

Ana Silvia Lapenta

Padrões de Esterases na Superespécie *Drosophila*
Drosophila Serido e em *D. Buzzatii*



1910000608



ANA SILVIA LAPENTA

**PADRÕES DE ESTERASES NA SUPERESPÉCIE *Drosophila*
serido E EM *D. buzzatii*.**



608/93

Dissertação apresentada para a obtenção
do Grau de Mestre em Ciências Biológicas
no Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em
Genética, do Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho", UNESP.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

São José do Rio Preto
1992



Este trabalho foi realizado nos Departamentos de Biologia e de Química e Geociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, com auxílio-bolsa do CNPq.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo



Este trabalho foi realizado nos Departamentos de Biologia e de Química e Geociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, com auxílio-bolsa do CNPq.

DEDICO AOS MEUS PAIS:

José e Anadeya



"Aquele que tenta perscrutar com
espírito de humildade e perseverança
os segredos das coisas, ainda que
não o saiba, é por assim conduzido
pela mão de Deus, que sustenta todas
as coisas, fazendo que elas sejam o
que são".

DEDICO AOS MEUS PAIS:

José e Anadeya

Consilio Vaticano II

AGRADECIMENTO

Ao término deste trabalho, quero expressar minha gratidão às pessoas, que durante esse período estiveram presentes e que de forma direta ou indireta, contribuíram para sua realização.

Em especial à minha orientadora, Prof^a Dr^a Hermione Elly Mellara de Campos Bicudo, pela brilhante orientação, segurança transmitida em todos os momentos e principalmente pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Carlos R. Ceron por ter me acolhido em seu laboratório pela participação em cada etapa deste trabalho e também pela convivência amigável.

Ao Prof. Dr. José A. Cordeiro pela prontidão com que se dispôs a ajudar, orientando a análise estatística.

Aos Professores Doutores Wladimir J. Tadei e Carlos R. Vilela pelas valiosas sugestões.

"Aquele que tenta perscrutar com espírito de humildade e perseverança a forma desta dissertação, ainda que não o saiba, é por assim conduzido pela mão de Deus, que sustenta todas as coisas, fazendo que elas sejam o que são".

Ao Prof. Dr. James R. Coleman, pela gentileza em revisar o Summary.

Gaudium et Spes (36)

Ao pessoal do Departamento de Química e Geociências, em especial ao João e ao Jorge, pela ajuda no laboratório e a Cleide e a Rita, pelo auxílio no computador.

AGRADECIMENTO

Ao término deste trabalho, quero expressar minha gratidão às pessoas, que durante esse período estiveram presentes e que de forma direta ou indireta, contribuíram para sua realização.

Em especial à minha orientadora, Prof^a Dr^a Hermione Elly Mellara de Campos Bicudo, pela brilhante orientação, segurança transmitida em todos os momentos e principalmente pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Carlos R. Ceron por ter me acolhido em seu laboratório pela participação em cada etapa deste trabalho e também pela convivência amigável.

Ao Prof. Dr. José A. Cordeiro pela prontidão com que se dispôs a ajudar, orientando a análise estatística.

Aos Professores Doutores Wladimir J. Tadei e Carlos R. Vilela pelas valiosas sugestões durante a análise criteriosa da Pro forma desta dissertação. Aos professores do Departamento de Biologia, pelas experiências e conhecimentos transmitidos e também pelo acolhimento e simpatia. Em especial agradeço aos professores Sebastião R. Taboga e Maria Tercília V. A. Oliveira, pela amizade e apoio constante.

Ao Prof. Dr. James R. Coleman, pela gentileza em revisar o Summary.

Ao pessoal do Departamento de Química e Geociências, em especial ao João e ao Jorge, pela ajuda no laboratório e a Cleide e a Rita, pelo auxílio no computador.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial ao Sebastião, Paulo, Olga, Laura e Simone.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, Nanci, Onilda, Aguinaldo e Rosangela, pela eficiência e disposição.

Aos meus colegas de pós-graduação, com os quais convivi durante este período e tornaram-se meus grandes amigos. Em especial a Mônica e ao Marcelo e as minhas companheiras de laboratório Mary, Alba, Lilian, Satiko e Fádua.

Às minhas amigas e companheiras de república Rita, Rose, Luciana, Mônica, Raquel, Cristiane, Rosana e Silvy.

Aos meus pais José e Anadeya, pelo amor, carinho e apoio constante.

Aos meus irmãos Ana Elisa, Ana Rita, Ana Maria e Angelo Vitor, aos meus cunhados Oswaldo e Laerte e de maneira muito especial aos meus sobrinhos Henrique, Ana Heloisa, Ana Beatriz, Carolina e Matheus, motivos de muita alegria.

Ao Alex pela ajuda com o gráfico e pela amizade.

À Soraia pelos desenhos, feitos sempre com muito capricho.

Às funcionárias da Biblioteca, pela prontidão e simpatia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa.

E por fim agradeço a Deus, a quem entrego todos os momentos difíceis e também os momentos felizes vividos durante este período e peço por todos aqueles que me ajudaram.

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
1. As Linhagens.....	20
2. Manutenção em Laboratório.....	20
3. Obtenção de Moscas para Análise Intralinhagem.....	22
4. Obtenção dos Híbridos.....	23
5. Preparo dos Géis.....	23
6. Preparo das Amostras e Condições de Eletroforese.....	25
7. Tratamento dos Géis para Identificação das Esterases.....	25
8. Análise da Especificidade ao Substrato.....	26
8.1. Preparo das amostras e aplicação no gel.....	26
8.2. Teste de Coloração.....	27
9. Secagem dos Géis.....	27
10. Análises Estatísticas.....	28
10.1. Teste t e Qui-Quadrado.....	28
10.2. Índice de Similaridade.....	28
10.3. Análise de Dependência.....	29
III. RESULTADOS.....	31
1. Posição das Bandas.....	31
2. Variação das Bandas quanto à Coloração e Espessura... ..	31
3. Variabilidade Intralinhagem dos Padrões de Esterases.....	36
4. Variabilidade Interlinhagem dos Padrões de Esterases.....	54
5. Padrões Esterásicos dos Híbridos.....	65
IV. DISCUSSÃO.....	79
V. RESUMO E CONCLUSÕES.....	104
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	107
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
VIII. APÊNDICE.....	123

I. INTRODUÇÃO

O termo esterase engloba um grupo de enzimas que participam da hidrólise dos ésteres. Além dos ésteres, as esterases apresentam a capacidade de atuar sobre outros substratos, hidrolisando peptídeos, amidas e halidas.

Uma tentativa de classificação das esterases foi realizada com base na sua afinidade pelos substratos, mas esta não foi satisfatória por não permitir uma distinção clara entre elas (AUGUSTINSSON, 1957, 1961 em WALKER e MACKNESS, 1963). Classificações mais precisas foram obtidas com base no comportamento das enzimas frente a inibidores.

ALDRIGE (1953) classificou as esterases, baseado na interação das atividades destas com organofosforados, em esterases-A (aromáticas ou arilesterases, E.C. 3.1.1.2) que participam da hidrólise de organofosforados e apresentam uma hidrólise preferencial dos ésteres aromáticos; e esterases-B (alifáticas ou aliesterases) que são inibidas pelos organofosforados por apresentarem um resíduo de serina em seu centro ativo. Estão incluídas, entre as esterase-B as carboxilesterases (E.C. 3.1.1.1) e as colinesterases (E.C. 3.1.1.2).

Arilesterases, também designadas por esterases-A ou esterases aromáticas, estão presentes principalmente no plasma de mamíferos. Essas enzimas são caracterizadas por sua resistência a organofosforados e a serina e sua sensibilidade a reagentes do grupo sulfidrílica como o PCMB (p-cloromercuribenzoato) e PHMB (p-hidroximercuribenzoato), e metais pesados como Hg^{++} , Cu^{++} e La^{+++} .

(JUNGE e KLEES, 1984). Nos mamíferos, estão associadas a partículas de lipoproteínas de alta densidade (VHLP) do plasma.

As carboxilesterases (esterases-B ou aliesterases), como o próprio nome diz, participam da hidrólise de ésteres carboxílicos, entre os quais incluem-se, ésteres alifáticos, ésteres aromáticos, amidas aromáticas e tioésteres, com preferência pelos ésteres formados por radicais acila de cadeia curta (JUNGE, 1984).

As colinesterases representam uma das famílias mais polimórficas de enzimas e estão presentes em todos os organismos. Elas hidrolisam ésteres de colina e são compostas pelas acetilcolinesterases (E.C. 3.1.1.7) e pseudocolinesterases (E.C. 3.1.1.8). Evidências genéticas mostram relacionamento entre as

A acetilcolinesterase está geralmente localizada na membrana celular de vertebrados e invertebrados. Essa enzima controla a corrente iônica e desempenha um papel essencial no processo de condução nervosa e função neuromuscular (WHITTAKER, 1984).

Estudos em insetos, como lepidópteros (ARPAGAU, e TOUTANT, 1985 em ARPAGAU et al., 1988) e coleópteros (LENOIR-ROUSSEAU et al, 1988 em ARPAGAU et al., 1988), demonstraram que a acetilcolinesterase é uma enzima chave no sistema nervoso central e no animal adulto possui um polimorfismo molecular com respeito à existência de dímeros anfifílicos e hidrofílicos de subunidades catalíticas. Em dípteros adultos, ocorrem também monômeros hidrofílicos de acetilcolinesterase em adição aos dois tipos de dímeros (em *Drosophila melanogaster*, FOURNIER et al, 1988 em ARPAGAU et al., 1988).



dipteros. Quanto às pseudocolinesterases (colinesterases não específicas), ocorrem em plantas, microrganismos e animais estando presentes em muito tecidos de vertebrados, entre os quais incluem-se o fígado e a massa cinzenta do cérebro. Seu papel fisiológico é pouco conhecido (WHITTAKER, 1984).

