número de machos e de fêmeas para tamanho populacional e produtividade da população H₂, durante os 100 censos semanais do experimento.

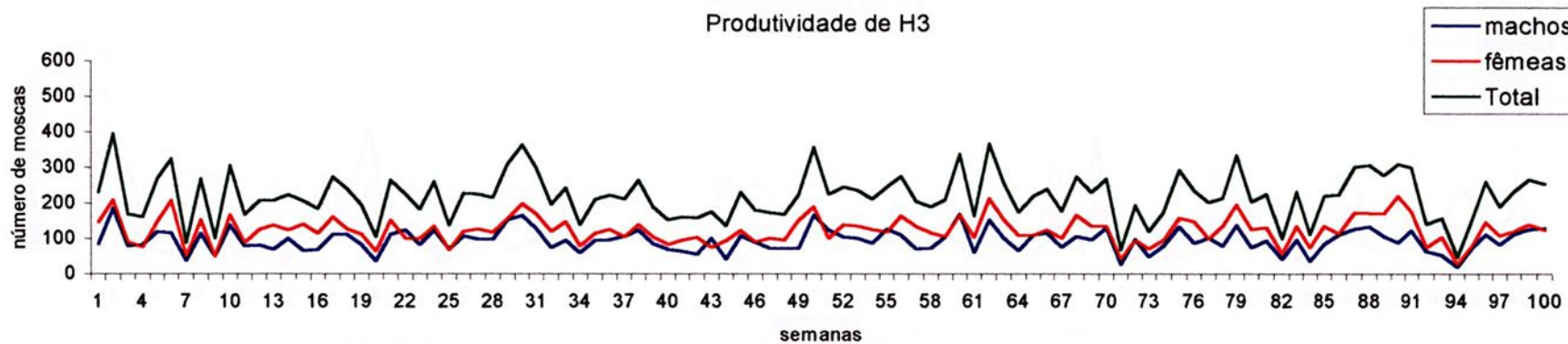
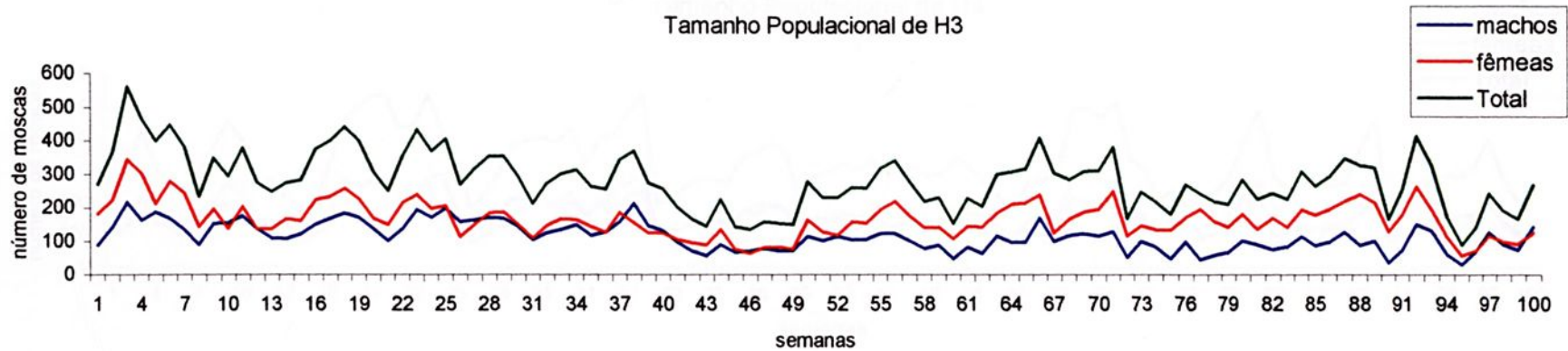


Figura 2. Número total de moscas, número de machos e de fêmeas para tamanho populacional e produtividade da população H₃, durante os 100 censos semanais do experimento.

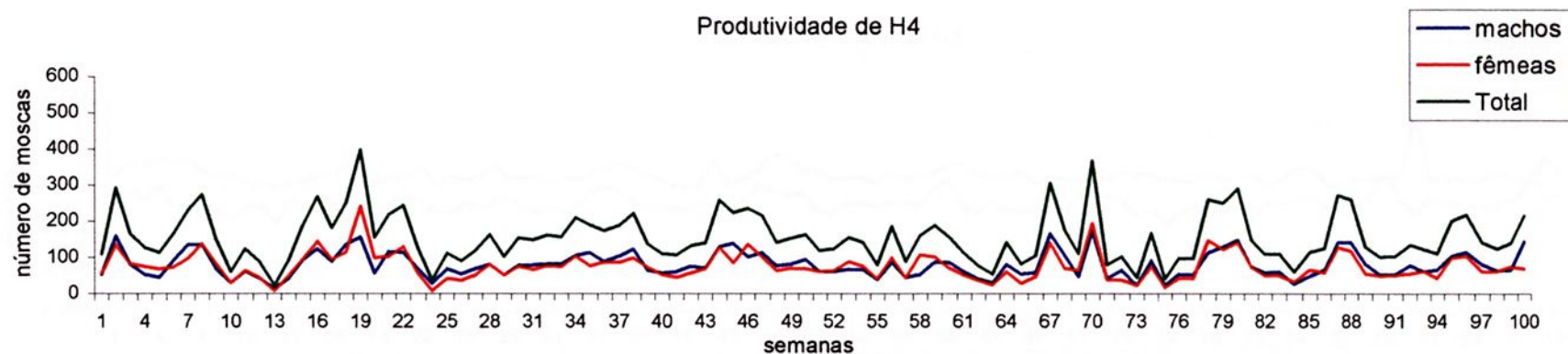
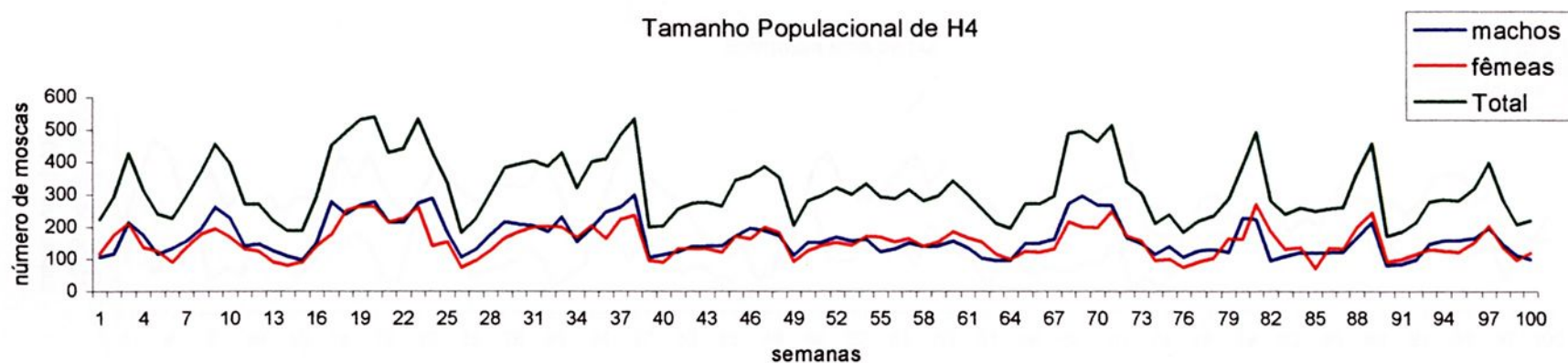


Figura 3. Número total de moscas, número de machos e de fêmeas para tamanho populacional e produtividade da população H₄, durante os 100 censos semanais do experimento.

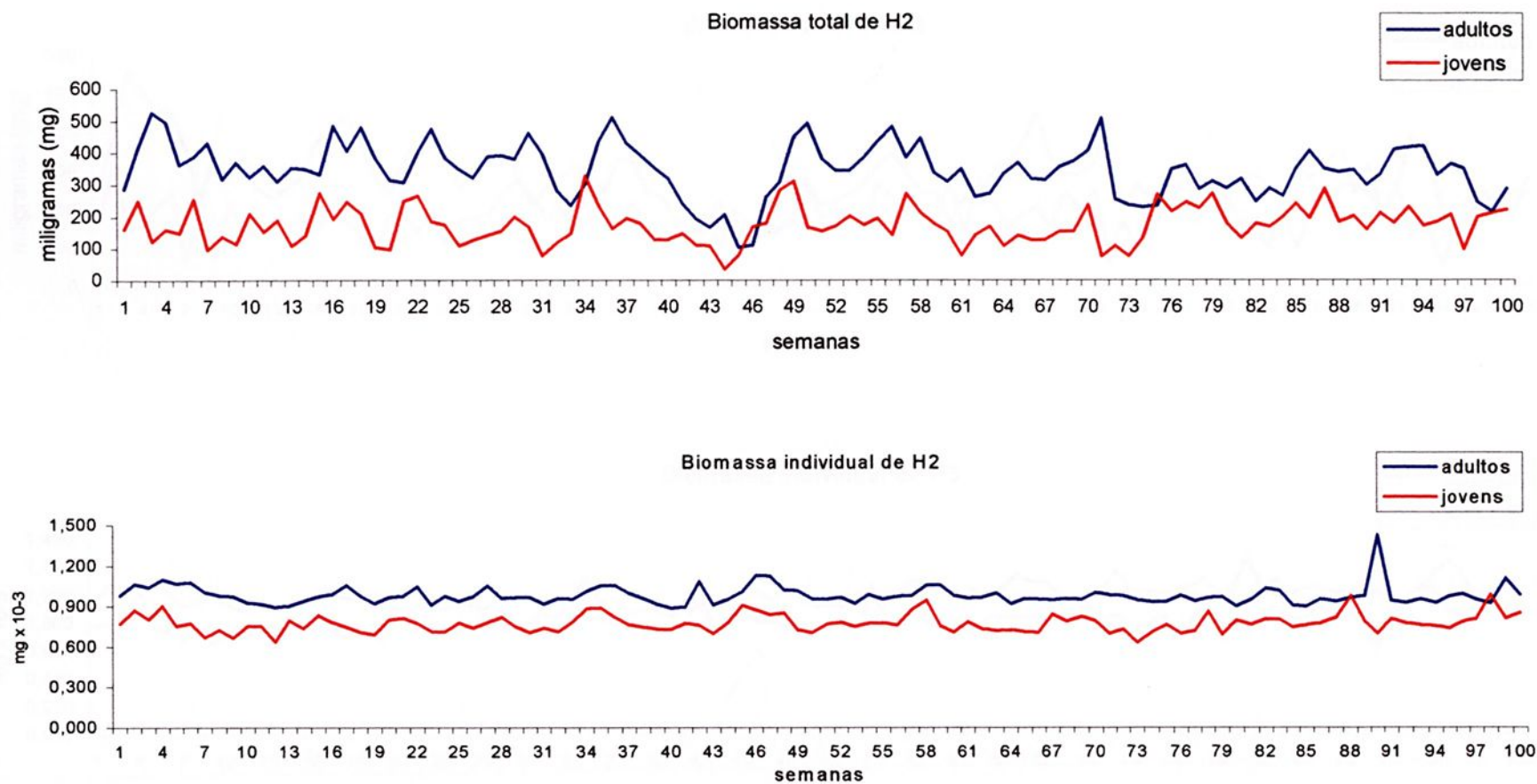


Figura 4. Biomassa total, em miligramas, e Biomassa individual ($\text{mg} \times 10^{-3}$) de adultos e jovens da população H₂, durante os 100 censos semanais do experimento.

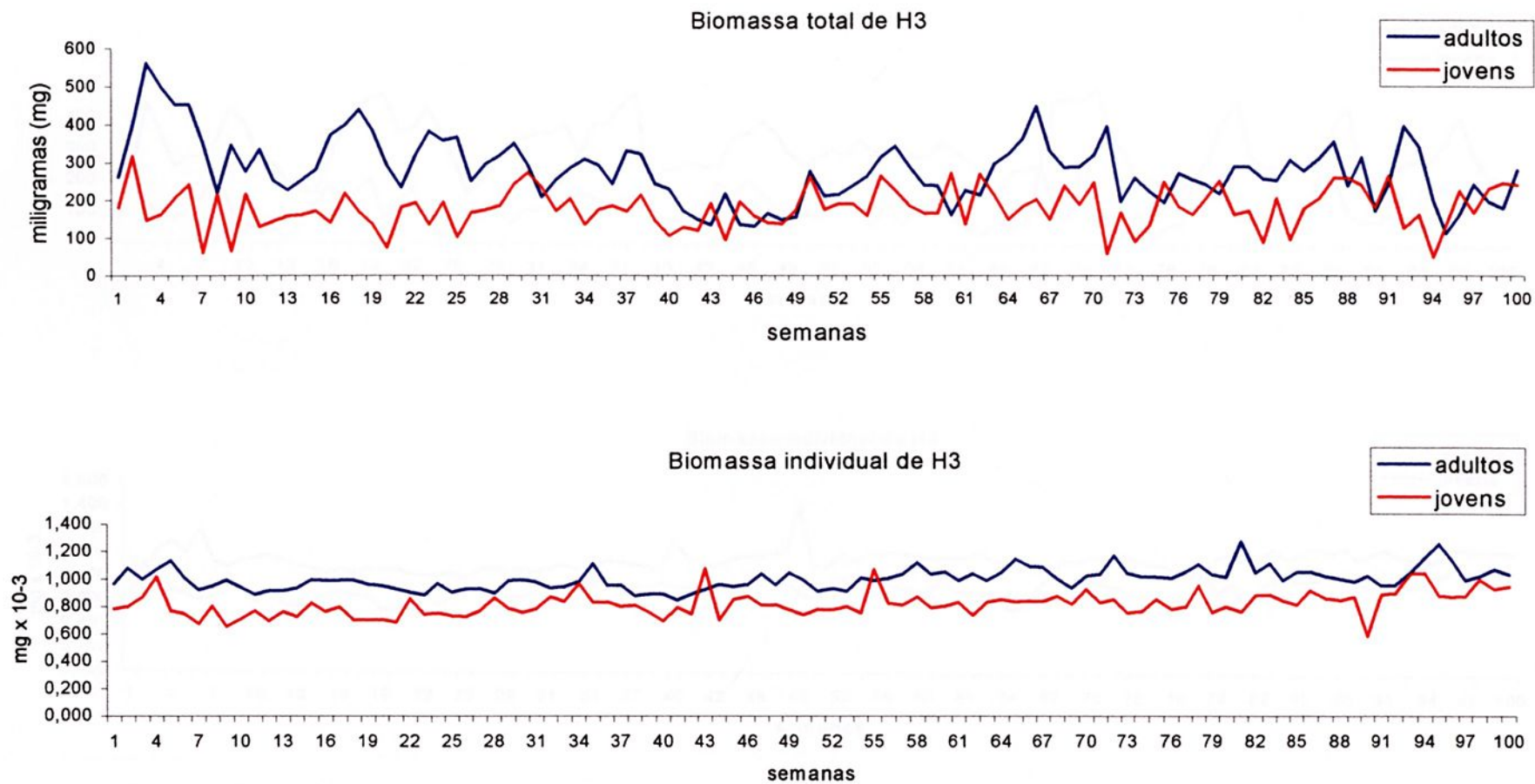


Figura 5. Biomassa total, em miligramas, e Biomassa individual ($\text{mg} \times 10^{-3}$) de adultos e jovens da população H₃, durante os 100 censos semanais do experimento.

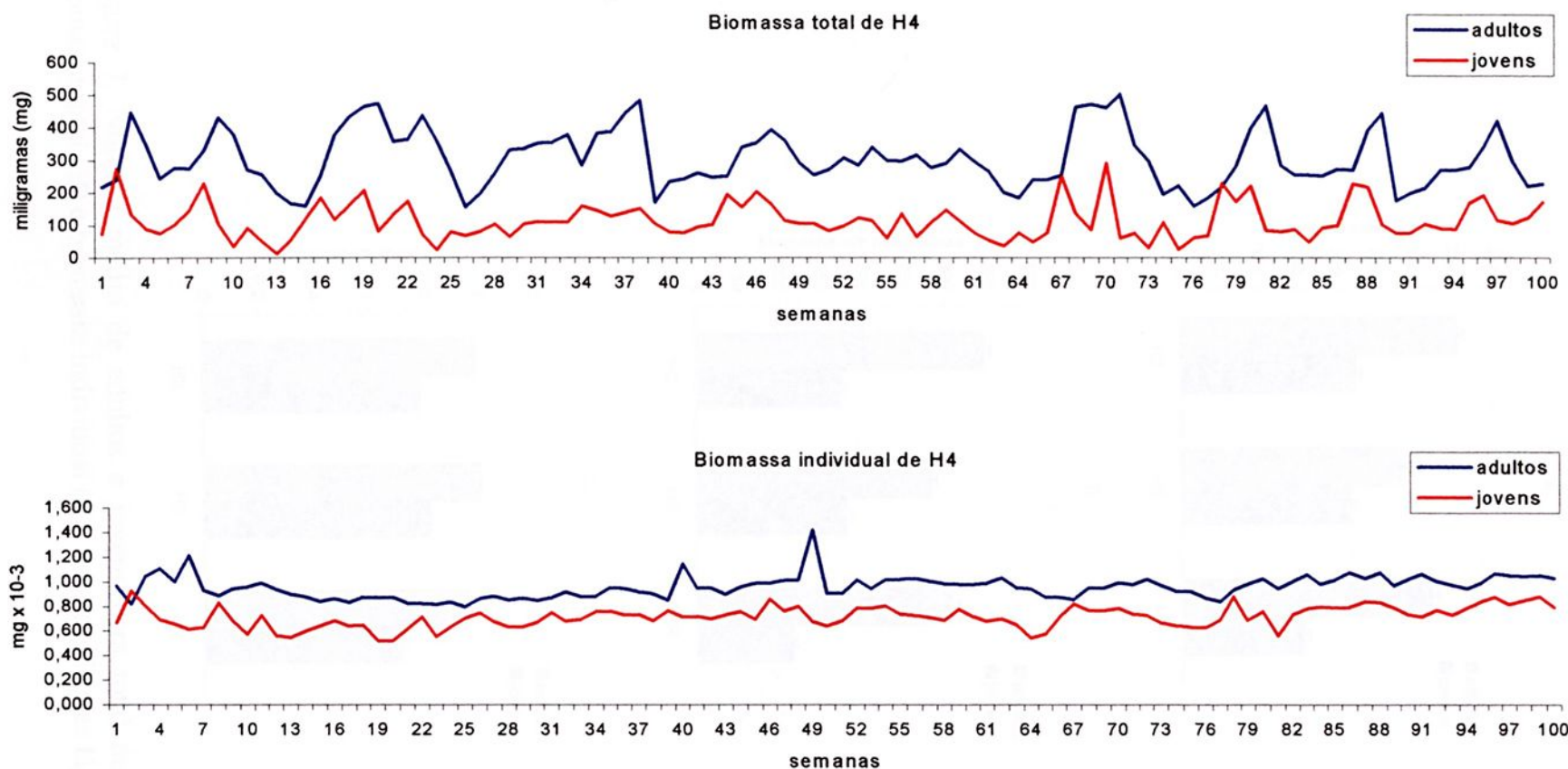


Figura 6. Biomassa total, em miligramas, e Biomassa individual ($\text{mg} \times 10^{-3}$) de adultos e jovens da população H₄, durante os 100 censos semanais do experimento.