As esterases têm sido caracterizadas e purificadas em uma variedade de organismos incluindo leveduras (LEE et al., 1987), peixes (LEIBEL, 1988), insetos (VENKATESH et al., 1988; WILLADSEN et al., 1987), mamíferos, como rato (HIGA et al., 1989; TSUITA et al., 1988), camundongo (DEIMILING e TAYLOR, 1987; DEIMILING e WASSMER, 1991), coelho (LITH et al., 1989) e touro (ARAV e RIMON, 1987).

Evidências genéticas mostram relacionamento entre as carboxilesterases em mamíferos. Os dados genéticos revelam que os genes que codificam esterases muitas vezes estão organizados em "clusters", havendo vários destes localizados no mesmo cromossomo. Como exemplo, os genes da esterase em ratos (HEDRICH e DEIMILING, 1977 em HEALY et al., 1991), os quais, estão arranjados em dois "cluster" ligados. Dentro de cada "cluster", é provável que existam múltiplos genes originados por duplicação, sugerindo que os genes esterásicos dentro de cada "cluster" são membros relacionados de uma família gênica. Estudos moleculares de vários genes para carboxilesterase e colinesterase têm confirmado que muitos são evolutivamente relacionados (MEYERS et al., 1988 e HANSLIK et al., 1988 em HEALY et al., 1991).

Esterases de insetos, comparadas com as de mamíferos, não estão bem caracterizadas em termos genéticos e bioquímicos, sendo que entre as melhores estudadas estão as esterases de



dípteros, incluindo *Drosophila*. Neste gênero, várias esterases foram caracterizadas, principalmente quanto à sua atividade catalítica, referente a diferentes substratos sintéticos, e seu comportamento frente a inibidores. Algumas esterases foram purificadas e tiveram suas propriedades bioquímicas estabelecidas.

A esterase 6 de *D. melanogaster* tem sido intensivamente estudada. Esta enzima é uma carboxilesterase que apresenta especificidade para o beta-naftil acetato (WRIGHT, 1963). Duas alozimas principais est-6^F e est-6^S são encontradas. Elas possuem atividade catalítica e propriedades moleculares similares, sendo que a composição de aminoácidos é bastante semelhante e ambas possuem um único sítio catalítico (MANE et al., 1983b). O peso molecular da est-6 em *D. melanogaster* é de 60 kd. Essa esterase apresenta uma estrutura monomérica e foi detectada também nas espécies crípticas *D. simulans* e *D. mauritiana* nas quais mostrou as mesmas características. Já em outras espécies do mesmo subgrupo, como *D. erecta*, *D. yakuba* e *D. teissieri*, sua estrutura quaternária é dimérica e seu peso molecular de aproximadamente 120 kd (MORTON e SINGH, 1985).

Em *D. pseudoobscura*, a esterase 5 é uma das enzimas mais estudadas, sendo controlada por um loco extremamente polimórfico situado no cromossomo X (ABRAHAM e LUCCHESI, 1974 em FARMER e CARTER, 1989). A est-5 é uma carboxilesterase, sendo ligeiramente inibida (10,8%) pela eserina (10^{-4} M) e grandemente inibida (72,8%) por diisopropilfluorfosfato (10^{-4} M). Seu peso molecular foi calculado ao redor de 100.000 d (NARISE e HUBBY, 1966). Esta enzima é encontrada na hemolinfa de larvas e

hemolinfa e olhos de adultos (LUNDAY e FARMER, 1983; ARNASON e CHAMBER 1984). A esterase 5 apresenta especificidade para o beta-naftil acetato. Nenhuma diferença foi detectada nessa especificidade entre dois alelos diferentes (NARISE e HUBBY, 1966). Entretanto, foram encontradas diferenças na resposta ao calor e em parâmetros da cinética enzimática, tais como K_m (Constante de Michaelis-Menten) e V_{max} (velocidade máxima da reação) (FARMER e CARTER, 1989). Fêmeas heterozigotas apresentam frequentemente três bandas em eletroforese, evidenciando tratar-se de uma enzima dimérica (HUBBY e LEWONTIN, 1966). Entretanto, COBBS (1976) verificou que alguns alelos mostraram diferenças na capacidade de dimerizar. Um desses alelos não forma heterodímero e nem homodímero, existindo somente na forma monomérica, um segundo alelo forma hetero mas não homodímero e um terceiro tem a capacidade de formar ambos, hetero e homodímero.

reprodução (por exemplo, A esterase 4 de *D. mojavensis* foi purificada por PEN et al., (1984). Seu peso molecular foi calculado entre 62.000 e 64.000 d. A enzima purificada mostrou um máximo de atividade para ésteres de naftil de cadeia curta, com preferência para o alfa-naftil acetato e foi classificada como uma acetilesterase. Esta enzima, em eletroforese, mostrou um padrão de três bandas, correspondendo a um dímero (ZOUROS et al., 1982), sendo presente somente em larvas de terceiro estágio. Alelos com diferenças na especificidade ao substrato foram encontrados por ZOUROS e van DELDEN (1982) os quais detectaram alelos com preferência para o 1-naftil acetato e alelos com preferência para o 2-naftil acetato, sendo que as enzimas codificadas por estes alelos apresentavam pouca diferença na composição de aminoácidos (PEN et

al., 1986). Uma esterase também denominada F com as mesmas características. Alfa e beta-esterases de *D. virilis* foram analisadas e correspondem aos locos estruturais Est-alfa e Est-beta, respectivamente. Uma caracterização bioquímica mostrou que estas esterases apresentam um comportamento diferente quando PCMB é utilizado, sendo que somente a alfa-esterase exibe atividade. A alfa-esterase apresentou um pH ótimo mais baixo que a beta e mostrou-se mais instável ao calor. O I'M da alfa foi calculado ao redor de 75.000 e da beta ao redor de 140.000 d. As variantes alélicas mostraram algumas diferenças quanto a inibidores, a termoestabilidade e ao pH ótimo (NARISE, 1973).

O papel fisiológico das esterases, nos insetos, permanece em grande parte ainda desconhecido. Contudo, existem evidências de que estas participam da regulação dos níveis de hormônio juvenil (KORT e GRANGER, 1981), da reprodução (por exemplo, JOHNSON et al., 1968), de processos digestivos (KAPIN e AHMAD, 1980) e da degradação de inseticidas (MOTOYAMA e DAUTERMAN, 1974).

A esterase-F de *D. virilis* mostrou ser a enzima responsável pela inativação do hormônio juvenil, sendo essa inativação necessária para que a metamorfose seja completada (KAUSCHENBACH et al., 1987).

Algumas esterases estão relacionadas com o comportamento reprodutivo, em algumas espécies de insetos. Em *Drosophila*, várias espécies apresentam esterases que ocorrem com exclusividade em um dos sexos. *D. aldrichi* apresenta a esterase-F, uma beta-esterase presente no sistema reprodutor masculino (JOHNSON et al., 1968; KAMBYSELLIS et al., 1968). Em *D. dunni* foi



detectada uma esterase também denominada F com as mesmas características acima (CARRASCO et al., 1984). *D. mulleri* e *D. arizonensis* (atualmente *D. arizonae*, detalhes em RUIZ et al., 1990) apresentaram duas alfa-esterases específicas dos machos, est-10 e est-12, sendo que *D. arizonensis* possuía uma beta-esterase, denominada est-9 presente só nos machos e uma alfa-esterase que ocorre só nas fêmeas, a est-7 (CERON, 1988).

Em *D. melanogaster* a esterase 6 é encontrada predominantemente no bulbo ejaculatório dos machos (SHEEHAN et al., 1979). Esta esterase, porém, não é exclusiva desse tecido e nem exclusiva dos machos, mas sua função na reprodução está bem estabelecida. RICHMOND et al. (1980) mostraram a presença da est-6 no fluido seminal dos machos e verificaram que durante a cópula esta enzima é transferida dos machos para as fêmeas. Essa transferência se dá durante os três primeiros minutos de cópula e o macho requer 24-48 horas para recuperar o nível de est-6 (RICHMOND e SENIOR, 1981). Após alguns minutos de cópula, a est-6 é transferida para a hemolinfa onde permanece até quatro dias após a cópula (MEIKLE et al., 1990). A esterase 6 tem sido relacionada a várias etapas da reprodução. Foi verificado que fêmeas que receberam a est-6 apresentam uma diminuição no tempo para um novo acasalamento (RICHMOND et al., 1980) e apresentam um aumento na produtividade a 18°C (GILBERT et al., 1981 em MANE et al., 1983b). Entre seus alélos, WRIGHT estudou a esterase 6.

BECKMAN MANE et al. (1983a) mostraram que fêmeas após o acasalamento com machos que continham a est-6 ativa, eram menos receptivas na corte que fêmeas inseminadas com machos com esterase 6 inativa. A reação catalisada pela est-6 é a hidrólise



do cis-vaccenil acetato produzindo álcool cis-vaccenil. Ambos, éster ou seu produto derivado parecem atuar como antiafrodisiacos.

As esterases 9 e 10 de *D. melanogaster*, classificadas como colinesterases não específicas (pseudocolinesterases), possuem grande similaridade com as pseudocolinesterases de vertebrados, com todas as características estruturais sendo conservadas. Devido a essa similaridade foi sugerido que a est-9 e a est-10 exercem sua função de pseudocolinesterase nos tecidos digestivos (HEALY et al, 1991).

O papel das esterases restantes ainda é especulativo. É provável que algumas das esterases de *D. melanogaster* tenham funções similares à de vertebrados, tanto quanto de outros insetos, na função de desintoxicação e digestiva, como a est-4, est-6, est-7 e est-17, algumas destas com função dupla. Assim, algumas isoenzimas encontradas associadas ao ovário e outros tecidos reprodutivos podem "sequestrar" componentes tóxicos e impedir sua entrada no ovo (HEALY et al., 1991).

Muitas pesquisas em esterases de *Drosophila* estão centradas, primariamente, na herança de variantes de mobilidades eletroforéticas. Os estudos pioneiros foram realizados em *Drosophila melanogaster* por WRIGHT (1963) e BECKMAN e JOHNSON (1964) que descreveram dois locos que apresentaram relação de codominância entre seus alelos. WRIGHT estudou a esterase B e BECKMAN e JOHNSON a esterase-C. Em *Drosophila melanogaster* há três enzimas adicionais que mostram considerável atividade enzimática, denominadas esterase A, esterase E e esterase F e que estão provavelmente sob controles diferentes.

Para *est-6*, duas variantes eletroforéticas principais foram encontradas e atribuídas à presença de dois alelos codominantes. Ambos são frequentemente encontrados em populações naturais, mostrando a ocorrência de um polimorfismo natural. A localização deste loco foi estabelecida a 36,8 unidades de recombinação no cromossomo 3 e mais precisamente, pela técnica de hibridação *in situ* na seção 69 A1-A3 (PROCUNIER et al., 1991).

Observou-se que a esterase C é controlada por um loco com dois alelos codominantes no cromossomo 3. Posteriormente, JOHNSON (1964) encontrou um alelo nulo recessivo para esse loco.

Um terceiro loco estudado em *D. melanogaster* é o referente à esterase-A. As variações eletroforéticas deste loco foram inicialmente atribuídas a fatores não genéticos (DECKMAN e JOHNSON, 1964). Posteriormente foi demonstrada a presença de um alelo nulo com herança recessiva (MIZIANTY e CASE, 1971; OLIVEIRA e CORDEIRO, 1982).

Em *D. virilis* foi demonstrada a existência de dois locos estruturais *Est-alfa* e *Est-beta*, correspondendo respectivamente, às alfa e beta-esterases (NARISE, 1973). Estes locos são extremamente polimórficos. TSUNO et al. (1983) detectaram a presença de 16 variantes para o loco *Est-alfa* e 11 para o loco *Est-beta*. Em estudos posteriores, outras variantes para o loco *est-alfa* foram encontradas, cujo aparecimento foi atribuído à recombinação intragênica em fêmeas heterozigotas (TSUNO, 1983).

Em *D. buzzatii* foram estudadas as esterases 1 e 2, respectivamente, beta e alfa-esterases (EAST, 1982). A esterase 1 predomina na hemolinfa e a esterase 2 no aparelho digestivo e



corpo gorduroso. O perfil ontogenético dessas enzimas foi examinado e verificou-se que ambas surgem na época da eclosão do ovo e permanecem até que o desenvolvimento do adulto se complete. Tanto est-1 quanto est-2 apresentam uma ampla especificidade ao substrato, sendo que a est-1 hidrolisa o 2-naftil acetato em maior taxa e a est-2, o 1-naftil acetato. Os locos Est-1 e Est-2 estão ligados a inversões que ocorrem no cromossomo 2, em populações australianas, estando dentro ou adjacentes a estas, e apresentam um forte desequilíbrio de ligação (KNIBB et al., 1987), sendo devido à regulação e modulação da atividade do gene.

Duplicações em locos esterásicos foram observadas em *Drosophila*. Esterase-4 e 5 em *D. mojavensis* e *D. arizonensis*, são supostamente produtos de uma duplicação gênica. Esses genes distam um do outro 0,16 unidades de recombinação e divergiram consideravelmente após a duplicação. O loco para esterase 5 é ativo durante todo o ciclo de vida e aparece em alta concentração na hemolinfa e corpo gorduroso. O loco para esterase 4 é ativo somente no estágio larval e é concentrado principalmente no exoesqueleto (ZOUROS et al., 1982). Um estudo utilizando anticorpos contra est-4 e est-5, mostrou alguma reação imunológica cruzada, mas existe pouca diferença na composição de aminoácidos entre essas enzimas, e suas sequências N-terminais são idênticas, mostrando claramente sua origem comum (PEN et al., 1986).
 est-P de *D. virilis* (KOROCHKIN et al., 1974). Exemplos de esterases
 A análise molecular do DNA genômico que é adjacente ao gene que codifica a esterase 6 de *D. melanogaster*, mostrou um segundo gene, est-P, identificado como uma duplicação em tandem de est-6, que é transcrito somente no final do estágio larval.

Esses genes mostram 60% de similaridade na sequência de DNA (COLLET et al., 1990 em HEALY et al. 1991). Assim, foi sugerido por HEALY et al. (1991) que a organização genômica dos genes esterásicos em *Drosophila* pode ser similar ao padrão de "clusterização" encontrado nos mamíferos.

O desenvolvimento de um organismo é caracterizado por mudanças em seu metabolismo, reflexo de alterações na expressão gênica. Desta forma, a análise de diferentes sistemas gen-enzima, durante a ontogenia, revela mudanças metabólicas ocorrendo devido à regulação e modulação da atividade do gene.

Uma vez que as esterases de um determinado organismo compreendem um conjunto de enzimas sob controles genéticos diferentes, essas esterases podem ser expressas diferentemente durante o desenvolvimento desse organismo. Em *Drosophila*, algumas esterases se mantêm durante todo o desenvolvimento, como por exemplo, a est-5 de *D. mojavensis* (ZOUROS et al., 1982), as esterases-1 e 2 de *D. buzzatii* (EAST, 1982), enquanto algumas esterases aparecem em determinados estádios de desenvolvimento, aumentando ou diminuindo seu nível de atividade nas fases seguintes. Algumas esterases apresentam seu máximo de atividade nos estádios larvais, como a est-4 de *D. mojavensis* (ZOUROS et al., 1982), a est-L de *D. mulleri* e *D. arizonensis* (CERON, 1988) e outras apresentam seu máximo de atividade na fase pupal, como a esterase-P de *D. virilis* (KOROCHKIN et al., 1974). Exemplos de esterases exclusivas de adultos são as est-1, est-3, est-4 e est-i0 de *D. mulleri* e *D. arizonensis* (CERON, 1988).

Uma análise comparativa dos padrões de esterase, durante o desenvolvimento, entre *D. mulleri* e *D. arizonensis*



constatou diferenças no tempo de expressão de locos considerados homólogos. Como exemplo, citamos a est-3 encontrada em larvas de primeiro estágio em *D. arizonensis*, e detectada somente em larvas de segundo estágio de *D. mulleri* (CERON, 1983).

Já cruzamentos envolvendo estoques de *D. virilis*, portadores de diferentes alelos, mostraram haver diferenças entre o tempo de expressão do alelo materno e paterno, onde o materno é o primeiro a se manifestar (KOROCHKIN et al., 1974).

Desde a introdução da técnica da eletroforese na genética de populações, a neutralidade ou seleção de alozimas tem sido debatida entre os geneticistas. Em grande parte dos trabalhos com espécies de *Drosophila*, como *D. pseudoobscura* (PRAKASH et al., 1969), *D. ananassae* (JOHNSON, 1971), *D. willistoni* (AYALA et al., 1972) foi encontrado um padrão uniforme de frequências gênicas, que seus respectivos autores atribuíram à existência de seleção balanceadora, mantendo o polimorfismo observado. Com o aprimoramento desta técnica, tem sido possível

detectar. Em *D. pseudoobscura*, o loco Est-5 foi inicialmente considerado ausente de pressão seletiva (YAMAZAKI, 1971 em ARNASON, 1982). Esse resultado foi contestado por ARNASON (1982), que mostrou que este loco está sujeito a uma seleção balanceadora. Uma comparação estatística da frequência destes alelos do loco Est-5, em populações de *D. pseudoobscura*, prevista com base no modelo neutro, sugeriu que a distribuição dos alelos desviam da neutralidade em direção à seleção purificadora (KEITH, 1983). KIDANI et al., 1979 e animais (por exemplo, PADHI e KHODA-DUKH)

Em *D. buzzatii* a frequência genotípica de alguns locos enzimáticos, incluindo as esterases, têm mostrado

associação significativa com microrganismos, medida pela variabilidade do cacto utilizado (BARKER, 1982). Fêmeas de diferentes genótipos mostram seleção de habitat para local de oviposição, facilitando a manutenção de polimorfismo genético. Essas e outras associações com variáveis do cacto indicam que a seleção natural está afetando a frequência de alozimas e, portanto, sugere heterogeneidade ambiental e seleção diversificadora como um mecanismo para a manutenção de variabilidade genética (BARKER et al., 1986).

A evolução orgânica ocorre por meio de mudanças nas frequências gênicas, ao longo do tempo. Essas mudanças podem ser melhor estudadas comparando a constituição genética de populações que apresentam variados graus de separação evolutiva.

A eletroforese tem se mostrado uma técnica importante no estudo de enzimas e outras proteínas de diferentes populações ou espécies, no sentido de verificar mudanças na constituição gênica. Com o aprimoramento desta técnica, tem sido possível detectar diferenças mínimas entre proteínas, antes não detectáveis. Citamos, como exemplo, WRIGHT (1963) que, utilizando gel de amido, detectou 10 bandas com atividade esterásica em *D. melanogaster*. Já HEALY et al. (1991) usando uma combinação de gel de poliacrilamida e focalização isoelétrica, detectaram 22 bandas diferentes na mesma espécie.