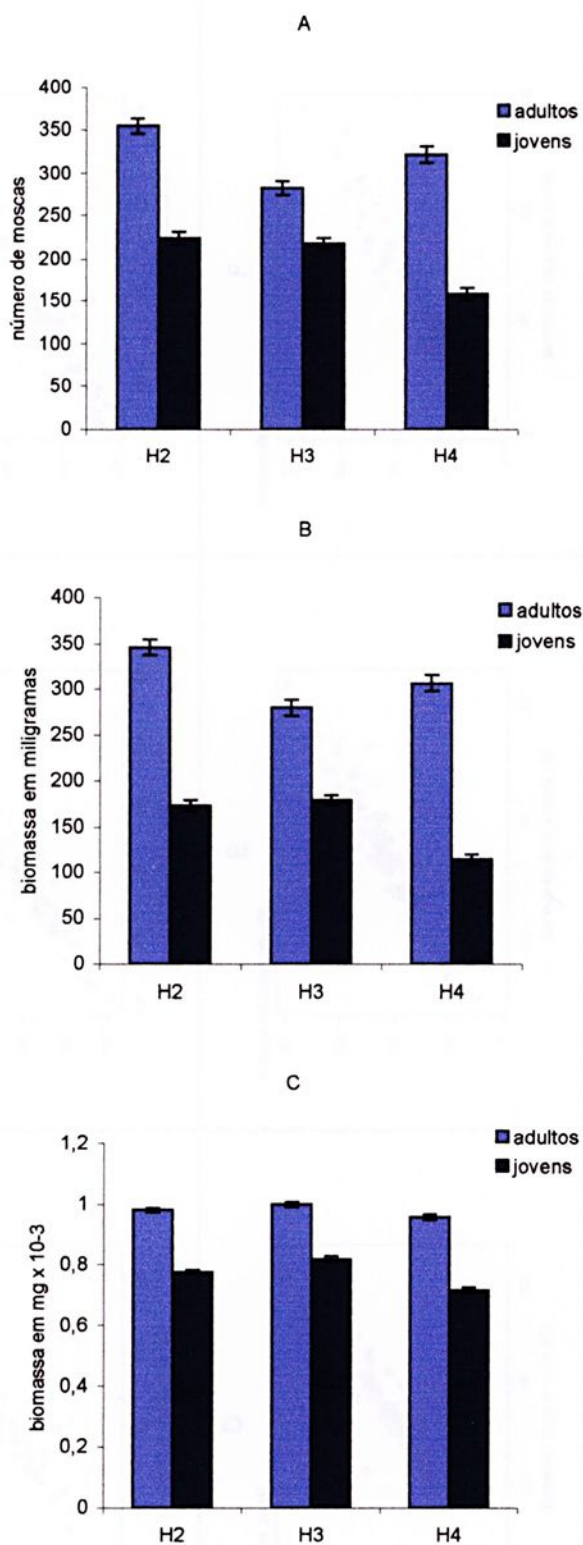


Figura 7. Número médio de adultos e jovens para total de moscas (A), biomassa total (B) e biomassa individual (C), das populações H₂, H₃ e H₄.

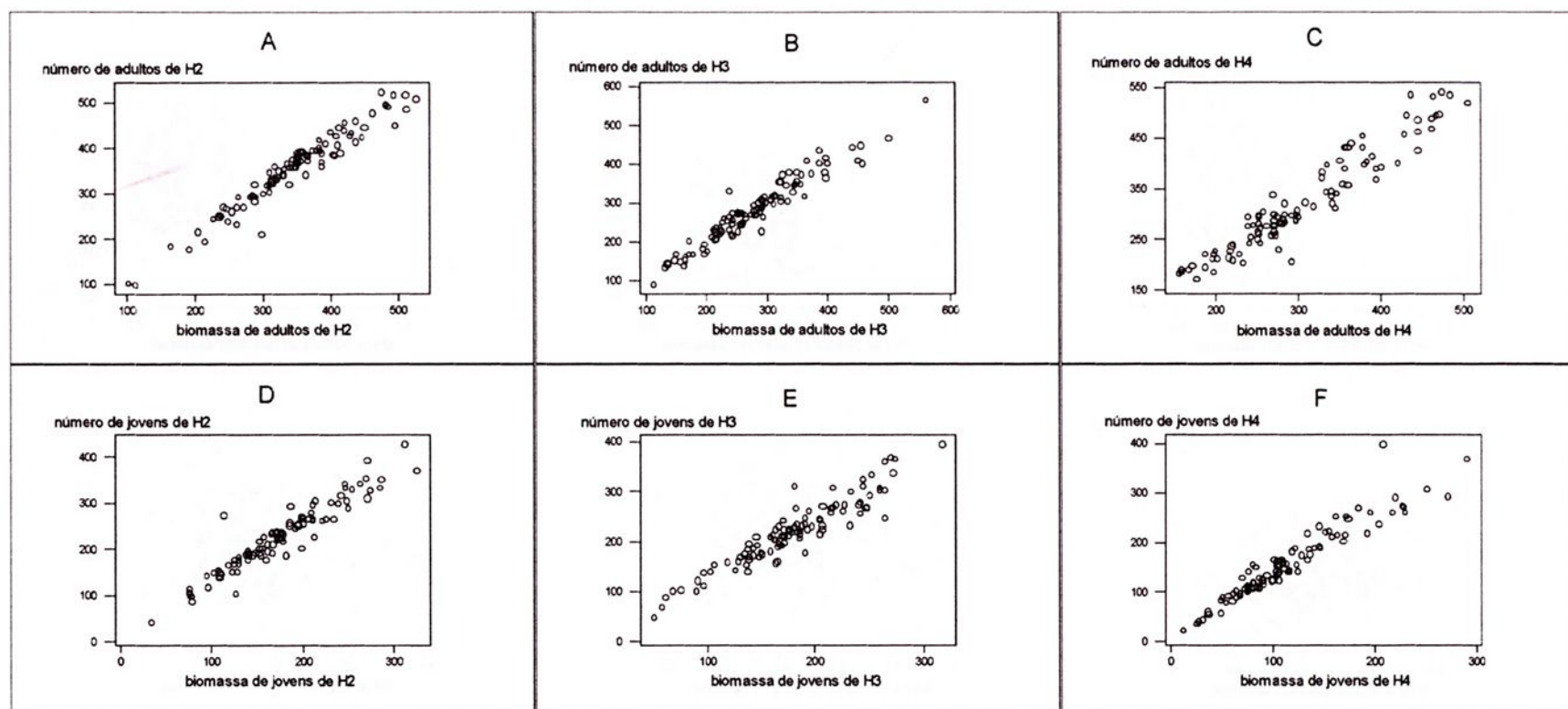


Figura 8. Diagramas de dispersão das variáveis número total de moscas e biomassa total em miligramas das três populações, para adultos na parte superior (A, B, C) e jovens na inferior (A, B, C).

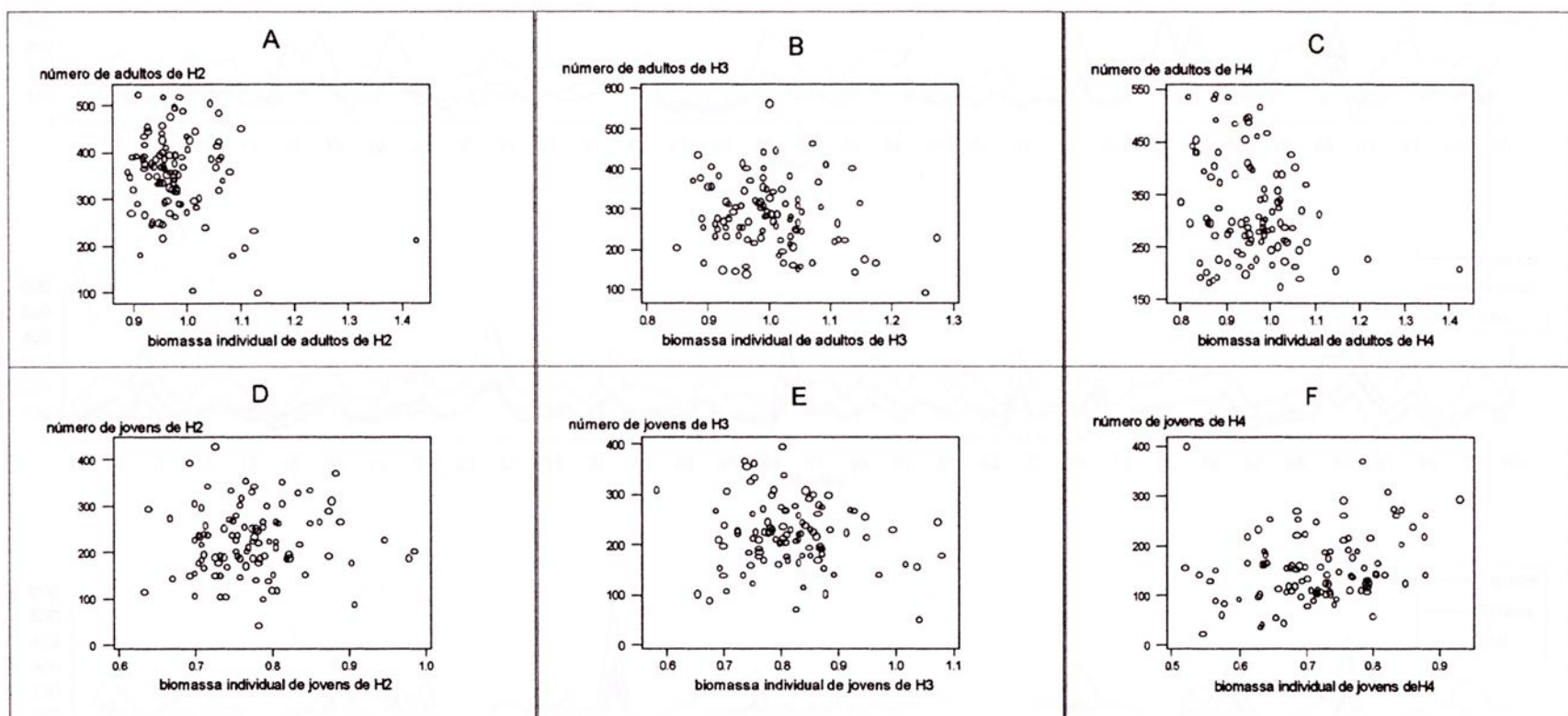


Figura 9. Diagramas de dispersão das variáveis número total de moscas e biomassa individual em $\text{mg} \times 10^{-3}$ das três populações, para adultos na parte superior (A, B, C) e jovens na inferior (A, B, C).

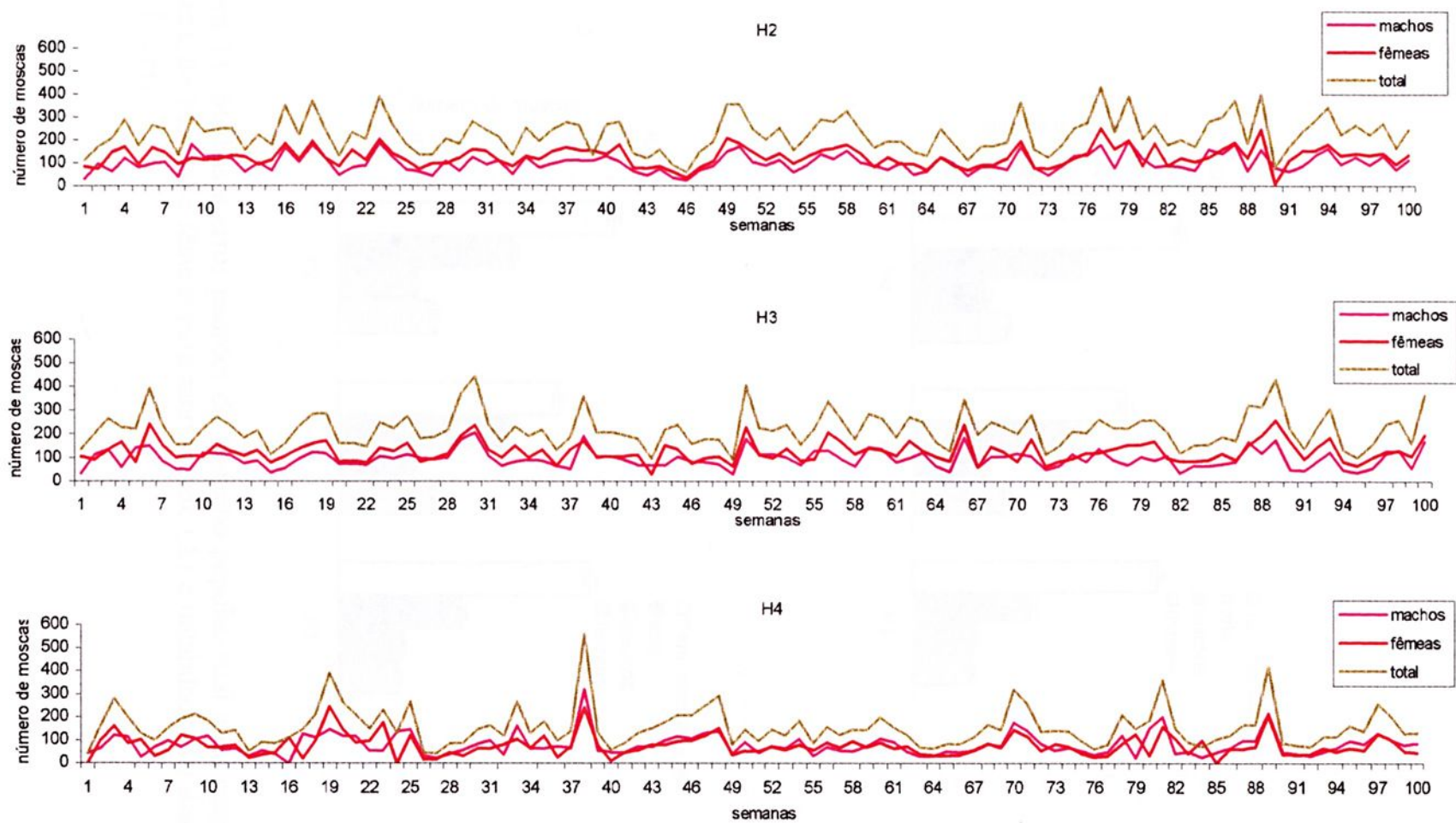


Figura 10. Mortalidade de machos, fêmeas e total de moscas das populações H₂, H₃ e H₄, ao longo dos 100 censos semanais.