A análise comparativa de enzimas e outras proteínas em vários grupos taxonômicos de plantas (por exemplo, VASSEUR et al., 1990; KIDAMBI et al., 1990) e animais (por exemplo, PADHI e KHODA-BUKHSI, 1990; MILLER e NOVAK, 1983) tem sido usada para estudar problemas evolutivos e taxonômicos.



A análise da similaridade bioquímica e de diferenças entre espécies pode proporcionar dois tipos de informações. De um lado, tais análises podem ser vistas como um simples critério taxonômico adicional; e assim podem ser importantes auxiliares para distinguir entre grupos taxonômicos, particularmente quando a similaridade morfológica é grande. De outro lado, e mais importante, tais análises proporcionam um meio de calcular a quantidade de mudanças genéticas que ocorrem em um único loco, durante a evolução, que algumas informações morfológicas não podem proporcionar sozinhas (McREYNOLDS, 1967).

JOHNSON et al. (1966) estudou esterases, com base na especificidade ao substrato e na inibição e ativação da enzima pelo álcool, em várias espécies do gênero *Drosophila* e verificou que as diferenças observadas entre as espécies estão correlacionadas com o estabelecimento de categorias taxonômicas.

Diferentes números e tipos de alelos foram verificados entre espécies relacionadas, tais como *D. americana*, *D. novamexicana* e *D. virilis* (McREYNOLDS, 1967) e entre *D. pseudoobscura*, *D. persimilis* e *D. miranda* (COBBS e PRAKASH, 1976).

A análise das alfa-esterases em *D. borealis*, *D. flavomontana* e *D. montana* mostrou a presença de 1, 2 e 3 locos, respectivamente, para essas enzimas. Baseado na hipótese de que esses locos originaram-se por duplicação, esse estudo proporcionou evidências que *D. borealis* e *D. flavomontana* não derivam de *D. montana*, como indicado por outros estudos (BAKER, 1980).

Conforme revisão em DIZZO (1983), existem fortes evidências de uma recente glaciação conhecida como Wür-Wisconsin.



POLYAKOVA e KOROCHKIN (1986) analisaram, comparativamente, as mudanças no padrão de esterases em várias espécies de *Drosophila* do grupo *virilis*. Foi verificada grande similaridade entre espécies do mesmo "phylad" e diferenças maiores entre espécies de "phylads" diferentes. O "phylad" *virilis* difere do "phylad" *montana*, por apresentar um menor número de bandas com especificidade para o beta-naftil acetato, por possuir esterase pupal e por diferenças na intensidade de coloração.

O objeto do presente trabalho é a superespécie *Drosophila serido* (cluster *buzzatii*, complexo *mulleri*, subgrupo *mulleri*, grupo *repleta*). *Drosophila serido* encontra-se difundida na América do Sul, distribuindo-se pelo Brasil, Argentina, Bolívia e Paraguai. No Brasil tem sido encontrada nas caatingas, dunas, campos rupestres e em certas partes do pantanal matogrossense, enquanto que na Argentina, Bolívia e Paraguai é encontrada nas bordas do chaco (VILELA et al., 1980; SENE et al., 1980; RUIZ et al., 1982; VILELA et al., 1983). *Drosophila serido*, descrita por VILELA e SENE (1977), assim como muitas espécies do grupo *repleta*, utiliza o cacto em decomposição como alimento e local de oviposição (PEREIRA et al., 1983). Admite-se que este fato tenha permitido ao grupo a que pertence *D. serido* ocupar nichos ainda não explorados, oferecendo condições para uma rápida evolução. As exigências ecológicas dos cactos, como tipo de solo e umidade, têm permitido deduzir sua distribuição no passado e conhecê-la nas condições atuais.

Conforme revisão em BIZZO (1983), existem fortes evidências de uma recente glaciação conhecida como Wür-Wisconsin.

Esta glaciação tornou o clima no hemisfério sul mais frio e seco entre 12.000 e 18.000 anos atrás, havendo então uma expansão das regiões semi-áridas com a presença de cactáceas e provavelmente de *D. serido*. Com o final da glaciação, houve um aumento da umidade, fazendo com que a espécie em estudo ficasse restrita a regiões que permaneceram secas, separando-se em uma série de populações alopátricas. É encontrado nas linhagens A77 (Cafarnaum-BA), A16, A 85.

A distribuição em populações separadas, faz de *D. serido* um importante material no estudo do processo de especiação. O estudo das características morfológicas, citogenéticas, ecológicas e reprodutivas dessas populações indicou a existência de uma diferenciação geográfica, levando talvez ao surgimento de um grupo de espécies diferentes. Hoje são duas as espécies descritas na superespécie *D. serido*: *D. serido* e *D. koepferae* descrita por FONTDEVILA et al. (1988). foi verificada

Nos estudos da morfologia do aparelho genital masculino, foi verificada a existência de 5 tipos de edeagos (SILVA, 1981 e SILVA e SENE, 1991). O tipo "A" ocorre na parte leste do Brasil, desde o Ceará até o litoral do Rio Grande do Sul. O tipo "B" ocupa a diagonal caatinga-pantanal matogrossense. O tipo "C" ocorre conjuntamente com o tipo "A" na Serra do Cipó-MG. O tipo "D" tem distribuição que vai do interior de São Paulo até a parte leste do chaco argentino. O tipo "E" ocorre ao leste do chaco argentino, já nas encostas dos Andes. O tipo V aparece

Também foi verificada uma diferença na coloração do corpo e testículos de machos procedentes de diferentes localidades. Na linhagem A95, proveniente de Minas Gerais - Brasil, a coloração do corpo tende para o preto e o testículo se



apresenta vermelho-escuro, enquanto que na linhagem B20D2 proveniente de Tápia, Tucumán na Argentina, o corpo tende para o marrom e o testículo é alaranjado (MADI-RAVAZZI, 1983; FONTDEVILLA et al., 1988).

Quanto aos rearranjos cromossômicos, as populações de D. serido foram divididas em quatro tipos (TOSI, 1982; TOSI e SENE, 1989). O tipo I é encontrado nas linhagens A77 (Cafarnaum-BA), A16, B53 e B58 (as três de Milagres-BA). O tipo II é encontrado nas linhagens B31 (Puerto Tirol-Argentina) e B32 (Resistencia-Argentina). O tipo III é encontrado em B20 (Tápia-Argentina) e B26 (Famatina-Argentina). O tipo IV é encontrado em A19 (Ibotirama-BA), A53 (Bella Vista-Paraguai), A55 (Bela Vista-MS), A95 (Cardeal Mota-MG), B49 (Barreiras-BA), B50 (Ibotirama-BA) e B59 (Petrolina-PE).

Nos estudos de cromossomos metafásicos, foi verificada a existência de seis tipos diferentes de cariótipos. As principais diferenças referem-se à quantidade e distribuição de blocos heterocromáticos nos microcromossomos e cromossomos sexuais (BAIMAI et al., 1983). O tipo I inclui as linhagens B58 (Paulo Afonso-BA), B53 (Milagres-BA), B59 (Petrolina-PE), A19 (Ibotirama-BA), B49 (Barreiras-BA), B89 (Caririnha-BA), B98 (Cristalina-GO) e A55 (Bela Vista-MS). O tipo II ocorre apenas na Serra do Cipó-MG. O tipo III foi encontrado no Arraial do Cabo-RJ (B97). O tipo IV foi encontrado em Peruíbe-SP. O tipo V aparece em Itu-SP e Puerto Tirol, Chaco argentino. O tipo VI ocorre na margem oeste do Chaco argentino.

Já uma comparação das bandas dos cromossomos politênicos nas glândulas salivares das linhagens B20D2



(Argentina) e A25F3 (Brasil) mostrou diferenças na região proximal dos cromossomos 2, 3 e X (MADI-RAVAZZI, 1988). Quanto ao isolamento reprodutivo, foram realizados cruzamentos envolvendo 14 linhagens isofêmeas, e verificada a existência de diferentes níveis de isolamento, com base nos quais essas linhagens foram divididas em quatro grupos: o grupo I que compreende as linhagens B50 e B53, o grupo II, as linhagens B57, A19, D49, B97, A55 e D31, o grupo III, as linhagens A95, B89 e B98, o grupo IV, somente C9 e o grupo V, por B20 e B26 (DIZZO, 1983). MADI-RAVAZZI (1988) analisou as linhagens A95 (Minas Gerais - Brasil) e B20D2 (Tápis - Argentina) e verificou que estas apresentam mecanismos de isolamento pré e pós-zigóticos.

Presentemente estão sendo analisados outros marcadores para estudos dessas populações abrangendo os padrões de som de machos na corte (NATHER et al., 1991), análise morfológica da genitália masculina por técnicas de morfometria multivariada (TIDON-SKLORZ e SENE, 1991), do comportamento sexual (MORAES, 1991), da sinapse cromossômica nos híbridos e de alguns aspectos do isolamento reprodutivo (MADI-RAVAZZI E RICUDO, 1991).

No presente trabalho foi realizado um estudo dos padrões de esterases de linhagens isofêmeas da superespécie *D. serido* e de alguns híbridos, objetivando obter informações sobre diferenças ao nível gênico existentes entre elas. Assim, seriam acrescentadas, aos marcadores já existentes, utilizados para estabelecer o grau de divergência evolutiva entre populações dessa superespécie, evidências bioquímicas com o mesmo fim. Os híbridos foram utilizados para facilitar o estudo genético das bandas esterásicas e para detectar possíveis mecanismos de



regulação gênica operando seu controle. Foi incluída nesse estudo, com a finalidade de comparação por já ter sido analisada quanto ao padrão de esterases (EAST, 1982) uma linhagem de *Drosophila buzzatii*, espécie próxima de *Drosophila serido* e pertencente ao mesmo "cluster", no qual se inclui também *D. borborema*, espécie endêmica do nordeste brasileiro. .