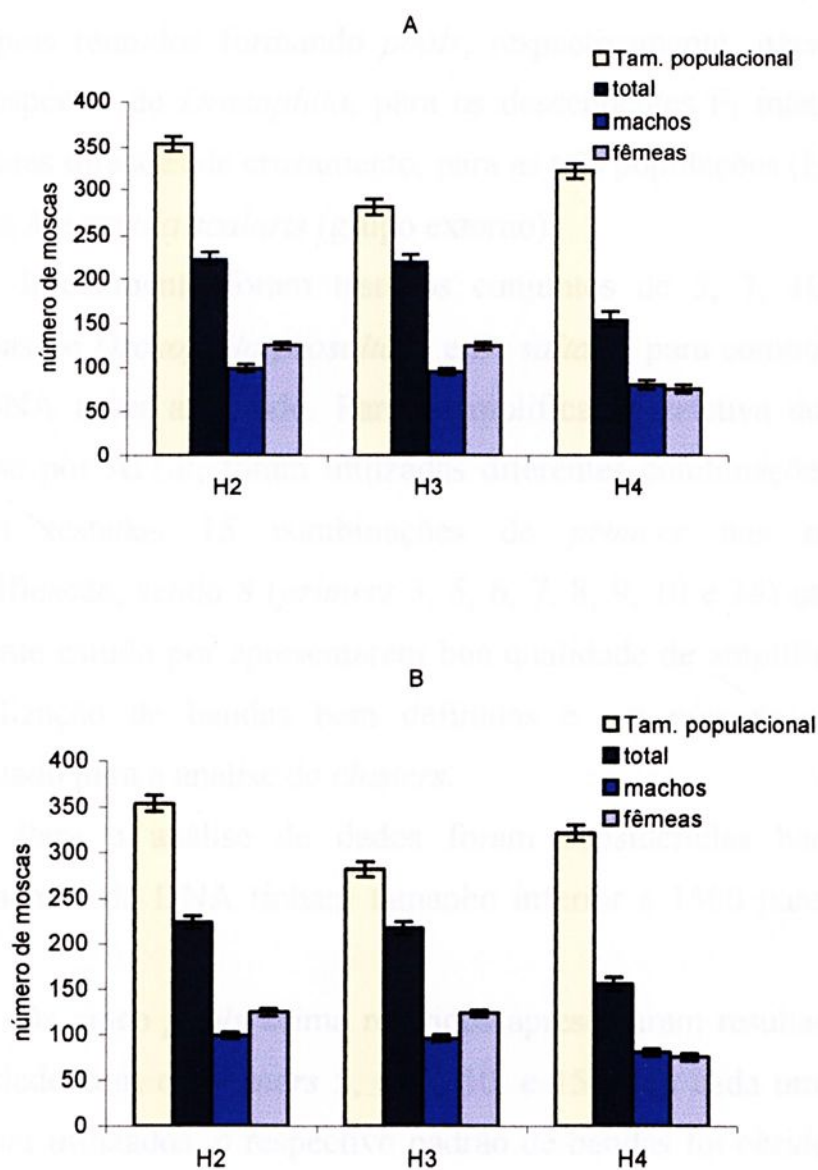


Figura 11. Médias e erros padrões do tamanho populacional e do número total de moscas, de machos e fêmeas para mortalidade (A) e natalidade (B) das populações H₂, H₃ e H₄.

IV.2. Análise Molecular

O DNA genômico de cada indivíduo foi extraído separadamente e depois reunidos formando *pools*, respectivamente, para cada uma das espécies de *Drosophila*, para os descendentes F₁ interespecíficos nas duas direções de cruzamento, para as três populações (H₂, H₃ e H₄) e para *Megaselia scalaris* (grupo externo).

Inicialmente foram testados conjuntos de 5, 7, 10, 15 e 20 moscas de *Drosophila prosaltans* e *D. saltans*, para comporem o *pool* de DNA a ser analisado. Para a amplificação seletiva do DNA, na análise por AFLP, foram utilizadas diferentes combinações. Ao todo foram testadas 15 combinações de *primers* nas reações de amplificação, sendo 8 (*primers* 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15) utilizados no presente estudo por apresentarem boa qualidade de amplificação, com visualização de bandas bem definidas e em número considerado adequado para a análise de *clusters*.

Para a análise de dados foram consideradas bandas cujos fragmentos de DNA tinham tamanho inferior a 1500 pares de bases (pb).

Os cinco *pools* acima referidos apresentaram resultados de boa qualidade com os *primers* 5, 6, 7, 10, e 15. Para cada um dos cinco *primers* utilizados, o respectivo padrão de bandas foi obtido em todos os *pools* testados para *Drosophila prosaltans* e *D. saltans*. A figura 12 apresenta os produtos amplificados pelo *primer* 7, exemplificando o padrão de bandas exibido pelas duas espécies.

O padrão de bandamento obtido com o *primer* 6 (figura 13) foi semelhante entre todos os *pools* de *D. saltans*, em *D. prosaltans*, para

o conjunto de 7 indivíduos o padrão foi diferente apresentando ausência de 2 bandas (setas brancas) e presença de outras 2 (setas pretas).

O padrão de bandas mais diverso entre os cinco *pools* foi apresentado pelos produtos de amplificação produzidos pelo *primer* 5 (figura 14). Em *D. prosaltans* (linhagem P₇₆), onde ocorreu maior diferenciação, cada *pool* apresentou um padrão de bandamento próprio, mesmo tendo algumas bandas compartilhadas. Na outra espécie, *D. saltans* (linhagem S₆), o padrão de bandas foi semelhante para os *pool* 5, 7 e 10, contudo, nos de 15 e 20 indivíduos os padrões foram diferentes entre si e em relação aos demais.

O *pool* composto por amostras de DNA com número variável de indivíduos (5, 7, 10, 15 ou 20), parece não influir no padrão de amplificação do DNA da espécie, porém, o fator mais importante está no emprego das combinações de *primers* que mostraram ter papel importante para evidenciar a variabilidade genética destas duas espécies.

Pelos dados acima descritos foi escolhido o *pool* composto por amostras de DNA de 10 indivíduos para todas as análises no presente trabalho.

Dessa forma, foram realizadas análises comparativas conjuntas de *pools* de DNA de 10 indivíduos machos: das espécies parentais, *Drosophila prosaltans* (linhagem P₇₆) e *D. saltans* (linhagem S₆); dos híbridos F₁ nas duas direções de cruzamentos ($\sigma^7S_{6x}P_{76}$ e $\sigma^7P_{76x}S_6$); das populações H₂, H₃ e H₄; e de *Megaselia scalaris* (grupo externo), empregando-se sete diferentes combinações de *primers* (3, 6, 7, 8, 9, 10 e 15).



Descrições com alguns pormenores do padrão de bandamento serão feitas para três *primers* (*primers* 6, 7 e 8). Estes, juntamente com os demais serão analisados mais à diante.

A análise conjunta do DNA genômico das oito classes de moscas com o *primer* 6, mostrou que cada uma delas apresenta padrão de bandas característico (figura 15). As bandas consideradas na análise foram aquelas de tamanho igual ou inferior a 1500 pares de bases (pb). Fragmentos amplificados maiores que esse valor são difíceis de serem discriminados, por migrarem muito pouco.

No padrão de *D. prosaltans* observou-se a presença de 14 bandas, e em *D. saltans* de 19. Dessas bandas, apenas algumas são compartilhadas pelas duas espécies. A linhagem S_6 de *D. saltans*, apresenta 3 bandas exclusivas, enquanto que a linhagem P_{76} de *D. prosaltans* não apresenta nenhuma com o *primer* 6. Nas populações H_2 , H_3 e H_4 foram observadas respectivamente, 10, 9 e 14 bandas. O padrão de bandamento da população H_4 diferencia das outras duas, por apresentar mais bandas. Apesar de seu padrão de bandas se aproximar muito de S_6 , H_4 apresenta duas bandas iguais as da linhagem P_{76} que não estão presentes em S_6 .

Quanto aos descendentes F_1 dos cruzamentos $\sigma^7 S_6 \times \phi P_{76}$ e $\sigma^7 P_{76} \times \phi S_6$, apresentaram respectivamente, 16 e 17 bandas, cujos padrões foram muito semelhantes, compartilhando a maioria delas.

Com o *primer* 6, *M. scalaris*, apresentou 13 bandas, um dos menores números que esta espécie exibiu, sendo 5 delas compartilhadas com pelo menos uma das classes de *Drosophila*.



A figura 16 ilustra o padrão de bandamento obtido com o *primer* 7 que produziu 84 bandas, sendo o maior número observado na análise conjunta das oito classes de moscas.

A análise comparativa das bandas geradas pelo *primer* 8 (figura 17), mostra que as populações H₂ e H₃ compartilham a grande maioria de suas bandas com as de P₇₆. A população H₄ apresenta um padrão de bandas bastante diferente das duas outras populações, compartilhando mais bandas com a linhagem S₆.

Em todos os padrões de bandas de todas as combinações de *primers*, a maioria das bandas de H₂ e H₃ são compartilhadas com bandas espécie-específicas de *D. prosaltans*, mas essas duas populações compartilharam também bandas espécie-específicas de *D. saltans*.

Os híbridos F₁ do cruzamento ♂S₆×♀P₇₆ compartilham muitas bandas com os híbridos F₁ do cruzamento recíproco. O padrão de bandas dos híbridos F₁ do primeiro cruzamento é praticamente o mesmo das populações H₂ e H₃, que por sua vez são muito próximas de P₇₆, enquanto que, no padrão dos híbridos da outra direção, pelo menos 4 bandas estão ausentes em relação a H₂, H₃ e P₇₆.

O número de bandas produzidas por cada um dos sete *primers* nas oito classes de moscas está apresentado na tabela VIII. Foram observadas 363 bandas ao todo, dos quais *M. scalaris* apresentou 176 bandas, o maior número observado, seguida pelos híbridos F₁ nas duas direções de cruzamentos, 174 para ♂S₆×♀P₇₆ e 151 para o cruzamento recíproco.

Pode-se observar ainda o número de bandas monomórficas (aquelas que estão presentes em todas as classes de moscas) e bandas



exclusivas de *Drosophila* e de *M. scalaris*. Com o *primer* 7 foi obtido o maior número de bandas (84) e também de bandas monomórficas (5), em contraposição, o *primer* 15 apresentou o segundo maior número de bandas monomórficas (3), mesmo sendo o *primer* que menos produziu bandas no total (30).

O maior número de bandas exclusivas de *Drosophila* foi produzido pelos *primers* 3 e 7, seguidos pelo *primer* 10 (tabela IX). Era esperado que *Megaselia scalaris* apresentasse mais bandas exclusivas que *Drosophila*. Das 54 bandas produzidas pelo *primer* 9, mais da metade estão presentes apenas em *M. scalaris*, enquanto das 84 bandas produzidas pelo *primer* 7 apenas 18 são exclusivas de *M. scalaris*.

Com o padrão de bandas obtido para cada *primer* foram construídos dendogramas representativos da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento utilizando o método UPGMA (figuras 15 a 21).

O dendograma obtido com os dados relativos ao *primer* 3 agrupou a linhagem P₇₆ e as populações H₂ e H₃ em um *cluster* e a linhagem S₆, a população H₄, e os descendentes F₁ dos dois cruzamentos ($\sigma^7S_6 \times \varphi P_{76}$ e $\sigma^7P_{76} \times S_6$) em outro *cluster*, e como esperado *M. scalaris* (grupo externo) manteve-se como um grupo à parte (figura 18). Dentro do primeiro *cluster*, H₂ e H₃ foram agrupadas com distância genética de cerca de 0,05. O segundo *cluster* está subdividido em dois grupos, de um lado a linhagem S₆ e a população H₄, e de outro, os descendentes F₁ dos cruzamentos $\sigma^7S_6 \times \varphi P_{76}$ e $\sigma^7P_{76} \times \varphi S_6$.



A figura 19 ilustra o dendograma gerado pelos produtos amplificados obtidos com o *primer* 6 distinguindo também dois *clusters*, um deles compreendendo a linhagem P₇₆ e as populações H₂ e H₃ e outro a linhagem S₆, a população H₄ e os descendentes dos cruzamentos ♂S₆×♀P₇₆ e ♂P₇₆×♀S₆, além do grupo externo (*M. scalaris*) distante dos demais. Neste dendograma, o *cluster* envolvendo P₇₆, H₂ e H₃ é semelhante ao gerado pelo *primer* 3, contudo as distâncias genéticas entre eles são maiores. Ao grupo formado pelos descendentes F₁ dos cruzamentos ♂S₆×♀P₇₆ e ♂P₇₆×♀S₆ junta-se H₄, e que eles, por sua vez, aproximam-se de S₆, formando segundo *cluster*.

O *primer* 7 produziu um padrão de bandas cujo dendograma está apresentado na figura 20. O perfil deste dendograma é semelhante ao do *primer* 3. Os mesmos grupamentos são observados nos dois diagramas, diferindo apenas quanto às distâncias genéticas. De modo geral, os *clusters* relativos à *Drosophila* apresentaram maiores distâncias genéticas utilizando-se o *primer* 7 do que o *primer* 3. Todavia, a distância genética das classes de *Drosophila* em relação à *M. scalaris* foi praticamente o mesmo nos dois casos, acima de 0,6.

No dendograma gerado a partir dos dados referentes ao *primer* 8 (figura 21), os indivíduos F₁ do cruzamento ♂S₆×♀P₇₆ foram agrupados junto à H₂ e H₃ e próximos à P₇₆, formando um *cluster*; S₆, H₄ e os descendentes F₁ do cruzamento ♂P₇₆×♀S₆ em outro *cluster*, com distância genética de aproximadamente 0,02, e permanecendo o grupo externo isolado.

A figura 22 apresenta o dendograma gerado pelos produtos amplificados com o *primer* 9, onde foram verificadas as menores

distâncias genéticas entre as classes de moscas estudadas, com exceção do grupo externo quando comparadas aos demais dendogramas analisados. A maior distância verificada entre as classes de *Drosophila* é por volta de 0,26, enquanto para a maioria dos outros dendogramas a distância é acima de 0,3. As classes de *Drosophila* foram divididas em dois grupos, S_6 e H_4 de um lado e P_{76} , H_2 , H_3 , descendentes F_1 nas duas direções de cruzamento ($\sigma^7 S_6 \times \varphi P_{76}$ e $\sigma^7 P_{76} \times \varphi S_6$) de outro. No segundo grupo, há duas subdivisões, uma com os descendentes F_1 dos cruzamentos interespecíficos, e outra com P_{76} , H_2 e H_3 . As duas últimas (H_2 e H_3) estão muito próximas apresentando distância genética de apenas 0,02.

Os agrupamentos do dendograma da figura 23 foram obtidos utilizando-se o *primer* 10. As populações H_2 e H_3 que estão no mesmo grupo, separam-se das demais classes de moscas que foram reunidas em outro grupo. Neste grande grupo, os subgrupos mais próximos entre si foram H_4 e descendentes F_1 do cruzamento $\sigma^7 S_6 \times \varphi P_{76}$, seguidos por S_6 e descendentes F_1 do cruzamento $\sigma^7 P_{76} \times S_6$, ficando P_{76} o mais distante dos demais. O grupo externo sempre manteve-se mais afastado do restante.

Na figura 24 o dendograma gerado pelo *primer* 15 dividiu as classes de moscas em dois *clusters*. No primeiro, P_{76} está agrupado próximo a H_2 e H_3 , e essas três aproxima-se dos descendentes F_1 do cruzamento $\sigma^7 S_6 \times \varphi P_{76}$ distanciando-se dos descendentes F_1 do cruzamento $\sigma^7 P_{76} \times S_6$. No segundo grupo, S_6 e H_4 , que mais se assemelham, formam um *cluster* com *M. scalaris*, diferindo de todas as outras situações, em que esta sempre se manteve isolada.

Uma análise conjunta de todos os produtos amplificados por cada um dos *primers* está apresentada no dendograma da figura 25. Todos os 363 marcadores produzidos com os sete *primers* mostram que o perfil desse dendograma é o mesmo apresentado pelos *primers* 3 e 7 (figuras 18 e 20 respectivamente), diferindo apenas quanto às distâncias genéticas. No entanto, o dendograma do *primer* 7 é o que mais se aproxima desse dendograma de dados reunidos também por apresentar distâncias genéticas menores.

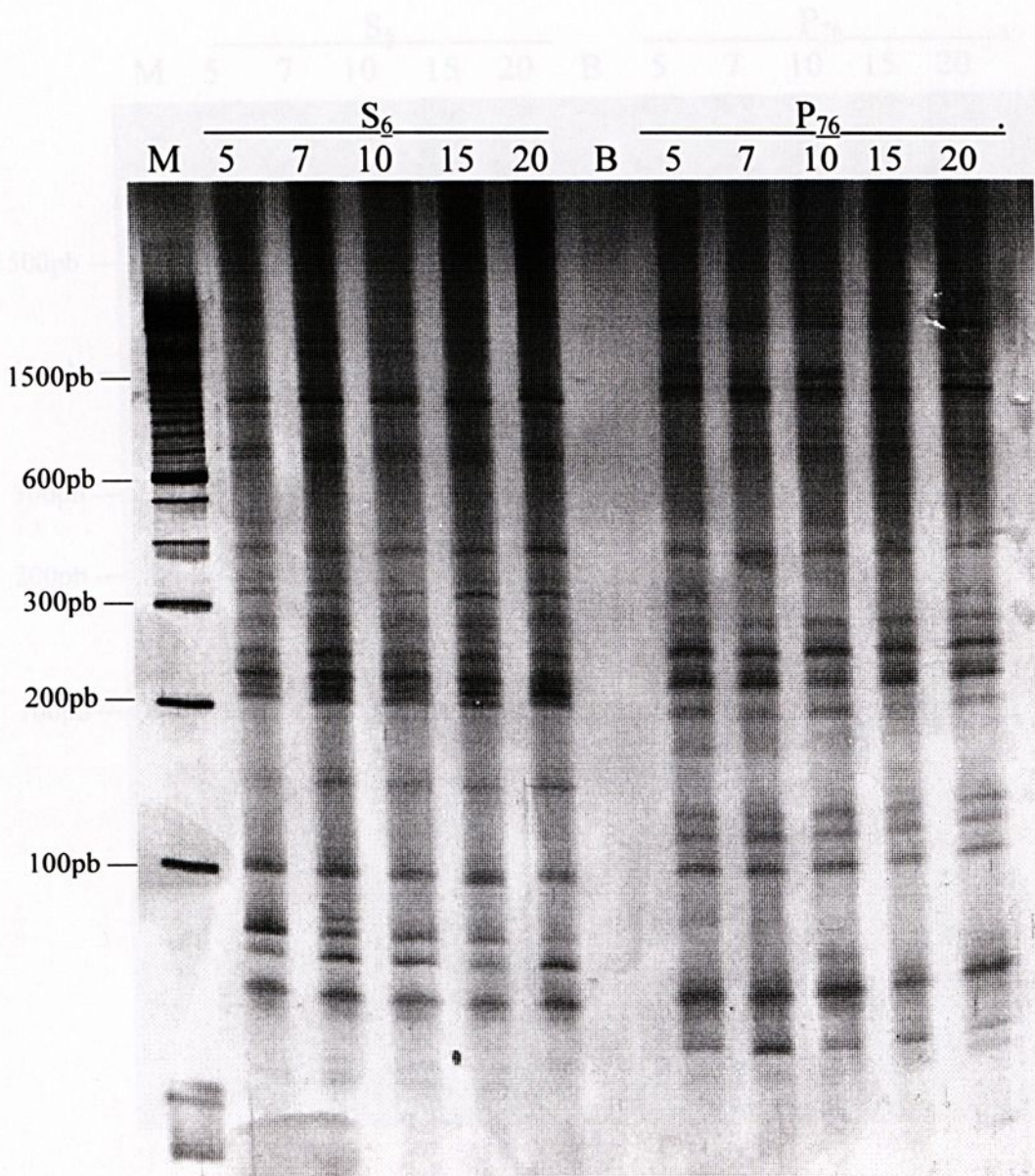


Figura 12. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 8% dos produtos amplificados com o *primer 7* para os *pools* de 5, 7, 10, 15 e 20 indivíduos da linhagem S₆ de *Drosophila saltans* e da linhagem P₇₆ de *D. prosaltans*. M = marcador de peso molecular de 100 pb; B = controle negativo.