Nas figuras e tabelas, as linhagens isofêmicas pertencentes a três espécies diferentes, sendo cinco de *D. serido*, duas de *D. koepferae* e uma de *D. buzzatii*. Essas linhagens foram cedidas pelo Prof. Dr. Fábio de Melo Sene, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Suas procedências e códigos são mostrados na tabela 1. Nas figuras e tabelas, as linhagens R74, A95F3 e A55F11 são referidas como Buz, A95 e A55, respectivamente.

2. Manutenção em Laboratório

As linhagens foram mantidas em laboratório em temperatura constante de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, contidas em garrafas de 250 ml. Essas garrafas possuíam no seu interior uma mistura de meios de banana e cacto, na proporção de 1:1, preparados com os seguintes componentes:

a) Meio de banana

- 300 g de banana nanica descascada e moída
- 25 ml de melado (1 kg de açúcar em 200 ml de água, deixando-se ferver até o ponto de melado)
- 15 g de fermento Fleischmann
- 0 g de ágar-ágar
- 2 ml de ácido propiônico

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. As Linhagens

No presente trabalho foram utilizadas oito linhagens isofêmeas, pertencentes a três espécies diferentes, sendo cinco de *D. serido*, duas de *D. koepferae* e uma de *D. buzzatii*. Essas linhagens foram cedidas pelo Prof. Dr. Fábio de Melo Sene, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Suas procedências e códigos são mostrados na tabela 1. Nas figuras e tabelas, as linhagens R74, A95F3 e A55F11 são referidas como Buz, A95 e A55, respectivamente.

2. Manutenção em Laboratório

As linhagens foram mantidas em laboratório em temperatura constante de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, contidas em garrafas de 250 ml. Essas garrafas possuíam no seu interior uma mistura de meios de banana e cacto, na proporção de 1:1, preparados com os seguintes componentes:

a) Meio de banana

- 200 g de banana nanica descascada e moída
- 25 ml de melado (1 kg de açúcar em 200 ml de água, deixando-se ferver até o ponto de melado)
- 15 g de fermento Fleischmann
- 0 g de ágar-ágar
- 2 ml de ácido propiônico

- 0 ml de solução alcoólica de nipagin a 0X

- 1000 ml de água

b) Meio de cacto

- 12 g de agar

- 30 g de fermento fleischmann

Tabela 1. Código e procedência das linhagens isofêmeas de *Drosophila serido*, *D. koepferae* e *D. buzzatii*, estudadas no presente trabalho.

ESPÉCIE	LINHAGEM	PROCEDENCIA
<i>Drosophila serido</i>	B57Q1	Petrolina - PE
	B50Q3	Ibotirama - BA
	A55	Bela Vista - MS
	A75	Serra do Cipó - MG
	B31D1	Puerto Tirol/Chaco
<i>Drosophila koepferae</i>	B20D2	Tapia - Tucuman
	B25D7	La Rioja
<i>Drosophila buzzatii</i>	Buz (R74)	Cafarnaum - BA

Após o repique (transferência do estoque de moscas para meio de cultura novo), realizado a cada 20 dias, as moscas recém-nascidas eram coletadas, separadas quanto ao sexo e transferidas para tubos contendo meio banana-cacto, onde permaneciam até completarem 10 dias de idade. Então eram analisadas individualmente ou congeladas a -20°C , para análise posterior. Tomou-se o cuidado para que o tempo de congelamento não ultrapassasse um mês, prazo em que os resultados de análise de moscas frescas e congeladas não diferem.

- 3 ml de solução alcoólica de nipagin a 3%
- 1000 ml de água

4. Obtenção dos híbridos

b) Meio de cacto

- 12 g de ágar
- 30 g de fermento fleschmann
- 3 bananas amassadas
- 10 ml de ácido propiônico
- 50 ml de melado de açúcar
- 10 ml de solução alcoólica de nipagin a 7%
- 500 ml de purê de cacto
- 1000 ml de água

O cacto utilizado foi *Opuntia ficus-indica* do tipo palmado. Para a obtenção do purê, os cladódios são cozidos em água, batidos no liquidificador e o material resultante é em seguida autoclavado.

3. Obtenção de Moscas para Análise Intralinhagem

Após o repique (transferência do estoque de moscas para meio de cultura novo), realizado a cada 20 dias, as moscas recém-nascidas eram coletadas, separadas quanto ao sexo e transferidas para tubos contendo meio banana-cacto, onde permaneciam até completarem 10 dias de idade. Então eram analisadas individualmente ou congeladas a -20°C , para análise posterior. Tomou-se o cuidado para que o tempo de congelamento não ultrapassasse um mês, prazo em que os resultados da análise de moscas frescas e congeladas não diferem.



4. Obtenção dos híbridos

Os híbridos foram obtidos por intercruzamentos das linhagens duas a duas. Os cruzamentos para a obtenção de híbridos foram realizados em garrafas, utilizando-se 10 a 15 casais de sete dias de idade, obtidos da forma já descrita para análise intralinhagem. Após 10 dias do cruzamento, os pais eram transferidos para uma nova garrafa. Os híbridos eram retirados das garrafas à medida em que nasciam, e analisados individualmente com 10 dias de idade.

5. Preparo dos Géis

O gel de poliacrilamida, usado neste trabalho, é formado por uma reação de polimerização entre a acrilamida e seu comonômero de ligação cruzada, a bisacrilamida (N, N'-metilenobisacrilamida), transformando-se em uma espécie de "malha" por onde passam as proteínas. Uma variação no tamanho dos poros existentes nesta malha pode ser obtida modificando a proporção acrilamida/bisacrilamida que determina a porcentagem de ligações cruzadas ou variando-se a concentração do gel. No presente trabalho, os géis foram preparados a 10% de concentração (TX) com 2,6% de ligações cruzadas (CX).

As soluções e tampões empregados foram adaptados dos trabalhos de DAVIS (1964) e LAEMMLI (1970). Fazem parte dos géis os seguintes componentes:



- a. Solução aquosa estoque de acrilamida/bisacrilamida, preparada com 30 g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida dissolvidas em água em um volume final de 100 ml. Essa solução é mantida em geladeira, em frasco escuro.
- b. Tampão do gel (7,5 X concentrado) obtido com tris a 1,5 M ajustado a pH 8,8 com HCl 6M. Deve ser mantido em frasco escuro.
- c. Solução aquosa de persulfato de amônio a 2% (recém-preparada). O persulfato de amônio em pó deve ser armazenado em dessecador para evitar sua hidratação.
- d. TEMED (N, N, N', N', tetrametilenodiamina) com aproximadamente 99% de pureza, este deve ser o último componente adicionado à solução, dando início a polimerização.

Os componentes c e d atuam como catalizadores da reação de polimerização.

Os volumes de água e demais componentes utilizados para o preparo dos géis a 10% são os seguintes:

Água	10,5 ml
Tampão do gel (7,5X) pH 8,8	3,25 ml
Solução de acrilamida/bis	8 ml
Persulfato de amônia a 2%	0,4 ml
TEMED	25 μ l

Os géis foram polimerizados entre duas placas de vidro de 15x17x0,5 cm. As placas eram presas por garras com um espaço entre elas formado pela introdução de espaçadores de acrílico, com um milímetro de espessura, colocados nos lados e no bordo inferior. Para a vedação, colocava-se uma camada de vaselina, com

o auxílio de uma seringa, entre os espaçadores. Uma das placas apresentava um recorte com dois centímetros de profundidade, no qual era adaptado um pente de acrílico, com 14 dentes, para a formação dos poços de aplicação das amostras. O espaço entre as placas era então preenchido com a solução de polimerização. O conjunto permanecia, então, por 30 minutos no escuro para a formação dos géis, após o que, o pente e o espaçador inferior eram retirados e as placas eram dispostas, na posição vertical, em uma cuba de acrílico, com o auxílio de quatro garras. O modelo da cuba possibilitava a adaptação de dois conjuntos de placas ao mesmo tempo, permitindo a análise simultânea de 28 amostras.

6. Preparo das Amostras e Condições de Eletroforese

Moscas com 10 dias eram maceradas, individualmente, a 0°C em 20 μl a 30 μl do tampão de amostra (Tris 0,1 M pH 8,8, contendo glicerol a 10%) e em seguida centrifugadas a 2000 rpm, por três minutos. Era utilizado, para cada amostra, um volume de 10 a 20 μl do sobrenadante. Após a aplicação das amostras, os géis eram submetidos à eletroforese por três horas e 15 minutos, a uma voltagem constante de 200 V, utilizando-se para o preenchimento dos compartimentos superior e inferior da cuba, um tampão Tris-glicina 0,1 M pH 8,3.

6.1. Preparo das amostras e aplicação no gel.

7. Tratamento dos Géis para a Identificação das Esterases

O procedimento empregado para permitir a identificação das bandas com atividade esterásica, nos géis, foi baseado nos

métodos de coloração descritos por JOHNSON et al. (1966) e STEINER e JOHNSON (1973) modificados por CERON (1988). Para isso os géis eram pré-incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente, em placas de Petri contendo 50 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2. A seguir, o tampão era retirado e adicionada a solução de coloração constituída de 50 ml de tampão fosfato 0,1

8.2. Teste de coloração
M pH 6,2 contendo 15 mg de beta-naftil acetato e 20 mg de alfa-naftil acetato (previamente solubilizados em 1 ml de acetona ou metanol), 60 mg de Fast Blue RR e 5 ml de N-propanol. Após a coloração por uma hora, no escuro e à temperatura ambiente, as esterases eram visualizadas nos géis como bandas de coloração preta ou vermelha, indicativas da presença de alfa e beta esterases, respectivamente. Após a coloração, os géis eram tratados com 100 ml de uma solução de descoloração contendo álcool etílico comercial, ácido acético e água na proporção de 2:1:0, por 24 a 40 horas.

8. Análise da Especificidade ao Substrato

9. Secagem dos Géis

Para análise da especificidade aos substratos das esterases, os géis foram submetidos a diferentes soluções corantes. Inicialmente os géis eram mantidos em uma solução de

ácido acético a 7,5% e glicerol a 10% por duas horas. Em seguida,

0.1. Preparo das amostras e aplicação no gel.
eram banhados numa solução de gelatina comercial a 5%, preenchidos

em um bastidor. Uma mesma amostra era preparada de modo a permitir quatro aplicações no gel. Esta era constituída de quatro moscas adultas (machos) maceradas em 100 μ l do tampão de amostra. em uma

fina película entre as folhas de celofane que são recortadas e

A aplicação no gel era feita de modo a possibilitar a obtenção de quatro conjuntos exatamente iguais de seis amostras, referentes a seis linhagens diferentes. Cada gel possuía dois conjuntos que, após a corrida e antes da coloração, eram separados.

8.2. Teste de coloração

Para o teste de coloração foi realizado o procedimento normal, diferindo somente nas proporções de substratos das soluções de coloração, que era diferente para cada conjunto de amostras. As quatro soluções continham as seguintes quantidades de substratos (adicionadas a 55 ml de solução contendo Fast Blue, água destilada e propanol nas concentrações usuais):

- a. 0,05 g de alfa-naftil acetato
- b. 0,05 g de beta-naftil acetato
- c. 0,04 g de alfa-naftil acetato e 0,02 g de beta-naftil acetato
- d. 0,02 g de alfa-naftil acetato e 0,04 g de beta-naftil acetato

9. Secagem dos Géis

A secagem dos géis foi baseada no método de CERON et al. (1972). Inicialmente os géis eram mantidos em uma solução de ácido acético a 7,5% e glicerol a 10% por duas horas. Em seguida, eram banhados numa solução de gelatina comercial a 5%, prensados em um bastidor entre duas folhas de papel celofane e deixados à temperatura ambiente por três a quatro dias para a secagem. Por este procedimento os géis desidratam, transformando-se em uma fina película entre as folhas de celofane que são recortadas e



guardadas para a análise.

10. Análises Estatísticas

10.1. Teste t e Qui-quadrado

Para comparação da variabilidade de padrões entre machos e fêmeas, foram aplicados o Teste t e χ^2 .

Para análise pelo teste t, foi calculado o P para machos e fêmeas de todas as linhagens, onde:

$$P = \frac{\text{nº de padrões encontrados}}{\text{nº de indivíduos analisados}}$$

e aplicada a transformação "angular de Fisher" ($\arcsen \sqrt{P} = \theta$), que normaliza dados percentuais ou proporcionais, e estabiliza a variância.

10.2. Índice de Similaridade (IS)

O índice de similaridade, utilizado neste trabalho, foi inicialmente utilizado por WHITNEY et al. (1968) para um estudo comparativo do padrão de proteínas em quatro tipos de fungos, como um caráter taxonômico.

O IS, no presente trabalho, foi calculado da seguinte forma:

$$IS = \frac{\text{Nº DE PARES DE BANDAS SIMILARES}}{\text{Nº DE BANDAS DIFERENTES + Nº DE PARES DE BANDAS SIMILARES}}$$



10.3. Análise de Dependência (ANADEP)

A análise de dependência é uma técnica geométrica para o estudo de associações entre linhas e colunas (neste caso entre bandas esterásicas e linhagens, respectivamente) de uma tabela de classificação cruzada. Neste trabalho a tabela é a das porcentagens de ocorrência de cada banda esterásica para cada linhagem (20 X 8) (tabela 8, ver apêndice).

O método ANADEP, segundo CORDEIRO (1987) é, em linhas gerais, o seguinte: cada linhagem, vista como um vetor das proporções das bandas esterásicas nela encontradas, é um ponto (no sentido geométrico) no espaço real de dimensão 20; da mesma forma cada banda esterásica, vista como um vetor das proporções das linhagens em que ela é encontrada, é um ponto em um espaço de dimensão oito. Teremos, então, no espaço de dimensão 20, uma nuvem de oito pontos, cada uma representando uma linhagem, e no espaço de dimensão 8, uma nuvem de 20 pontos, cada um representando uma banda esterásica.

Dadas estas configurações de pontos, o método procura usando técnicas matemáticas adequadas, direções nos respectivos espaços onde estão as linhagens (dimensão 20) e onde estão as bandas (dimensão 8), que disponham para o observador aqueles objetos ou pontos (linhagens e bandas) o mais dispersos possível. Isto é, nas direções mais favoráveis para se enxergarem os pontos (linhagens, por exemplo) no sentido de que eles fiquem o mais afastados possível um do outro.

Cada direção é um fator de dependência e estes são ordenados pela ordem decrescente das sua dependências (medidas de



quantidade de espalhamento dos pontos ao longo de sua direção no espaço correspondente). O fator de dependência 1 (FT1) é, portanto, aquele que tem a maior dependência, o fator de dependência 2 (FT2) é a segunda maior dependência, e assim por diante. Em cada espaço, a dependência de cada fator é a mesma de seu correspondente, na ordenação no outro espaço. A dependência total é a soma das dependências de todos os fatores e é mais informativo apresentar estas não em valores absolutos, mas como percentuais da dependência total. Com isto representam-se as importâncias dos fatores de dependência, em função dos percentuais da dependência total explicadas.

1. Posição O número máximo de fatores é a menor das duas dimensões. Neste trabalho é oito. Quando as categorias cruzadas (linhagens X bandas esterásicas) não possuem associação, então, a dependência é nula e, conseqüentemente, não há fator de dependência. Mas, quando houver associação na tabela, quanto mais forte for, menor número de fatores se encarrega de explicar um percentual maior da dependência total. É bom para a interpretação das associações existentes na tabela, que poucos fatores expliquem a maior parte da dependência.

A numeração das bandas foi feita a partir da extremidade anódica do gel. Bandas que apresentaram a mesma velocidade de migração, mas padrões de coloração diferentes, foram numeradas diferentemente.

2. Variação das Bandas quanto à Coloração e Espessura

As bandas apresentaram variação quanto à cor (tons de



III. RESULTADOS

Um total de 40 bandas com atividade esterásica foi encontrado em 690 indivíduos analisados, das oito linhagens isofêneas. Essas bandas foram diferenciadas pela sua posição no gel, que se refere à mobilidade eletroforética, e quanto ao padrão de coloração que reflete sua especificidade ao substrato. A distribuição destas bandas entre as linhagens, sua numeração, padrão de coloração e espessura estão mostrados, de forma esquemática, na figura 1.

1. Posição das Bandas

A posição das bandas com atividade esterásica foi estabelecida por meio de uma análise essencialmente comparativa entre as linhagens. Assim, as bandas de uma linhagem eram determinadas em relação à posição das bandas de outras linhagens, sempre comparadas quando presentes em um mesmo gel, a fim de se evitar o erro devido a pequenas diferenças na velocidade de migração de um gel para outro.

A numeração das bandas foi feita a partir da extremidade anódica do gel. Bandas que apresentaram a mesma velocidade de migração, mas padrões de coloração diferentes, foram numeradas diferentemente.