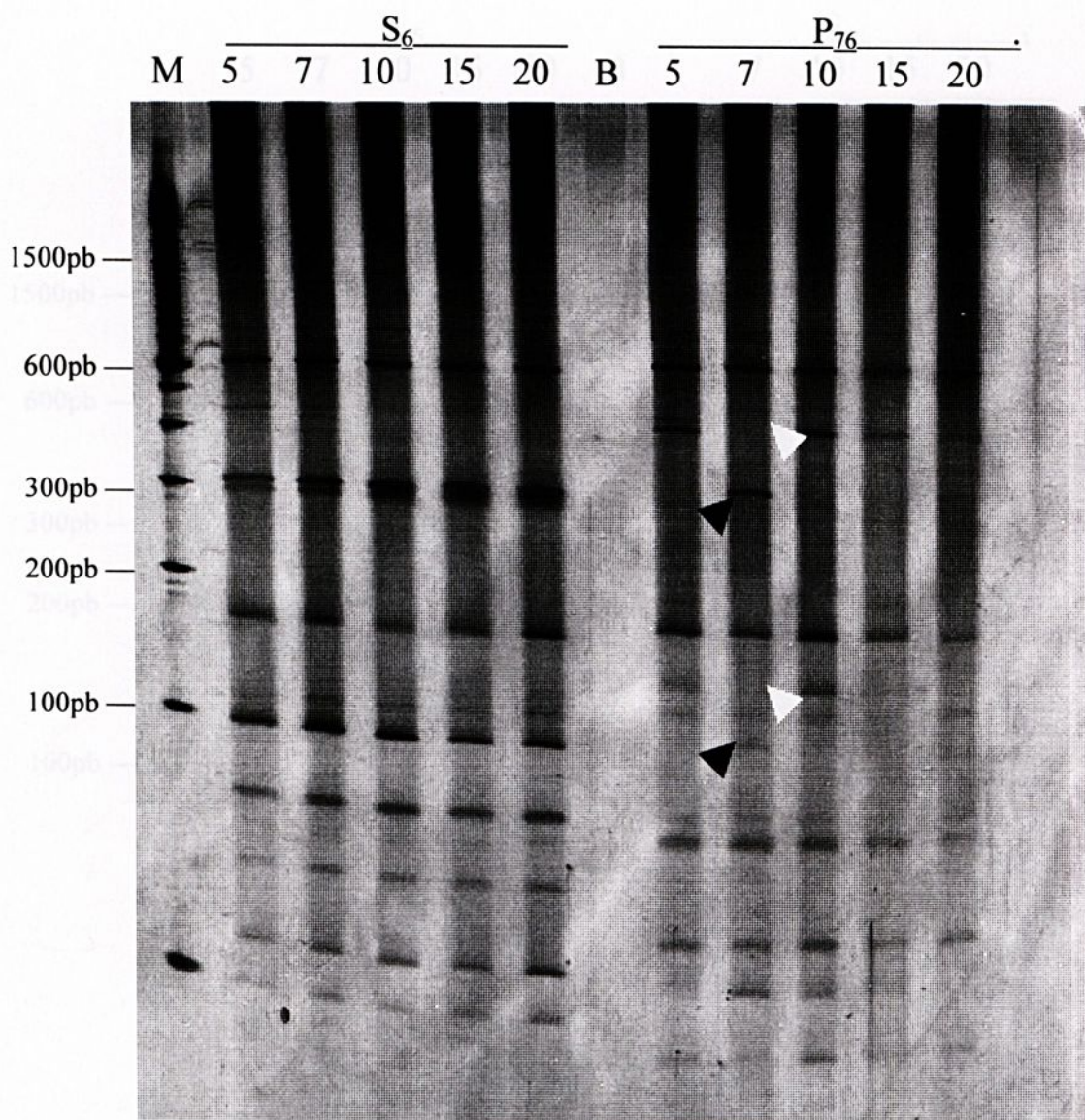


Figura 13. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 8% dos produtos amplificados com o *primer* 6 para os *pools* de 5, 7, 10, 15 e 20 indivíduos da linhagem S₆ de *Drosophila saltans* e da linhagem P₇₆ de *D. prosaltans*. As setas brancas indicam as bandas ausentes e as setas pretas indicam as bandas exclusivas no *pool* de 7 indivíduos da linhagem P₇₆. M = marcador de peso molecular de 100 pb; B = controle negativo.

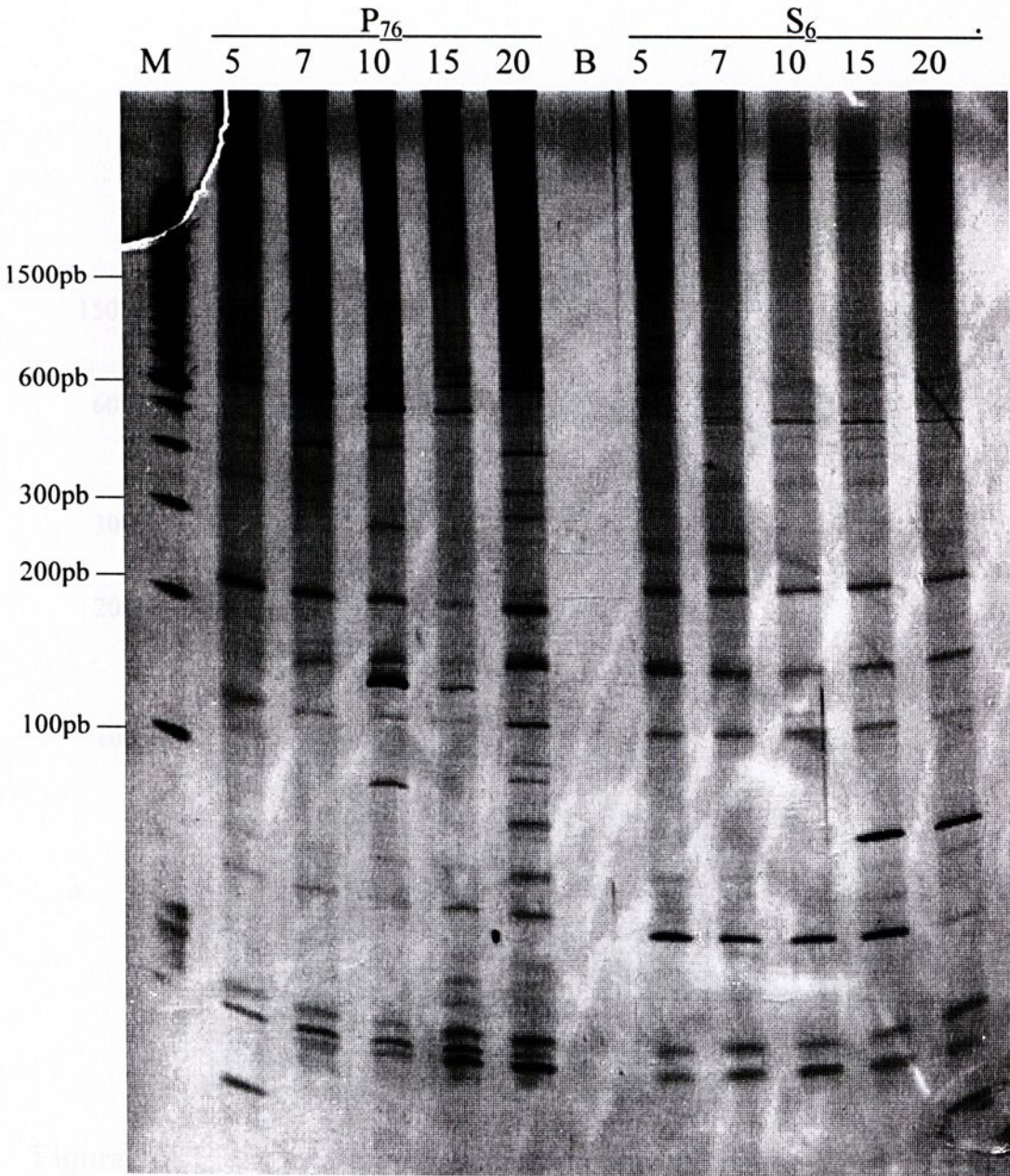


Figura 14. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 8% dos produtos amplificados com o *primer* 5 para os *pools* de 5, 7, 10, 15 e 20 indivíduos da linhagem P₇₆ de *Drosophila prosaltans* da linhagem S₆ de *D. saltans*. M = marcador de peso molecular de 100 pb; B = controle negativo.

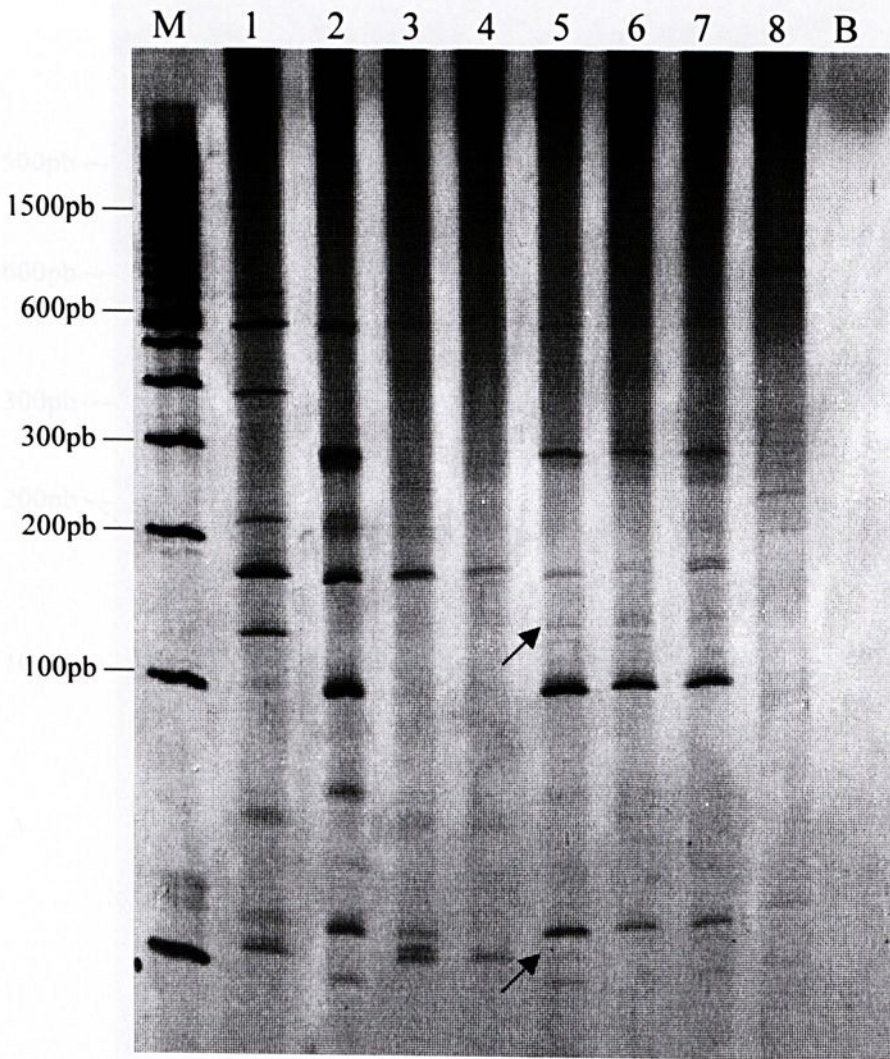


Figura 15. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 8% dos produtos amplificados com o *primer* 6. As setas indicam as bandas de H₄ que estão presentes em P₇₆ mas não em S₆. M = marcador de peso molecular de 100 pb; 1 = P₇₆; 2 = S₆; 3 = H₂; 4 = H₃; 5 = H₄; 6 = ♂S₆x♀P₇₆; 7 = ♂P₇₆x♀S₆; 8 = *Megaselia scalaris*; B = controle negativo.

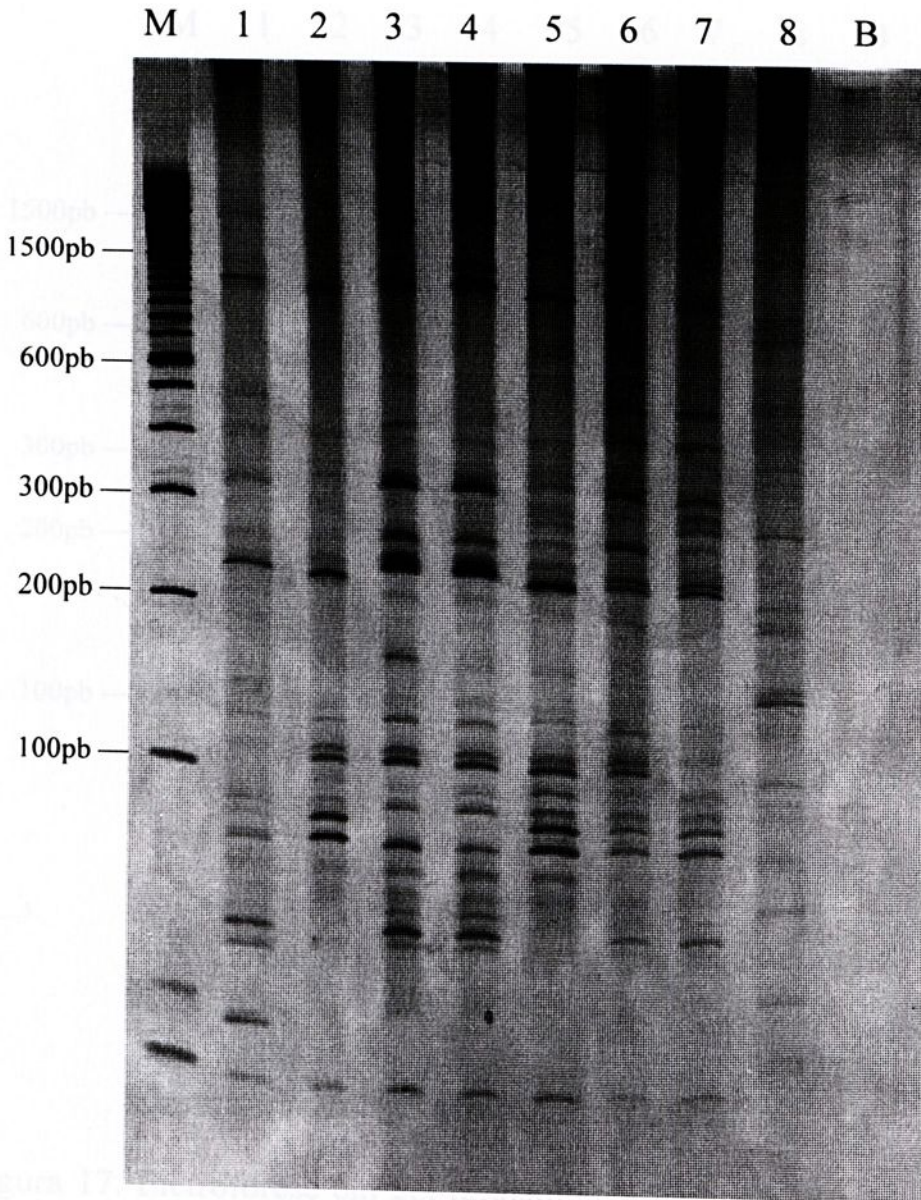


Figura 16. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 8% dos produtos amplificados com o *primer* 7. M = marcador de peso molecular de 100 pb; 1 = P₇₆; 2 = S₆; 3 = H₂; 4 = H₃; 5 = H₄; 6 = ♂S₆x♀P₇₆; 7 = ♂P₇₆x♀S₆; 8 = *Megaselia scalaris*; B = controle negativo.