2. Variação das Bandas quanto à Coloração e Espessura

As bandas apresentaram variação quanto à cor (tons de



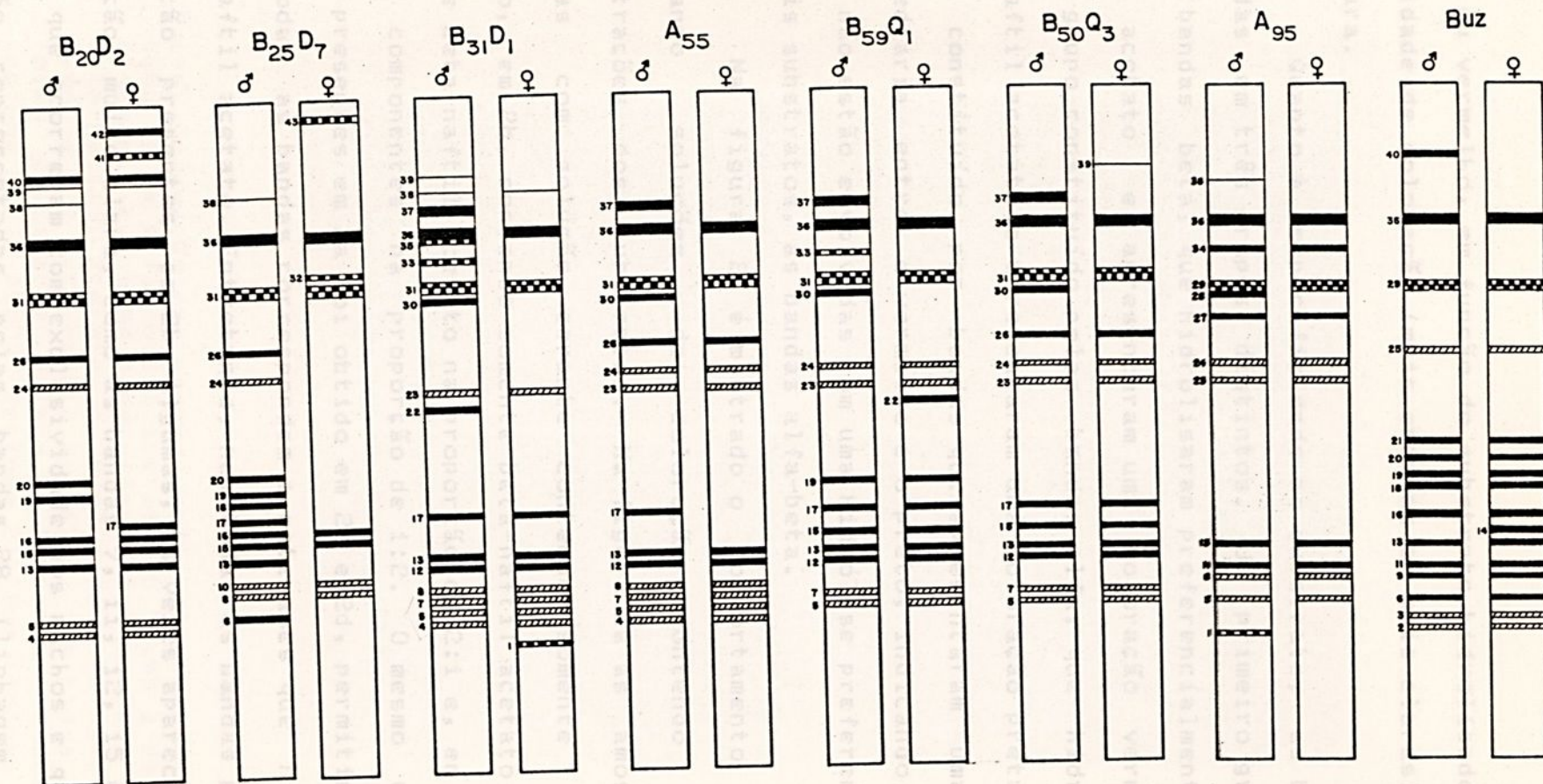


Figura 1 - Bandas de esterase (1 a 43) encontradas em machos e fêmeas das linhagens analisadas.

preto ou vermelho, em função do substrato hidrolisado), quanto à intensidade de coloração (mais escuras ou mais claras) e quanto à espessura.

Quanto à especificidade ao substrato, as bandas foram divididas em três grupos distintos. Um primeiro grupo formado pelas bandas beta, que hidrolisaram preferencialmente o beta-naftil acetato e apresentaram uma coloração vermelha, um outro grupo constituído pelas bandas alfa, que hidrolisaram o alfa-naftil acetato e apresentaram uma coloração preta e o último grupo, constituído por bandas que apresentaram uma coloração intermediária entre o vermelho e o preto, indicando que essas bandas não estão envolvidas com uma hidrólise preferencial frente aos dois substratos, as bandas alfa-beta.

Na figura 2 é mostrado o comportamento das bandas utilizando soluções de coloração contendo diferentes concentrações dos substratos. Na figura 2a as amostras foram tratadas com solução corante contendo somente alfa-naftil acetato, em 2b, contendo somente beta-naftil acetato, em 2c com alfa e beta-naftil acetato na proporção de 2:1 e, em 2d, com os mesmos componentes na proporção de 1:2. O mesmo conjunto de bandas presentes em 2a foi obtido em 2c e 2d, permitindo concluir que todas as bandas correspondem a esterases que hidrolisam o alfa-naftil acetato. Entretanto, nem todas as bandas presentes em 2a estão presentes em 2b. Algumas, às vezes aparecem com uma coloração muito clara, como as bandas 7, 11, 12, 15 e 16. Já as bandas que ocorreram com exclusividade nos machos e que na figura 2 estão representadas pelas bandas 28 (linhagem A95F3), 30 (linhagem B57Q4) e 19 e 20 (linhagem B20D2) não foram detectadas



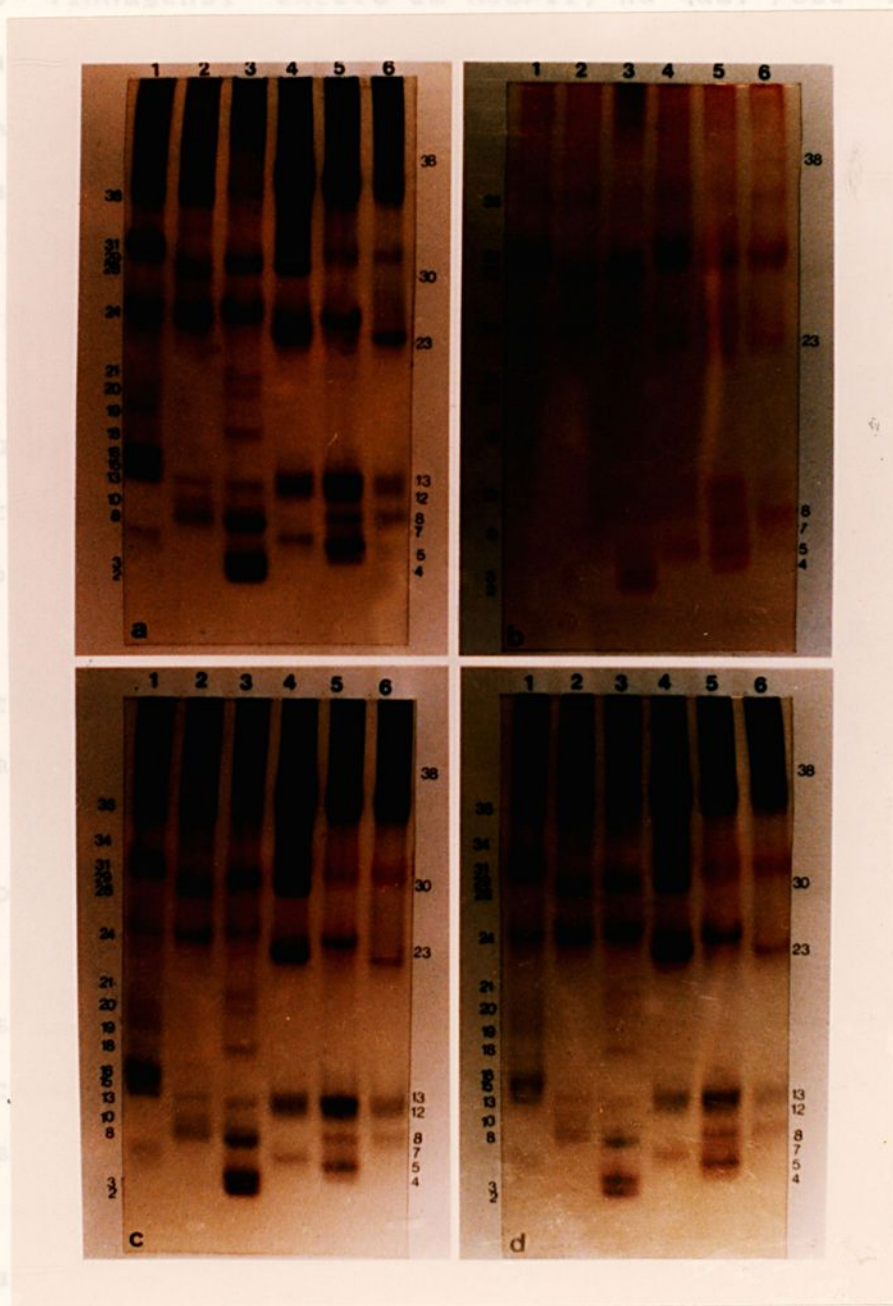


Figura 2 a-d. Coloração das bandas usando diferentes soluções. a. 0,05 g de alfa-naftil acetato. b. 0,05 g de beta-naftil acetato. c. 0,04 g de alfa-naftil acetato e 0,02 g de beta-naftil acetato. d. 0,02 g de alfa-naftil acetato e 0,04 g de beta-naftil acetato. Em todas as colunas foram utilizados machos na seguinte sequência: B20D2 (coluna 1), A95F3 (coluna 2), Duz (coluna 3), B59Q1 (coluna 4) e A55F11 (coluna 5) e B31D1 (coluna 6).

em 2b. Na figura 2b, a banda 13 aparece fracamente corada em todas as linhagens, exceto em A55F11, na qual pode ser vista nitidamente. Em outros géis, porém, submetidos somente ao beta-naftil acetato, a banda 13 apresentou-se bem corada, como nas linhagens B25D7 e A95F3.

Nas figuras 2c e 2d podemos notar dois tipos de bandas. Um tipo é constituído por bandas que apresentam sempre o mesmo padrão de coloração, independentemente da concentração dos substratos. Aqui, incluem-se as bandas 27 e 31 que hidrolisam preferencialmente o beta-naftil acetato, mas, que na ausência deste, participam da hidrólise do alfa-naftil acetato (figura 2a); as bandas ausentes em 2b que hidrolisam somente o alfa-naftil acetato e as bandas 17, 20, 21 e 16 da linhagem Buz e a 34 da linhagem A95F3 que hidrolisam preferencialmente o alfa-naftil acetato. O outro tipo é formado por bandas cuja intensidade de coloração é dependente da concentração dos substratos, sendo mais escuras quando o alfa-naftil está em maior concentração e mais vermelhas quando o beta-naftil está em maior concentração. Neste caso incluem-se as bandas mais anódicas 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 10 e as bandas centrais 23, 24 e 25.

Mesmo quando a mesma concentração de substratos foi utilizada, de modo geral, observou-se variação na intensidade de cor de uma mesma banda entre diferentes indivíduos de uma mesma linhagem, provavelmente refletindo diferenças na quantidade de enzimas presente. Em algumas linhagens, algumas bandas apresentaram, constantemente, uma coloração fraca. Exemplos deste caso são as bandas 4 e 7 nas linhagens B3iD1 e A55F11, as bandas 17 e 20 em Buz e B25D7, a banda 21 em Buz, 24 em B25D7, 26 em

B20D2, B25D7, A55F11 e B50Q3 e as bandas 27 e 34 na linhagem A95F3. Essas variações na intensidade de coloração poderão ser vistas nas figuras correspondentes aos géis (figuras 6, 7 e 9 a 12).