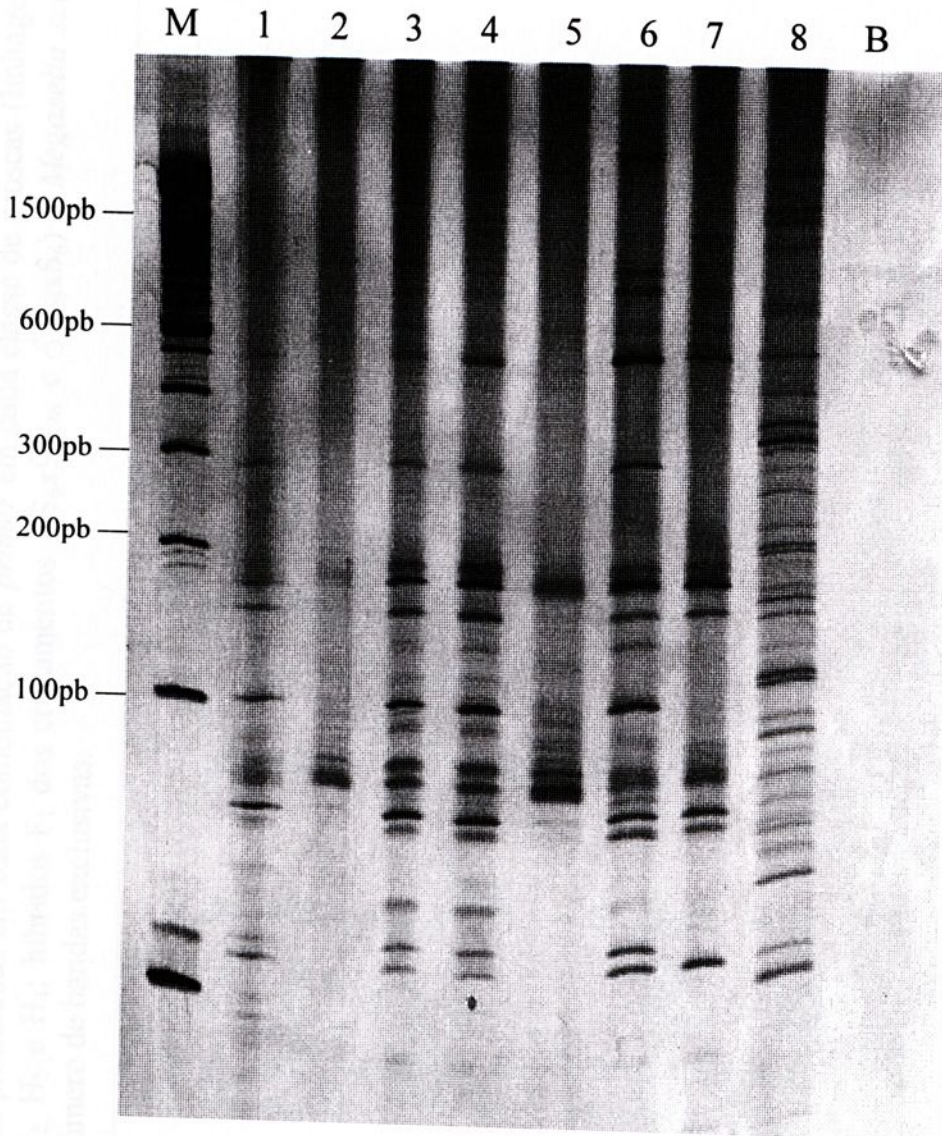


Figura 17. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 8% dos produtos amplificados com o *primer* 8. M = marcador de peso molecular de 100 pb; 1 = P₇₆; 2 = S₆; 3 = H₂; 4 = H₃; 5 = H₄; 6 = ♂S₆x♀P₇₆; 7 = ♂P₇₆x♀S₆; 8 = *Megaselia scalaris*; B = controle negativo.

Tabela VIII. Número de bandas produzidas em cada combinação de *primer* em cada classe de moscas (linhagens P₇₆ e S₆ de *Drosophila*; populações H₂, H₃ e H₄; híbridos F₁ dos cruzamentos ♂S₆x♀P₇₆ e ♂P₇₆x♀S₆) e *Megaselia scalaris*. T = número total de bandas; E = número de bandas exclusivas.

Primer			Classes de moscas							
	Nº de bandas		P ₇₆	S ₆	H ₂	H ₃	H ₄	♂S ₆ x♀P ₇₆	♂P ₇₆ x♀S ₆	<i>M. scalaris</i>
Primer 3	E	21	2	1	1	-	-	2	-	15
	T	49	18	16	15	14	10	25	20	21
Primer 6	E	11	-	3	-	-	-	-	-	8
	T	34	14	19	10	9	14	16	17	13
Primer 7	E	23	3	-	-	1	1	-	-	18
	T	84	26	28	38	44	32	40	38	43
Primer 8	E	21	-	-	-	-	-	-	-	21
	T	53	19	10	21	22	9	24	18	33
Primer 9	E	31	-	1	-	-	-	-	1	29
	T	54	14	12	11	12	9	19	20	37
Primer 10	E	9	-	1	-	-	-	-	-	8
	T	59	26	27	24	23	26	28	18	21
Primer 15	E	4	-	-	-	-	-	-	-	4
	T	30	19	12	22	21	8	22	20	8
Total	E	120	5	6	1	1	1	2	1	103
	T	363	136	124	131	145	108	174	151	176



Tabela IX. Número total de bandas produzidas por cada primer, monomórficas, exclusivas de *Drosophila* (linhagens P₇₆ e S₆; populações H₂, H₃ e H₄; indivíduos F₁ dos cruzamentos ♂S₆×♀P₇₆ e ♂P₇₆×S₆) e de *Megaselia scalaris*.

Primers	Bandas			
	Total	Monomórficas	Exclusivas	
			<i>Drosophila</i>	<i>M. scalaris</i>
Primer 3	49	1	5	15
Primer 6	34	-	1	8
Primer 7	84	5	5	18
Primer 8	53	2	1	21
Primer 9	54	2	1	29
Primer 10	59	3	4	8
Primer 15	30	3	1	4

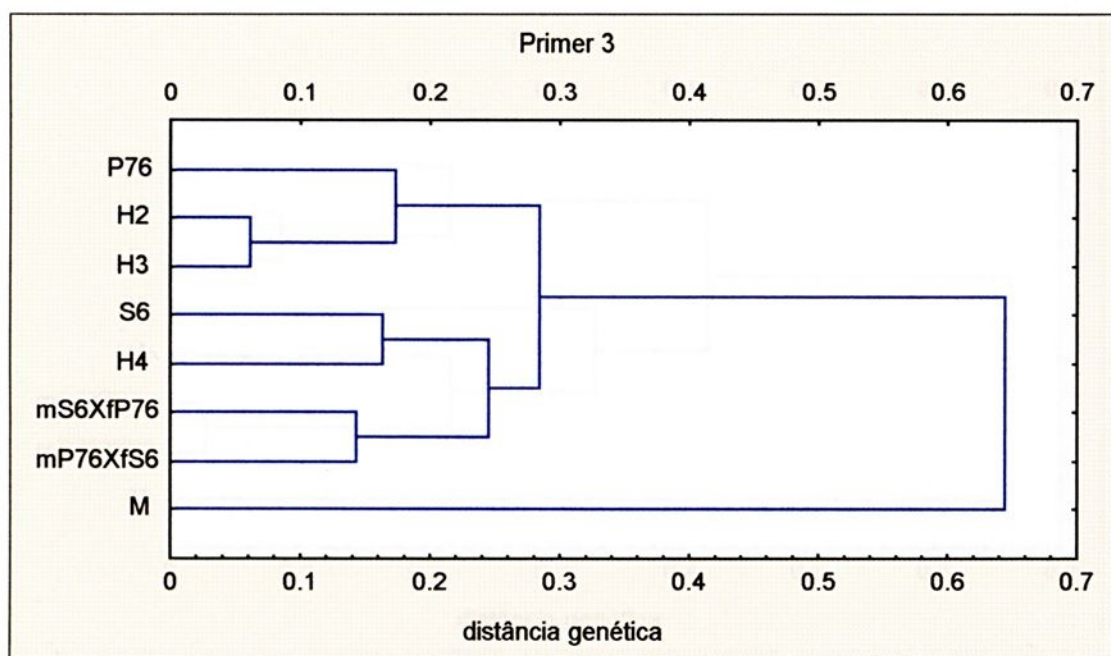


Figura 18. Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método UPGMA obtido com o *primer 3* entre indivíduos das linhagens parentais de *Drosophila* (P₇₆ e S₆), F₁ dos cruzamentos nas duas direções (mS₆xfP₇₆ e mP₇₆xfS₆), das populações H₂, H₃ e H₄ e *Megaselia scalaris* (M).

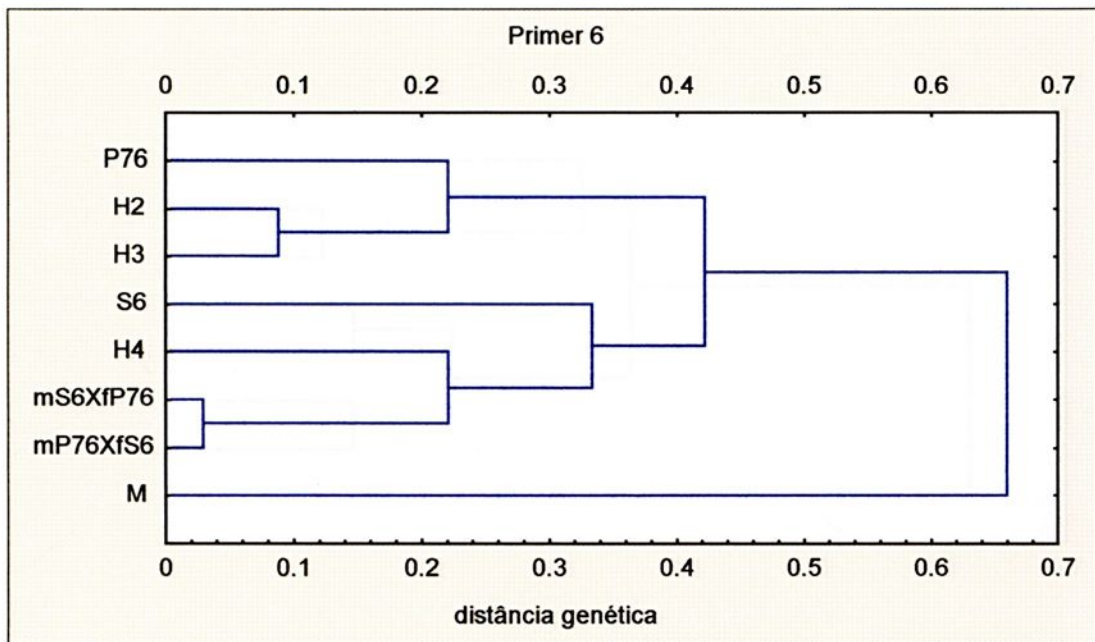


Figura 19. Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método UPGMA obtido com o *primer 6* entre indivíduos das linhagens parentais de *Drosophila* (P₇₆ e S₆), F₁ dos cruzamentos nas duas direções (mS₆xfP₇₆ e mP₇₆xfS₆), das populações H₂, H₃ e H₄ e *Megaselia scalaris* (M).

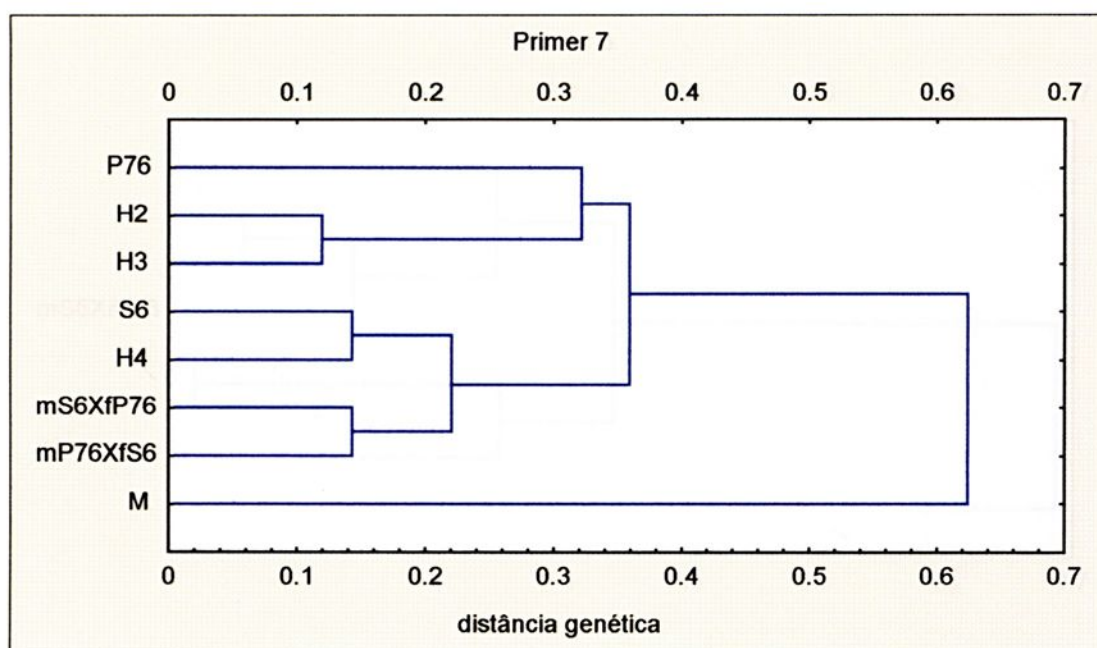


Figura 20. Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método UPGMA obtido com o *primer 7* entre indivíduos das linhagens parentais de *Drosophila* (P₇₆ e S₆), F₁ dos cruzamentos nas duas direções (mS₆xfP₇₆ e mP₇₆xfS₆), das populações H₂, H₃ e H₄ e *Megaselia scalaris* (M).

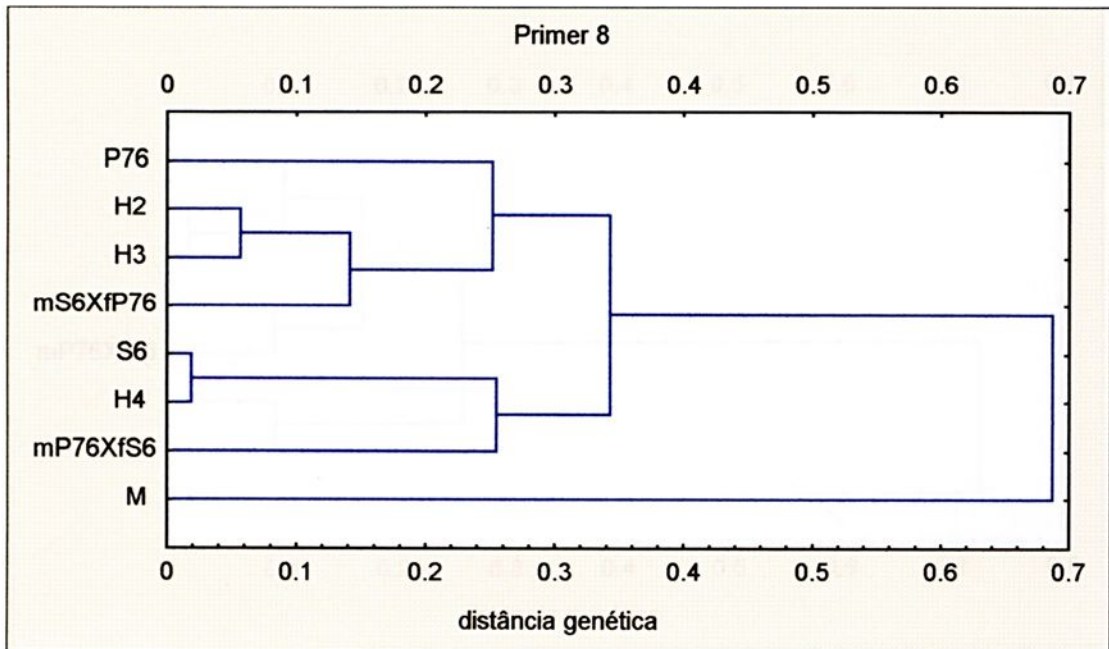


Figura 21. Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método UPGMA obtido com o *primer 8* entre indivíduos das linhagens parentais de *Drosophila* (P₇₆ e S₆), F₁ dos cruzamentos nas duas direções (mS₆xfP₇₆ e mP₇₆xfS₆), das populações H₂, H₃ e H₄ e *Megaselia scalaris* (M).

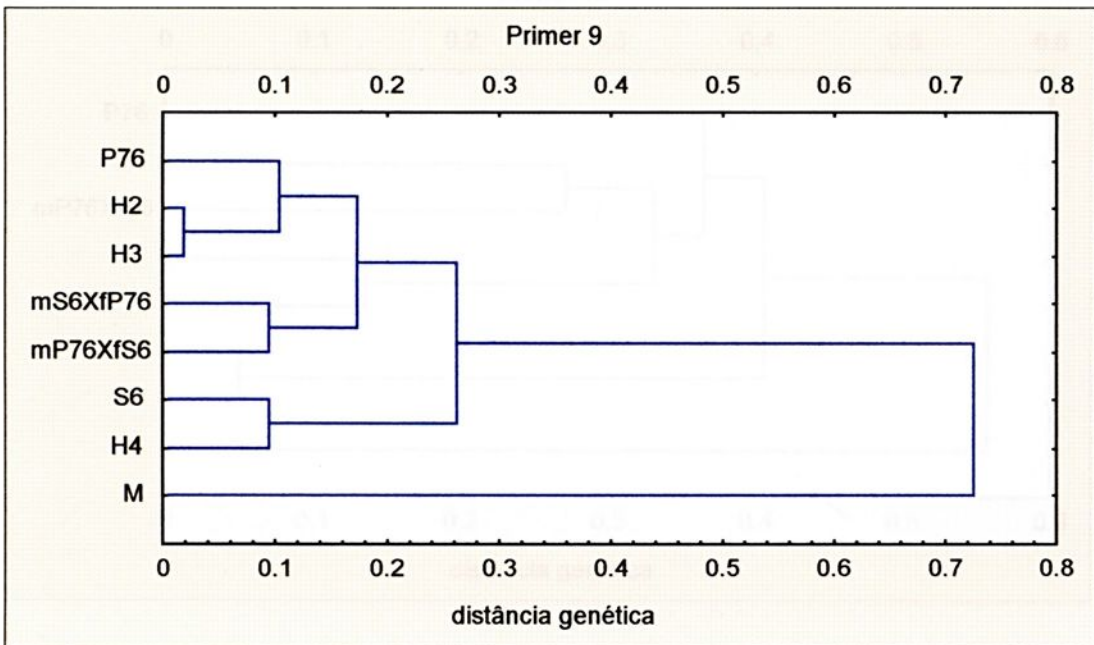


Figura 22. Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método UPGMA obtido com o *primer* 9 entre indivíduos das linhagens parentais de *Drosophila* (P_{76} e S_6), F_1 dos cruzamentos nas duas direções ($mS_6 \times fP_{76}$ e $mP_{76} \times fS_6$), das populações H_2 , H_3 e H_4 e *Megaselia scalaris* (M).

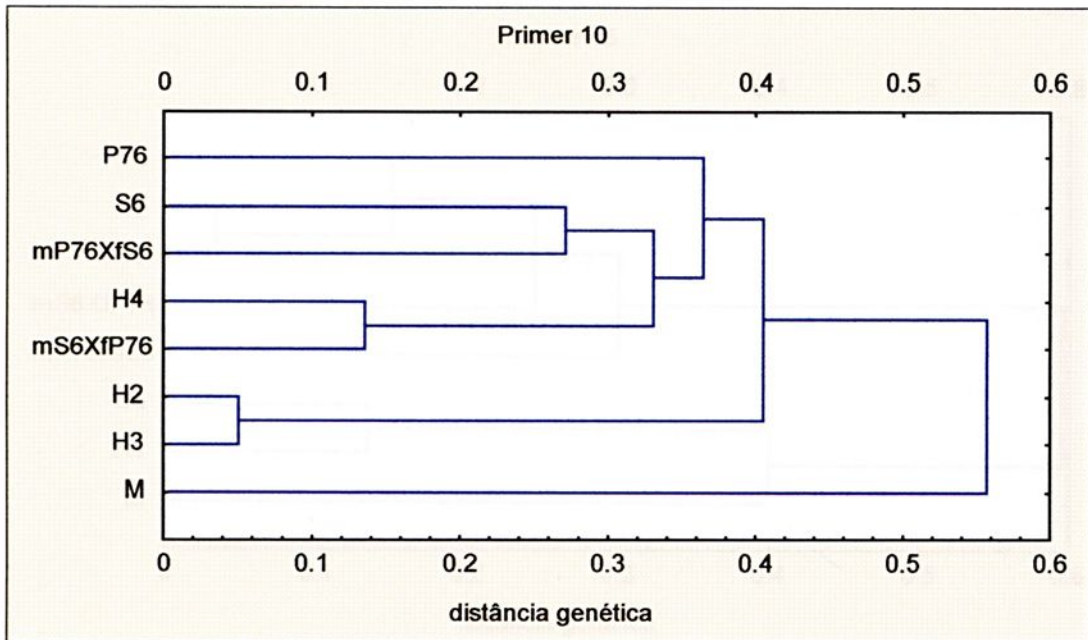


Figura 23. Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método UPGMA obtido com o *primer* 10 entre indivíduos das linhagens parentais de *Drosophila* (P₇₆ e S₆), F₁ dos cruzamentos nas duas direções (mS₆xfP₇₆ e mP₇₆xfS₆), das populações H₂, H₃ e H₄ e *Megaselia scalaris* (M).

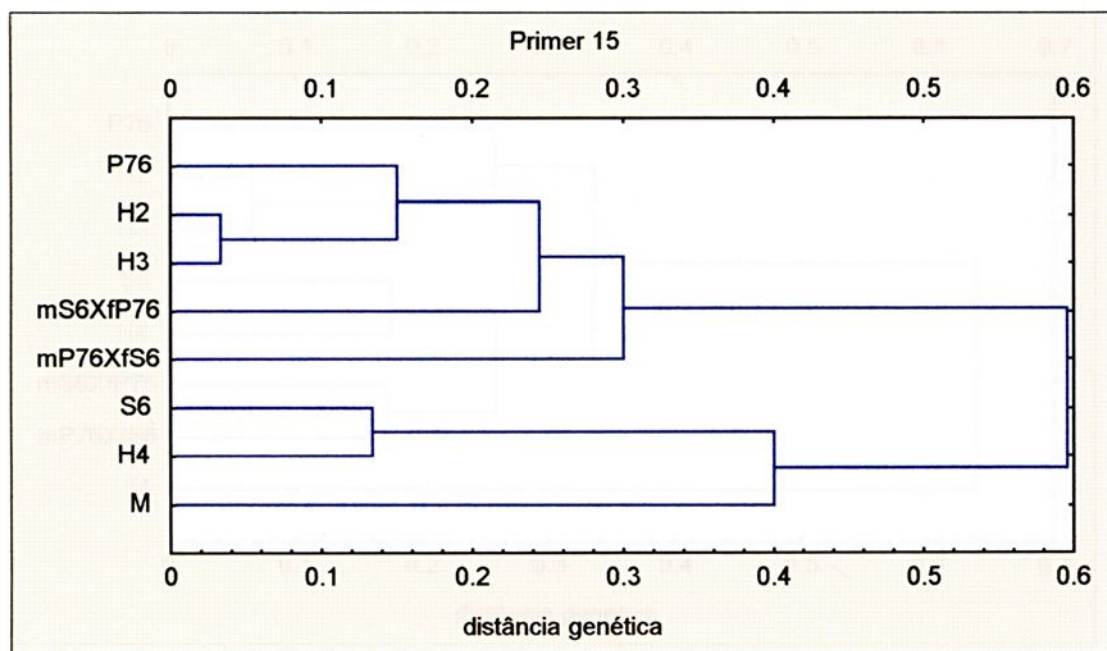


Figura 24. Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método UPGMA obtido com o *primer* 15 entre indivíduos das linhagens parentais de *Drosophila* (P₇₆ e S₆), F₁ dos cruzamentos nas duas direções (mS₆xfP₇₆ e mP₇₆xfS₆), das populações H₂, H₃ e H₄ e *Megaselia scalaris* (M).

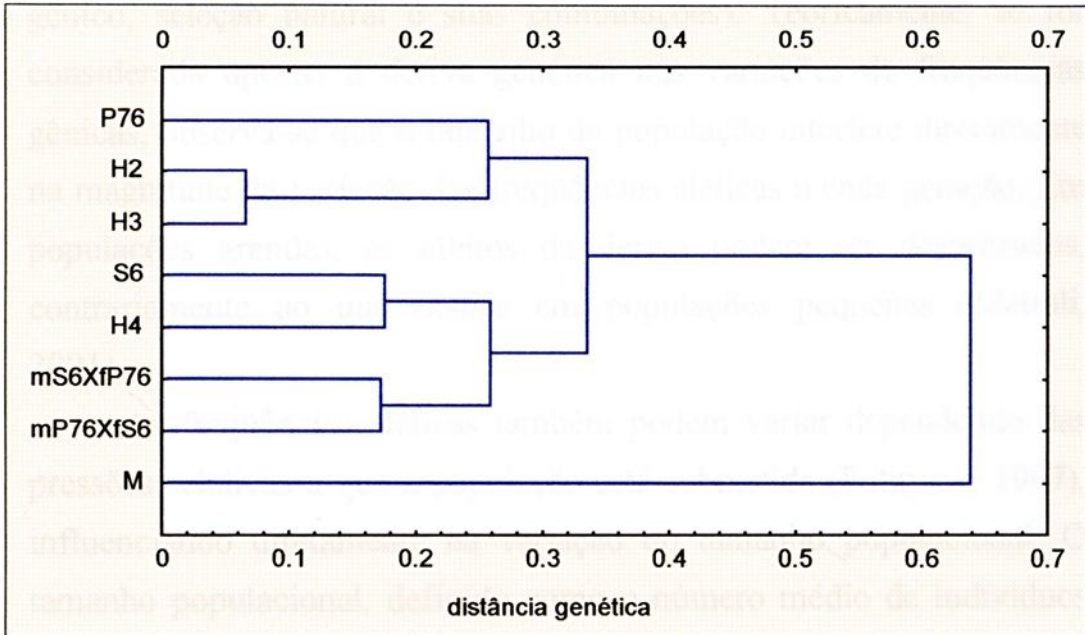


Figura 25. Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método UPGMA obtido com os *primers* 3, 6, 7, 8, 9, 10 e 15 entre indivíduos das linhagens parentais de *Drosophila* (P₇₆ e S₆), F₁ dos cruzamentos nas duas direções (mS₆xfP₇₆ e mP₇₆xfS₆), das populações H₂, H₃ e H₄ e *Megaselia scalaris* (M).

V. DISCUSSÃO

Ao estudar-se a variação genética em populações, deve-se considerar, além da deriva genética, as outras forças que possam estar envolvidas nas alterações das frequências alélicas (mutação, fluxo gênico, seleção natural e suas combinações). Teoricamente, se for considerada apenas a deriva genética nas variações de frequências gênicas, observa-se que o tamanho da população interfere diretamente na magnitude da variação das frequências alélicas a cada geração. Em populações grandes, os efeitos da deriva podem ser desprezados, contrariamente ao que ocorre em populações pequenas (Matioli, 2001).

As frequências alélicas também podem variar dependendo das pressões seletivas a que a população está submetida (Futuyma, 1997), influenciando diretamente na variação do tamanho populacional. O tamanho populacional, definido como o número médio de indivíduos adultos da população em uma determinada unidade de tempo, resulta da interação de vários parâmetros, como sucesso de cruzamento, produtividade, viabilidade, mortalidade e longevidade. Estes parâmetros são fortemente influenciados pelas interações genéticas e ambientais a que as populações estão submetidas. Dentre os fatores ambientais destacam-se a quantidade de alimento disponível, espaço vital, temperatura e umidade relativa.

O efeito da seleção natural sobre populações pode ser medido através da quantificação do estado-de-ser-adaptado destas populações. O estado-de-ser-adaptado é a capacidade dos portadores de um genótipo ou conjunto de genótipos de sobreviver e se reproduzir em um determinado ambiente (Dobzhansky, 1968). O uso do número de moscas e da biomassa (peso úmido das moscas) foi proposto por



Carson (1957, 1961) para medir o estado-de-ser-adaptado de populações experimentais de *Drosophila*. O tamanho populacional e a produtividade da população foram utilizados para estimar o estado-de-ser-adaptado de diferentes espécies de *Drosophila* (Carson, 1961; Ayala, 1970; Tadei, 1975; Tadei & Mourão, 1981; Mueller, 1987; Branco Jr., 1994; por exemplo) e de outros insetos, tais como o Diptera, Phoridae, *Megaselia scalaris* (Vetorazzi, 1993; Manzato & Tadei, 1995; Manzato, 1999; entre outros).

O processo de especiação se inicia pelo estabelecimento de mecanismos de isolamento reprodutivo que impedem a ruptura ou contaminação do sistema genético da população, já coadaptado ao ambiente. Este processo pode levar a um aumento da taxa intrínseca de crescimento populacional através da frequência aumentada de indivíduos mais aptos a elevar o estado-de-ser-adaptado da população, pela produção de maior descendência em menor tempo, e pelo aumento da longevidade dos indivíduos.

A quebra das barreiras de isolamento reprodutivo entre espécies pode ocorrer através de hibridação. Os termos "híbridos" e "hibridação" tem sido utilizados para designar, respectivamente, cruzamentos e produtos de cruzamentos, entre espécies, raças ou mesmo indivíduos de mesma população que diferem por um ou mais marcadores (Mayr, 1963, por exemplo). O efeito da hibridação é produzir novas variantes, algumas das quais podem apresentar condições de explorar novas oportunidades evolutivas, podendo produzir novas espécies. Especiação por hibridação pode originar uma nova espécie combinando o genoma de duas espécies parentais (Bullini, 1994; Barraclough & Nee, 2001).

Com o intuito de verificar o grau de divergência genética, ao longo de quase 30 anos das populações H₂, H₃ e H₄, fundadas com



híbridos F_1 descendentes do cruzamento entre fêmeas de *Drosophila prosaltans* e machos de *D. saltans*, este trabalho foi desenvolvido comparando-as através de análise populacional e molecular.

Tadei (1974, 1977) e Tadei & Bicudo (1981) realizaram estudos citogenéticos e populacionais nestas três populações, que fazem parte do grupo iniciado com híbridos F_1 descendentes do cruzamento macho *D. saltans* e fêmea *D. prosaltans*, juntamente com outras fundadas apenas com *D. prosaltans* (populações P), apenas com *D. saltans* (populações S) e com moscas destas duas espécies (populações PS). O autor constatou que as populações H_2 e H_3 se tornaram cromossomicamente híbridas e divergiram das populações H_1 e H_4 , do mesmo grupo. Estas duas últimas, eliminaram completamente os cromossomos originários de *D. prosaltans*, reconstituindo a constituição cromossômica de *D. saltans*, como ocorreu com as populações PS.

Até a época da análise realizada pelo autor acima citado, as populações H_2 e H_3 mantiveram o cromossomo X das duas espécies, o cromossomo II de *D. prosaltans*, recombinantes portadores do braço IIL de *D. saltans* e IIR de *D. prosaltans*, o cromossomo III de *D. prosaltans* e recombinantes portadores de um ou mais segmentos de cada espécie. Ambas eliminaram completamente o braço IIR de *D. saltans* e as secções 79 à primeira faixa da secção 85 do cromossomo III da mesma espécie. Tadei (1977) concluiu que essas duas populações, portadoras da maior variabilidade genética em relação aos arranjos cromossômicos, apresentaram o melhor estado-de-ser-adaptado.

Neste trabalho os dados referentes à análise populacional foram comparados com os resultados de Tadei (1977), considerando-se o primeiro período de recenseamento com 50 censos semanais.



Naquele período, para tamanho populacional as médias relativas ao número total de moscas e biomassa total foram, respectivamente, de 307 ± 10 e 317 ± 9 para H_2 , 283 ± 11 e 291 ± 10 para H_3 e, 252 ± 9 e 231 ± 8 para H_4 . Para jovens o número total de moscas produzidas e biomassa total foram, respectivamente, de 256 ± 11 e 193 ± 8 para H_2 , 262 ± 13 e 195 ± 9 para H_3 e, 217 ± 10 e 156 ± 7 para H_4 .

Na comparação entre os dois períodos, observa-se para o tamanho populacional, que H_2 e H_4 apresentaram aumento no número de moscas e biomassa total, enquanto que H_3 não apresentou alteração no número de moscas e mostrou redução na biomassa total. Apesar de se assemelharem cromossomicamente, H_2 e H_3 mostram, assim, diferenças nas duas análises realizadas.

Quanto à produtividade, observa-se diminuição para número total de moscas e biomassa total nas três populações, sendo contudo esta redução mais acentuada na população H_4 .

Através dos dados referentes ao número de moscas (tabela I), as maiores variações ao longo de todo o tempo de manutenção ocorreram em H_4 onde houve aumento nos parâmetros relativos ao tamanho populacional e, inversamente, maior diminuição nos valores referentes à produtividade. Os resultados indicam que o tamanho populacional é mantido por maior longevidade das moscas (em média 19,9 dias – tabela VII) e menor taxa de natalidade. Das três populações, H_4 foi a que apresentou as maiores variações ao longo do tempo, variações estas que se refletiram em melhora de seu estado-de-ser-adaptado.

Quando se comparam as taxas de natalidade e de mortalidade em cada população (tabelas I e V), observa-se que estas não diferem. Contudo, as diferenças são significativas nas comparações entre as



três populações, apresentando H_4 a menor mortalidade, enquanto H_2 e H_3 não diferem entre si.

A natalidade e a mortalidade interferem diretamente no tamanho populacional, pois a longevidade das moscas em populações experimentais é afetada por fortes pressões seletivas devido à competição intraespecífica, tanto na fase larval como na fase adulta. A longevidade aqui tratada é a do adulto, ou seja, o tempo decorrido entre o ingresso do imago na parcela adulta e a morte da mosca na população. O modelo apresentado por Levene (apêndice in Dobzhansky & Pavlovsky, 1961) considera exatamente esta situação, tendo sido validado por Manzato (1999) com o estabelecimento experimental da estrutura etária de populações de *Megaselia scalaris*. Neste estudo constatou-se diferenças na longevidade média das moscas (tabela VII), sendo maior a longevidade em H_4 (19,9 dias) e menor na população H_3 (12,7 dias). As maiores diferenças, contudo, são observadas quando se consideram os extremos superiores da distribuição da longevidade, moscas de H_4 sobrevivem mais que o dobro do tempo das moscas de H_2 e H_3 .

Nesta análise, as populações H_2 e H_3 apresentaram o número médio de fêmeas superior ao número de machos, ocorrendo o inverso na população H_4 , onde o número médio de machos foi maior tanto nos adultos como nos jovens (tabela I). Nesta população, o aumento no número de machos adultos ocorre devido a um pequeno aumento consistente na natalidade e à uma longevidade ligeiramente maior dos machos. Isto não foi observado por Tadei (1977), podendo-se inferir que o atual aumento no estado-de-ser-adaptado desta população se deu mais acentuadamente nos machos. Esse fato parece corroborar a afirmação de Wu & Davis (1993), de que em espécies em estágio incipiente de especiação, o sexo heterogamético (machos), de acordo

com a regra de Haldane (1922), evolui em taxas mais rápidas que o sexo homogamético (fêmeas).

Tadei (1974) demonstrou que a população H₄, reconstituiu completamente a constituição cromossômica de *D. saltans*. Através da comparação dos dados referentes à produtividade da população H₄ (tabela I) verifica-se que esta assemelha-se à produtividade das populações S (grupo controle de *D. saltans* recenseadas da 35^a a 68^a semanas de manutenção), estudadas por Tadei (1977), que na média das quatro réplicas totalizou 154 moscas, sendo 72 machos e 81 fêmeas.

Com relação à biomassa (tabela I), para uma mesma biomassa total produzida, H₂ mantém uma biomassa média total na população adulta maior que H₃. A população H₄ reflete claramente maior aproveitamento dos recursos do meio devido ao maior aumento na biomassa; em outras palavras, H₄ apresenta o melhor estado-de-ser-adaptado, pois é a população mais eficiente em transformar os recursos energéticos disponíveis no meio em matéria viva de seu próprio tipo.

Considerando estas três populações, Tadei (1977) observou que H₂ e H₃, naquele período, apresentaram os maiores valores de biomassa individual para adultos ($1,043 \pm 0,010$ e $1,040 \pm 0,011$, respectivamente), enquanto que H₄ apresentou o menor, $0,920 \pm 0,011$. Na produtividade, as três populações não apresentaram grandes variações para biomassa individual, sendo esta de $0,761 \pm 0,008$, para H₂, $0,755 \pm 0,011$ para H₃ e, $0,720 \pm 0,006$ para H₄. Comparando-se os dois períodos de análise, verifica-se em H₂ e H₃ diminuição da biomassa individual em adultos e aumento nos jovens, enquanto que em H₄ observa-se aumento na biomassa individual de adultos e pequena diminuição na de jovens.



As análises de correlação mostram que estatisticamente não há diferença entre número de moscas e biomassa total, indicando que o tamanho populacional pode ser medido através destes dois parâmetros, para estas três populações (figura 7A e 7B), corroborando a proposição de Carson (1957, 1961) para a utilização do número de indivíduos e biomassa para a medida do estado-de-ser-adaptado de populações.

No presente estudo, confirmou-se as conclusões de Tadei (1974, 1977) e Tadei & Bicudo (1981), que houve divergência em dois grupos das populações H, de um lado H₂ e H₃ que continuaram híbridas durante o tempo em que foram estudadas, e de outro as populações H₁ e H₄ que reconstituíram a constituição cromossômica de *D. saltans*. Na análise atual, esta divisão também foi observada, principalmente através dos dados referentes à produtividade. As análises de Tukey (tabela IV) mostram que a população H₄ difere das outras duas em todos os parâmetros, enquanto que H₂ e H₃ só diferem para biomassa individual.

Atualmente, a população H₄ apresenta o melhor estado-de-ser-adaptado, pois seu tamanho populacional é mantido por longevidade ligeiramente maior que as taxas de natalidade e mortalidade, que são significativamente inferiores às das outras duas populações.

As técnicas mais recentes para determinar a quantidade de diferenciação genética que acompanha o processo de especiação desenvolveram-se também ao nível molecular, permitindo comparar material genético de diferentes populações. Além de estudos da dinâmica das populações H₂, H₃ e H₄ e de seu estado-de-ser-adaptado, estas populações foram analisadas também quanto a variabilidade genética e quantidade de polimorfismo à nível molecular.



As populações H₂, H₃ e H₄ foram comparadas conjuntamente com as espécies parentais (*D. prosaltans* e *D. saltans*), com híbridos F₁ nas duas direções de cruzamento entre estas espécies e com o forídeo *Megaselia scalaris* como grupo externo, utilizando-se a tecnologia de AFLP.

Apenas moscas machos foram analisadas, pois fêmeas fecundadas armazenam espermatozóides em suas spermatecas, evitando assim a contaminação do seu DNA genômico com o DNA de outros indivíduos.

Utilizando-se a técnica de AFLP foram avaliadas amostras compostas por número variável de indivíduos (*pool*) das espécies *D. prosaltans* e *D. saltans* que pudessem conter a maior parte da variabilidade genética de cada espécie. Constatou-se que o número variável de indivíduos que compõem o *pool*, fornece quantidade de DNA que parece não influenciar significativamente no padrão de amplificação, sendo a escolha dos *primers* papel mais importante para evidenciar esse tipo de variabilidade.

Nos *pools* formados por amostras de DNA de 10, 15 ou 20 indivíduos machos, em quatro das cinco combinações de *primers* testadas, foi observada constância no padrão de bandamento, sendo assim, foi escolhido o *pool* com 10 moscas para todas as análises.

Utilizando-se a tecnologia de AFLP foram feitas análises comparativas entre as oito classes de moscas e sete combinações de *primers*. A quantidade de polimorfismos detectados pela técnica variou conforme o *primer* utilizado. O número obtido de bandas variou de 84 (*primer* 7) a 30 (*primer* 15), sendo em média, 51 marcadores com os sete *primers* utilizados (tabela VIII).

Os diferentes níveis de polimorfismo evidenciado por cada uma das combinações de *primers* permitiu a determinação de relações filogenéticas.

As distâncias genéticas foram calculadas pelo método de porcentagem de desacordo (Puterka *et al.*, 1993). A análise de *clusters* foi feita pelo método não ponderado de agrupamento aos pares, utilizando médias aritméticas (UPGMA), agrupando indivíduos mais similares, até indivíduos ou grupos mais distantes.

Assim, diferentes dendogramas foram construídos de acordo com a distância genética e agrupamento de dados para cada padrão de bandas de cada combinação de *primer*. Os dendogramas gerados com os *primers* 3 e 7, respectivamente, com 49 e 84 bandas, produziram os mesmos agrupamentos, porém com distâncias diferentes.

Através dos marcadores produzidos por AFLP os dendogramas de seis dos sete *primers*, agruparam as populações H₂ e H₃ com a espécie parental *D. prosaltans*. Na análise cromossômica de Tadei (1974), nessas populações o cariótipo de *D. prosaltans* tinha sido reconstituído e em cariótipos ainda com componentes de *D. saltans* a tendência era para sua eliminação.

O autor acima citado, constatou que toda a constituição cromossômica de *D. saltans* foi reconstituída na população H₄ até aquela data. Na análise atual, utilizando AFLP, essa população foi agrupada diretamente a essa espécie em cinco das sete combinações de *primers* testadas e esteve mais próxima a espécie parental *D. saltans* do que a espécie parental *D. prosaltans*.

Estas duas observações feitas com os dados referentes à análise por AFLP, indicam que estas três populações mantêm as características de divergência detectadas por Tadei (1974), isto é, de um lado H₂ e H₃ apresentando ainda maior quantidade de



componentes genéticos de *D. prosaltans*, e de outro, H₄, que mantém grande parte da constituição genética de *D. saltans*.

Sobre esse aspecto, em relação à população H₄, a análise de fragmentos genômicos amplificados com o *primer* 6 detectou 2 bandas espécie-específicas de *D. prosaltans*, indicando possivelmente que esta população não eliminou completamente todas as seqüências de DNA de *D. prosaltans* do seu genoma, divergindo da análise de Tadei (1974)

Nos estudos cromossômicos realizados por Tadei (1974), foi constatado que nas populações H₂ e H₃ estavam presentes cariótipos com constituição híbrida e somente de uma das espécies parentais. Na análise molecular realizada neste trabalho, a presença de bandas espécie-específicas de *D. saltans* em H₂ e H₃, indica que estas populações continuam híbridas, pois mesmo apresentando a maior parte das bandas espécie-específicas de *D. prosaltans*, ainda conservam segmentos de *D. saltans*. A presente análise, realizada com *pools* de indivíduos, não permitiu a discriminação de genomas inteiramente de *D. prosaltans*, que possivelmente, ainda poderiam estar presentes nas populações.

Quanto às relações filogenéticas com todos os *primers* entre todas as oito classes de moscas estudadas, foi construído um único dendograma que apresentou os mesmos agrupamentos dos dendogramas produzidos com os *primers* 3 e 7, sendo: H₂ e H₃ agrupadas com *D. prosaltans* e H₄ com *D. saltans* como era esperado, os híbridos F₁ nas duas direções de cruzamentos foram agrupados próximos à H₄ e *D. saltans* e o grupo externo (*Megaselia scalaris*) mantendo-se distante de todos.



VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos possibilitaram as seguintes conclusões:

1. Na comparação entre os dois períodos de análise, o tamanho populacional e biomassa total de H₂ e H₄ aumentaram na análise atual, enquanto H₃ não apresentou alteração no número de moscas e mostrou redução na biomassa total.
2. Quanto à produtividade, observou-se na atual análise diminuição para o número total de moscas e biomassa total nas três populações, sendo esta redução mais acentuada na população H₄.
3. Quanto às taxas de natalidade e mortalidade, as populações não diferem intrapopulacionalmente, contudo, as diferenças são significativas nas comparações entre as três populações.
4. A maior longevidade das moscas adultas é observada em H₄, sendo esta população a que apresenta as menores taxas de natalidade e mortalidade.
5. Em relação à biomassa individual, houve diminuição entre os adultos e aumento nos jovens nas populações H₂ e H₃, enquanto que o inverso ocorreu na população H₄.
6. Das três populações, atualmente H₄ é a que apresenta o melhor estado-de-ser-adaptado, pois é a população mais eficiente em transformar os recursos energéticos do meio em matéria viva de seu próprio tipo.
7. Através da análise feita com as 7 combinações de *primers*, as populações H₂ e H₃ são muito próximas e mostraram mais semelhanças com *D. prosaltans*; H₄ assemelha-se à *D. saltans*, sendo os híbridos F₁ nas duas direções de cruzamentos próximos entre si e à H₄ e *D. saltans*.



8. A população H₄, mesmo sendo agrupada próxima a *D. saltans*, ainda conserva segmentos de DNA de *D. prosaltans*, como indicado pela presença de bandas espécie-específicas da última espécie.
9. As populações H₂ e H₃, apresentaram algumas bandas espécie-específicas de *D. saltans* mesmo compartilhando a maioria das bandas de *D. prosaltans*, indicando que estas duas populações ainda devem conservar cromossomos recombinantes das duas espécies.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRESTI, J.; SEKI, S.; CNAANI, A.; POOMPUANG, S.; HALLERMAN, E.M.; UMIEL, N.; HULATA, G.; GALL, G.A.E.; MAY, B. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. **Aquaculture**, v.185, p.43-56, 2000.

ANDERSON, E.; HUBRICHT, L. Hybridisation in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridisation. **Am. J. Bot.** v.25, p.396-402., 1938.

ARENS, P.; WESTEND, W.V.; BUGTER, R.; SMULDERS, M.J.; VOSMAN, B. Molecular genetic analysis of black poplar (*Populus nigra* L.) along Dutch rivers, **Molecular Ecology**, v.7, p.11-18, 1998.

AYALA, F.J. Population fitness of geographic strains of *Drosophila serrata* as measured by interspecific competition. **Evolution**, v.24, p.483-494, 1970.

BAGLEY, M.J.; ANDERSON, S.L.; MAY, B. Choice of methodology for assessing genetic impacts of environmental stressors: Polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints, **Ecotoxicology**, v.10, n.4, p.239-244, 2001.

BARRACLOUGH, T.G.; NEE, S. Phylogenetics and speciation, **Tree**, v.16, n.7, p.391-399, 2001.

BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. **Biotechnology**, v.8, p.930-932, 1990.

BICUDO, H.E.M.C. **Variabilidade cromossômica e isolamento reprodutivo em quatro espécies do subgrupo saltans (*Drosophila*)**. Tese (Doutorado em Ciências). São Paulo: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, 1967.

BICUDO, H.E.M.C. Reproductive isolation in the saltans group of *Drosophila*. I. The saltans subgroup. **Genetica**, v.44, p.313-329, 1973 a.

BICUDO, H.E.M.C. Chromosomal polymorphism in the saltans group of *Drosophila*. I. The saltans subgroup. **Genetica**, v.44, p.520-552, 1973 b.

BRANCO JR, E.V. Valor adaptativo: análise de seus componentes em linhagens de *Drosophila simulans* da Serra do Mar (PR), do Litoral (PR) e de Nova Itapirema (SP). Dissertação (Mestrado em Genética). Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1997.



BULLINI, L. Origin and evolution of animal hybrid species. **Tree**, v.9, n.11, p.422-426, 1994.

BUZZATI-TRAVERSO, A.A. Evolutionary changes in components of fitness and other polygenic traits in *Drosophila melanogaster* populations, **Heredity**, v.9, p.153-186, 1955.

CARRACEDO, M.C.; ASENJO, A.; CASARES, P. Inheritance mode of *Drosophila simulans* female mating propensity with *D. melanogaster* males. **The Journal of Heredity**, v.89, n.1, 1998.

CARSON, H.L. Production of biomass as a measure of fitness of experimental populations of *Drosophila*. **Genetics**, v.42, p.363-364, 1957.

CARSON, H.L. Heterosis and fitness in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, v.15, p.496-509, 1961.

CERVERA, M.T.M.; GUSMÃO, J.; STEENACKERS, M.; PELEMAN, J.; STORME, V.; VANDEN BROECK, A.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. **Theor. Appl. Genet.**, v.93, p.733-737, 1996.

DOBZHANSKY, Th. Studies on hybrid sterility. II. Localisation of sterility factors in *Drosophila pseudobscura* hybrids. **Genetics**, v.21, p.113-135, 1936.

DOBZHANSKY, Th. On some fundamentals concepts of Darwinian biology. **Evolutionay Biology**, v.2, p.1-34, 1968.

DOBZHANSKY, Th. **Genética do Processo Evolutivo**. São Paulo, Polígono, Edusp, 1973.

DOBZHANSKY, Th.; PAVLOVSKY, O. A further study of fitness of chromosomally polymorphic and monomorphic populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Heredity**, v.16, p.169-179, 1961.

DOWLING, T.E.; SECOR, C.L. The role of hybridisation and introgression in the diversification of animals. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v.28, p.593-619, 1997.

FUTCH, D.G. A study of speciation in South Pacific populations of *Drosophila ananassae*. **U.T.P.**, v.6615 p.79-120, 1966.

FUTUYMA, D.J. **Biologia do Processo Evolutivo**, Sociedade Brasileira de Genética, 1992.



GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.95, p.842-849, 1997.

GIBSON, W.C. Analysis of a genetic cross between *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *T. b. brucei*. **Parasitology**, v.99, p.391-402, 1989.

GIBSON, W.C.; WHITTINGTON, H. Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*: selection of hybrid trypanosomes by introduction of genes conferring drug resistance. **Parasitology**, v.60, p.19-26, 1993.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v.39, p.439- 446, 1974.

HAWTHORNE, D.J. AFLP-based genetic linkage map of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: sex chromosomes and a pyrethroid-resistance candidate gene. **Genetics**, v.158, n.2, p.695-700, 2001.

HERBERGS, J.; SIWEK, M.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; VAN DER POEL, J.J.; GROENEN, M.A.M. Multicolour fluorescent detection and mapping of AFLP markers in chicken (*Gallus domesticus*). **Animal Genetics**, v.30, p.274-285, 1999.

HEUN, M.; SCHÄFER-PREGL, R.; KLAWAN, D.; CASTAGNA, M.; ACCERBI, M.; BORGHI, B.; SALAMINI, F. Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fringerprinting. **Science**, v.278, p.1312-1314, 1997.

HIDE, G.; WELBUM, S.C.; TAIT, A.; MADEUDLIN, I. Epidemiological relationships of *Trypanosoma brucei* stocks from south east Uganda: evidence for different population structures in human infective and non-human infective isolates. **Parasitology**, v.109, p.95-111, 1994.

HILLIS, D.M.; MABLE, B.K.; MORITZ, C. Applications of molecular systematics: The state of the field and a look to the future. In: HILLIS, D.M., MORITZ, C. & MABLE, B.K., **Molecular systematics**. 2nd Ed. Sunderland, MT, USA, Sinauer Associates, Inc. p.515-543, 1996.

HIRAI, Y.; KIMURA, M.T. Incipient reproductive isolation between two morphs of *Drosophila elegans* (Diptera: Drosophilidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v.61, p.501-513, 1997.

HUTTER, P. *Genetics of Hybrid Inviability in Drosophila*. In: **Advances in Genetics**, v.36. Academic Press. . Editad by Hall, J.C.; Dunlap, J.C.; Friedmann, T. and Giannelli, F. New York, p.157-185, 1997



INNAN, H.; TERAUCHI, R.; GÜNTER, K.; YAJIMA, F. A method for estimating nucleotide diversity from AFLP data. **Genetics**, v.151, p.1157-1164, 1999.

JANSEN, R.C.; GEERLINGS, H.; JAN VAN OEVEREN, A.; VAN SCHAIK, R.C. A comment on codominant scoring of AFLP markers. **Genetics**, v.158, p.925-926, 2001.

JOHANNESSON, K. Parallel speciation: a key to sympatric divergence, **Tree**, v.16, n.7, p.148-153, 2001.

KNORR, C.; CHENG, H.H.; DODGSON, J.B. DNA cloning and sequence analysis of chicken AFLP. **Animal Genetics**, v. 32, n.3, p.156-159, 2001.

KUROKAWA, H. Sexual isolation among the three races, A, B, and C of *Drosophila auraria*. **Japan J. Genet.**, v.35, p.161-166, 1960.

KWIATOWSKI, J.; AYALA, F.J. Phylogeny of *Drosophila* and related genera: conflict between molecular and anatomical analyses. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.13, n.2, p.319-328, 1999.

LEVIN, D.A. The nature of plant species. **Science**, v.204, p.381-384, 1979.

MACHADO, L.P.B. Parâmetros reprodutivos e grau de sinápse nos cromossomos politênicos de *Drosophila* do cluster *buzzatii*. Dissertação (Mestrado em Genética). São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-UNESP, 1998.

MACKILL, D.J.; ZHANG, Z.; REDOÑA, E.D.; COLOWIT, P.M. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. **Genome**, v.39, p.969-977, 1996.

MADI-RAVAZZI, L.; BICUDO, H.E.M.C.; MANZATO, J.A. Reproductive compatibility and chromosome pairing in the *Drosophila buzzatii* complex. **Cytobios**, v.89, p.21-30, 1997.

MANZATO, J.A. **Estrutura etária de populações experimentais de *Megaselia scalaris* Loew (Diptera, Phoridae)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Genética). São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-UNESP, 1999.

MANZATO, J.A.; TADEI, W.J. Tamanho e produtividade de populações experimentais de *Megaselia scalaris*, submetidas à técnica de marcação de insetos. In: **22º Colóquio de Incentivo à Pesquisa**. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-UNESP, p.34, 1995.



MARIN, I.; RUIZ, A.; PLA, C.; FONTDEVILA, A. Reproductive relationships among species of the *Drosophila repleta* group from South America and the West Indies. **Evolution**, v.47, n.5, p.1616-1624, 1993.

MASIGA, D.K.; TAIT, A.; TURNER, C.M.R. Amplified restriction fragment length polymorphism in parasite genetics. **Parasitology Today**, v.16, n.8, p.350-353, 2000.

MATIOLI, R.M. **Biologia Molecular e Evolução**. Ed. Holos Ltda, 201 pp, 2001.

MAUGHAN, P.J.; SAGHAI-MAROOF, M.A.; BUSS, G.R.; HUESTIS, G.M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. **Theor. Appl. Genet.** v.93, p.392-401, 1996.

MAYR, E. Speciation phenomena in birds. **Amer. Natur.**, v.74, p.249-278, 1940.

MAYR, E. **Animal species and evolution**. Cambridge: Harvard University Press, 1963.

MAYR, E. **Populações, Espécies e Evolução**. São Paulo, Edusp, pp.485, 1970.

MIYASHITA, N.T.; KAWABE, A.; INNAN, H. DNA Variation in the wild plant *Arabidopsis thaliana* revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism analysis. **Genetics**, v.152, p.1723-1731, 1999.

MORAES, M.A.M. **Isolamento sexual entre populações da superespécie *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae)**. Tese (Mestrado em Genética). São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, USP, 1992.

MOURAD, A.M.; MALLAH, G.S. Chromosomal polymorphism in Egyptian populations of *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, v.14, p.166-170, 1960.

MOURÃO, C.A.; AYALA, F.J.; ANDERSON, W.W. Darwinian fitness and adaptedness in experimental populations of *Drosophila willistoni*. **Genetica**, v.43, p.552-574, 1972.

MUELLER, L.D. Evolution of accelerated senescence in laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, v.84, p.1974-1987, 1987.

MUELLER, U.G.; WOLFENBARGER, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**, v.14, p.389-394, 1999.



NEFF, N.A.; SMITH, G.R., Multivariate analysis of hybrid fishes **Syst. Zool.**, v.28, p.176-96, 1978.

NIJMAN, I.J.; BRADLEY, D.G.; HANOTTE, O.; OTSEN, M.; LENSTRA, J.A. Satellite DNA polymorphisms and AFLP correlate with *Bos indicus-taurus* hybridisation. **Animal Genetics**, v.30, p.265-273, 1999.

ORR, H.A. Does hybrid lethality depend on sex or genotype? **Genetics**, v.152, p.1767-1769, 1999.

ORR, H.A. The genetics of species differences. **Tree**, v.16, n.7, p.343-350, 2001.

OTSEN, M.; DEN BIEMAN, M.; KUIPER, M.T. Use of AFLP markers for gene mapping and QTL detection in the rat. **Genomics**, v.37, p.289-294, 1996.

ÓVILO, C.; CERVERA, M.T.; CASTELLANOS, C.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. Characterisation of Iberian pig genotypes using AFLP markers. **Animal Genetics**, v.31, p.117-122, 2000.

PARSONS, Y.M.; SHAW, H.L. Species boundaries and genetic diversity among Hawaiian crickets of the genus *Laupala* identified using amplified fragment length polymorphism. **Molecular Ecology**, V.10, n.7, p.1765-1772, 2001.

PATTERSON, J.T.; STONE, W.S. **Evolution in the genus *Drosophila***. New York: MacMillan Co., 1952.

PIEPHO, H.P.; KOCH, G. Codominant analysis of banding data from a dominant marker system by normal mixtures. **Genetics**, v.155, p.1459-1468, 2000.

PROVINE, W.B. Alfred Henry Sturtevant and crosses between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Genetics**, v.129, p.1-5, 1991.

PUTERKA, G.H.; BLACK, W.C.^{4th}; STEINER, W.M.; BURTON, R.L. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. **Heredity**, v.70, p.604-618, 1993.

RAVEL, S.; MONTENY, N.; OLMOS, D.V.; VERDUGO, J.E.; CUNY, G. A preliminary study of the population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico using microsatellite and AFLP markers. **Acta Tropica**, v.78, p.241-250, 2000.

REINEKE, A.; KARLOVSKY, P.; ZEBITZ, C.P.W. Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. **Insect Molecular Biology**, v.7, n. 1, p.95-99, 1998.

REINEKE, A.; KARLOVSKY, P. Simplified AFLP protocol: replacement of primer labelling by the incorporation of α -labelled nucleotides during PCR. **Biotechniques**, v.28, p.622-623, 2000.

RHYMER, J.M.; SIMBERLOFF, D., Extinction by hybridisation and introgression **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v.27, p.83-109, 1996.

ROSS, M.R., CAVENDER, T.M. Morphological analyses of four experimental intergeneric cryprinind hybrid crosses. **Copeia**, p.377-387, 1981.

ROUPPE VAN DER VOORT, J.N.A.M.; VAN ZANDVOORT, P.; VAN ECK, H.J.; FOLKERTSMA, R.T.; HUTTEN, R.C.; DRAAISTRA, J.; GOMMERS, F.J., JACOBSEN, E.; HELDER, J.; BAKKER, J. Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. **Mol. Gen. Genet.**, v.255, p.438-447, 1997.

SAUZO, A.; HALL, H.G. Modification of the AFLP protocol applied to honey bee. **Bio. Techniques**, v.26, p.704-709, 1999.

SAVELKOUL, P.H.M.; AARTS, H.J.; DE HAAS, J.; DIJKSHOOM, L.; DUIM, A.; OTSEN, M.; RODEMARKER, J.L.; SCHOULS, L.; LENSTRA, J.A. Amplified restriction fragment length polymorphism analysis: the state of an art. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.3089-3091, 1999.

SAWAMURA, K.; DAVIS, A.W.; WU, C.I. Genetic analysis of speciation by means of introgression into *Drosophila melanogaster*. **P.N.A.S.**, v.97, n.06, p.2652-2955, 2000.

SEMBLAT, J. P.; WAINBERG, E.; DALMASSO, A.; ABAD, P.; CASTAGNOME-SERENO, P. High-resolution DNA fingerprinting of partenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis, **Molecular Ecology**, v.7, p.119-125, 1998.

SCHMIDT, K.; JENSEN, K. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. **American Journal of Botany**, v.87, n.5, p.678-689, 2000.

SIBLEY, C.G. Hybridisation in the red-eyed towhees of Mexico. **Evolution**, v.8, p.252-290, 1954.

SINGH, B.H.; CHATTERJEE, S. Variations in mating propensity fertility in isofemale strains of *Drosophila ananassae*. **Genetica**, v.73, p.237-242, 1987.



SOUZA, G.R.L., **Variabilidade genética de marcadores AFLP em populações de carrapato (*Boophilus microplus*) induzida por carrapaticidas**. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica), Uberlândia: Instituto de Genética de Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2001.

STEBBINS, G.L. **Variation and evolution in plants**. New York, Columbia University Press, 1950.

SPERLICH, D. Hybrids between *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* in nature. **Dros. Inf. Serv.**, v.36, p.118, 1962.

STEBBINS, G.L. **Processos de Evolução Orgânica**. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 2^a, 1974

STEBBINS, G.L. The role of hybridisation in evolution. **Proc. Amer. Phil. Soc.**, v.103, p.231-251, 1959.

SU, X.; WELLEMS, T.E. Toward a high resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. **Genomics**, v.33, p.430-444, 1996.

TADEI, W.J. **Oscilações cíclicas em populações experimentais de *Drosophila*** Tese (Doutorado em Ciências/Genética). Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, USP, 1975.

TADEI, W.J., MOURÃO, C.A. Cyclic oscillations in populations size of *Drosophila sturtevantii*. **Rev. Brasil. Genet.** v.4, n.2, p.149-164, 1981.

TADEI, W.P. **Estudos citológicos em populações experimentais de *Drosophila prosaltans* e *Drosophila saltans***. Tese (Mestrado em Genética). São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, USP, 1974.

TADEI, W.P. **Estudo cromossômico, do isolamento reprodutivo e do estado-de-ser-adaptado de populações experimentais de *Drosophila prosaltans* e *Drosophila saltans***. Tese (Doutorado em Ciências/Genética). São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, USP, 1977.

TADEI, W.P.; MOURÃO, C.A. A technique to mark insects. **Ciê. Cult.**, v.28, p.550, 1976.

TADEI, W.P.; BICUDO, H.E.M.C. Experimental populations of *Drosophila prosaltans*, *D. saltans*, and their hybrids. I. Chromosomal Evolution. **Rev. Brasil. Genet.** v.IV, n.4, p.549-570, 1981.



TAN, Y.D.; WAN, C.; ZHU, Y.; LU, C.; XIANG, Z.; DENG, H.W. An Amplified Fragment Length Polymorphism Map of the Silkworm. **Genetics**, v.157, p.1277-1284, 2001.

THOMAS, C.M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; JONES, D.A.; NORCOTT, K.A.; CHADWICK, B.P.; JONES, J.D.G. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9I* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. **The Plant Journal**, v.8, n.5, p.785-794, 1995.

TOHME, J.; GONZALEZ, D.O.; BEEBE, S.; DUQUE, M.C. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop Sci.**, v.36, p.1375-1384, 1996.

TRACEY, M.L.; PAVLOVSKY, O.; GREEN, M.M. Hybridisation of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. A frequency estimate. **Dros. Inf. Serv.**, v.50, p77, 1973.

TRAVIS, S.; MASCHINSKI, J.; KEIM, P. An analysis genetic variation in *Asragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. **Mol. Ecol.**, v.5, p.735-745, 1996.

TURELLI, M.; BARTON, N.H.; COYNE, J.A. Theory and speciation, **Tree**, v.16, p.330-343, 2001.

VAN HEUSDEN, A.W.; BACHMANN, K. Genotype relationships in *Microseris-Elegans* (Asteraceae, Lectuceae) revealed by DNA amplification from arbitrary primers (RAPDs). **Plant. Sist. Evol.**, v.179, p.221-233, 1992.

VANDERMARK, G.J. Detection of polymorphism in fungi using the AFLP technique and agarose gels. **Focus**, v. 21, n.1, p.26, 1999.

VETORAZZI, E.A. **Valor adaptativo de *Megaselia scalaris* (Diptera, Phoridae) em populações de diferentes origens geográficas.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Genética). São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-UNESP, 1993.

VIA, K. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. **Tree**, v.16, n.7, p.381-390, 2001.

VOS, P.; HOGERS, R.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** v.23, p.4407-4414, 1995.



WAITUMBI, J.N.; MURPHY, N.B. Inter- and intra-species differentiation of trypanosomes by genomic fingerprinting with arbitrary primers. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 58, p.181-185, 1993.

WANG, R.; KAFATOS, F.C.; ZHENG, L. Microsatellite markers and genotyping procedures for *Anopheles gambiae*. **Parasitol. Today**, v.15, p.33-37, 1999.

WELSH, J.; McCLEALLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Ac. Res.**, v.18, p.871-877, 1992.

WHITE, M.J.D. **Modes of Speciation**. San Francisco: WH Freeman, 455 pp, 1978.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LITVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by primers are useful as genetic markers. **Nucl. Ac. Res.**, v.18, p. 6531-6535, 1990.

WILSON, P. On inferring hybridity from morphological intermediacy. **Taxon**, v.41, p.11-23, 1992.

WINGE, H. Interspecific hybridisation between the six cryptic species of *Drosophila willistoni* group. **Heredity**, v. 20, p. 9-19, 1965.

WRIGHT, S. 1932 – apud DOBZHANSKY, TH. - **Genética do Processo Evolutivo**. São Paulo, Polígono, Edusp, 1973, p.25.

WU, C.I.; DAVIS, A.W. Evolution of postmating reproductive isolation: the composite nature of Haldene's rule and its genetic bases. **The American Naturalist**, v.142, n.2, p.187-212, 1993.

YASUKOCHI, Y. A dense genetic map on the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. **Genetics**, v.150, p.1513-1525, 1998.



VIII. RESUMO

Neste trabalho três populações experimentais H₂, H₃ e H₄, fundadas por Tadei (1974, Tese de mestrado, USP, São Paulo, SP) com híbridos F₁ descendentes do cruzamento de fêmeas de *Drosophila prosaltans* com machos de *D. saltans*, foram analisadas novamente após um intervalo de 30 anos. Estas populações, mantidas pela técnica da transferência seriada, foram estudadas quanto ao seu estado-de-ser-adaptado, através de análise dos parâmetros tamanho populacional, produtividade, mortalidade e longevidade das moscas. Ao longo do tempo de manutenção estas populações divergiram em dois grupos, ficando de um lado H₄ e de outro, H₂ e H₃. A população H₄ é a que apresenta o melhor estado-de-ser-adaptado, sendo seu tamanho populacional mantido pela maior longevidade das moscas adultas e menores taxas de natalidade e mortalidade. Esta população é a que melhor consegue transformar os recursos energéticos do meio em matéria viva de seu próprio tipo. As três populações também foram comparadas quanto ao polimorfismo de fragmentos de DNA gerado pela técnica de AFLP, juntamente com mais cinco classes de moscas: as espécies parentais (*D. prosaltans* e *D. saltans*), os híbridos F₁ nas duas direções de cruzamento entre estas espécies e o forídeo *Megaselia scalaris*, utilizada como grupo externo. A técnica de AFLP mostrou-se eficiente para evidenciar variabilidade genética na comparação entre as classes de moscas estudadas. Da análise feita com 7 combinações de *primers*, verifica-se que as populações H₂ e H₃ são muito próximas e mostram mais semelhanças com *D. prosaltans*; H₄ assemelha-se à *D. saltans*, sendo os híbridos F₁ nas duas direções de cruzamentos próximos entre si e à H₄ e *D. saltans*. Apesar do cariótipo de *D. saltans* ter sido reconstituído na população H₄, como



mostrou a primeira análise citogenética realizada a cerca de 25 anos, esta população ainda apresenta segmentos de DNA de *D. prosaltans*. Nas populações H₂ e H₃, foi confirmada a presença de cariótipos com cromossomos recombinantes, pois bandas espécie-específicas de *D. saltans* compartilham a maioria das bandas de *D. prosaltans*, indicando que estas populações ainda conservam cromossomos recombinantes das duas espécies.

Palavras-chave: *Drosophila*; AFLP; populações; híbridos; DNA; marcadores moleculares.

IX. ABSTRACT

In this work three experimental populations H₂, H₃ and H₄, founded by Tadei (1974, Master thesis, USP, São Paulo, SP) with hybrid descending F₁ of the crossing of females of *Drosophila prosaltans* with males of *D. saltans*, were analysed again after a 30 years interval. These populations, maintained by the technique of the serial transfer, were studied with relationship to their adaptedness, through analysis of the parameters: population size, productivity, mortality and longevity of the flies. Along the time of maintenance these populations diverged in two groups, being on one side H₄ and on other side, H₂ and H₃. The H₄ population is the one that presents the best adaptedness, being its population size maintained by the largest longevity of the adult flies and smaller birth and mortality rates. This population present the best performance transforming the energy resources of the medium in live matter of your own type. The populations were also compared in relation to the polymorphism of DNA fragments of generated by the AFLP technique, together with five groups of flies: the species parents (*D. prosaltans* and *D. saltans*), the F₁ hybrid in the two crossing directions between these species and the forideo *Megaselia scalaris*, used as an external group. The technique of AFLP was shown efficient to evidence genetic variability in the comparison among the groups of these flies. Based on the analysis with 7 primer combinations, we verified that the H₂ and H₃ populations are very close to each others, and they show more similarity with *D. prosaltans*; H₄ is closer to *D. saltans*, being the F₁ hybrids, in the two direction of crossings, close to each other and to H₄ and *D. saltans*. In spite of the karyotype of *D. saltans* having being reconstituted in the H₄ population, as shown by the first citogenetic

analysis made about 25 years ago, this population still presents DNA segments of *D. prosaltans*. In the H₂ and H₃ populations, the karyotype presence was confirmed with recombinant chromosomes, because species-specific bands of *D. saltans* share most of the bands of *D. prosaltans*, indicating that these populations still maintain recombinant chromosomes of the two species.

Key words: *Drosophila*; AFLP; populations; hybrids; DNA; molecular markers.

Eu, Ana Paula Perez Frieschi, autorizo
a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, 01/04/2012



analysis made about 25 years ago, this population still presents DNA segments of *D. proszkyana*. In the H_2 and H_3 populations, the karyotype presence was confirmed with recombinant chromosomes, because species-specific bands of *D. salina* share most of the bands of *D. proszkyana*, indicating that these populations still maintain recombinant chromosomes of the two species.

Key words: *Drosophila*; AFLP; populations; hybrids; DNA; molecular markers.

Eu, Ana Paula Peres Freschi, autorizo a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, 01/04/02