A variabilidade na espessura das bandas apresentou-se geralmente, relacionada com a intensidade de coloração, isto é, bandas mais fortemente coradas eram mais espessas. Entretanto, algumas bandas apresentaram-se, frequentemente, mais espessas, independentemente da intensidade de coloração, como as bandas 29, 31, 36 e 37. Já as bandas 38 e 39, caracterizaram-se por serem delgadas, de aspecto semelhante a um traço.

3. Variabilidade Intralinhagem dos Padrões de Esterases

Para facilitar a análise da variabilidade existente dentro de cada linhagem, o padrão de bandas de cada indivíduo analisado foi esquematizado e, a partir desses dados, construída a tabela 2.

Na tabela 2 são mostrados os números de indivíduos analisados de cada sexo, de padrões observados e de indivíduos que apresentaram os padrões mais e menos frequentes, em cada linhagem.

Os machos de todas as linhagens, exceto Buz, apresentaram variabilidade maior que as fêmeas. Isto pode ser observado especialmente nas linhagens B25D7, B31D1 e A95F3, onde o número de padrões encontrados nas fêmeas é da ordem de 2 a 4 vezes menor que em seus respectivos machos. Grande parte dessa



Tabela 2. Variabilidade dos padrões observados intralinhagem. A frequência refere-se ao número de indivíduos portadores dos padrões.

LINHA- GEM	PADRÕES					
	FÊMEA			MACHO		
	TOTAL DE FÊMEAS ANALISADAS	TOTAL DE PADRÕES	FREQUÊNCIA ----- MIN - MAX	TOTAL DE MACHOS ANALISADOS	TOTAL DE PADRÕES	FREQUÊNCIA ----- MIN - MAX
B20D2	35	14	1 - 6	52	19	1 - 8
B25D7	42	4	1 - 37	57	16	1 - 25
B31D1	49	5	1 - 35	44	20	1 - 6
A55	38	15	1 - 5	44	18	1 - 7
B59Q1	33	15	1 - 9	37	22	1 - 5
B50Q3	45	17	1 - 6	45	18	1 - 11
A95	39	8	1 - 15	48	15	1 - 12
Buz	40	14	1 - 11	42	14	1 - 9
TOTAL	321	92		369	142	

variabilidade aumentada nos machos é devida às esterases presentes somente neste sexo.

Na linhagem B25D7, as 42 fêmeas analisadas mostraram somente quatro padrões diferentes, sendo que um desses padrões foi comum a 37 fêmeas; nos machos, em 57 indivíduos analisados foram encontrados 16 padrões e o mais frequente ocorreu em 25 indivíduos. Apesar desta diferença entre machos e fêmeas, B25D7 foi a linhagem que apresentou, no total, o menor número de padrões, isto é, 20.

Entretanto, o teste t com a transformação angular de Fisher, calculado para igualdade do número de padrões detectados em fêmeas e machos, em todas as linhagens analisadas, mostrou que a diferença entre os sexos é não significativa ($t = 1,62$; $p = 13$; $GL = 11,4$). O cálculo de χ^2 de igualdade para o número de padrões de fêmeas e machos em cada linhagem mostrou que a diferença é significativa para as linhagens B25D7 ($\chi^2 = 14,4$; $P < 0,05$), B31D1 ($\chi^2 = 18$; $P < 0,01$) e A25F3 ($\chi^2 = 4,26$; $P < 0,05$).

A seguir, são descritos aspectos dos padrões observados em cada linhagem utilizando os dados da tabela 2 e as figuras 3 a 18. Como as bandas foram detectadas em uma porcentagem variável de indivíduos, em cada linhagem, nem sempre a figura apresentada para ilustração contém todas as bandas mencionadas.

Linhagem B20D2

Na linhagem B20D2 foram analisadas 87 moscas, sendo 52 machos e 35 fêmeas. Nesses indivíduos foram encontradas 17 bandas esterásicas que se apresentaram combinadas de modo a constituir



32 padrões. Um desses padrões foi observado em fêmeas e machos. As bandas mais frequentes em B20D2 foram as alfa-beta 4, 5 e 24, as alfa 15, 16, 26 e 36 e a beta 31 (figuras 3 e 4). Os machos apresentaram ainda as bandas alfa 19 e 20.

As bandas 15 e 16 ocorreram juntas em 50,6% dos indivíduos, sendo que quatro indivíduos apresentaram somente a banda 15. Essas bandas estão localizadas bem próximas entre si, dando muitas vezes a impressão de uma única banda difusa.

As esterases alfa-beta correspondentes às bandas 4 e 5 também apareceram quase sempre juntas, exceto em poucos indivíduos (4,6%) que apresentaram somente a banda 5, (ver os dois primeiros indivíduos da figura 4). Essas duas bandas alfa-beta frequentemente se igualaram na intensidade de coloração, exceto, também, em alguns indivíduos nos quais a banda 5 era mais fortemente corada que a 4.

Linhagem B25D7

Nesta linhagem foram analisados 99 indivíduos, 57 machos e 42 fêmeas, e encontrado um total de 17 padrões diferentes, envolvendo 17 bandas. As bandas mais frequentes em B25D7 foram as bandas alfa-beta 8 e 10, as alfa 15 e 16, a beta 31 e a alfa 36 (figuras 3 e 5).

Como em B20D2, as bandas alfa 15 e 16, ocorreram sempre próximas, frequentemente dando a impressão de ser uma única banda. As esterases alfa-beta vistas nas bandas 8 e 10 ocorreram em 72,2% dos indivíduos, sempre juntas e com igual intensidade de coloração.



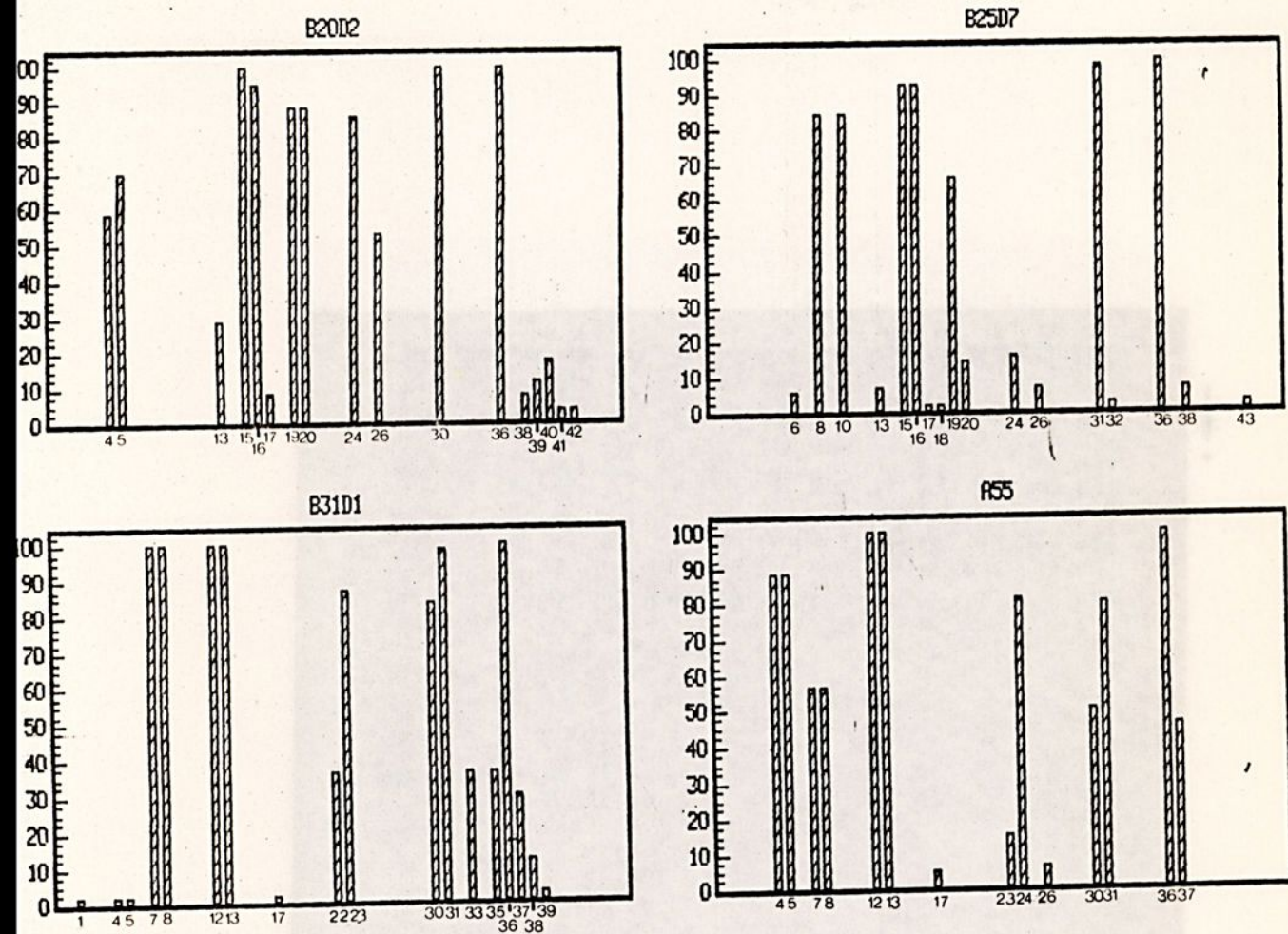


Figura 3. Distribuição das frequências (ordenada) das bandas (abscissa), nos indivíduos das linhagens B₂₀D₂, B₂₅D₇, B₃₁D₁ e A₅₅. As frequências das bandas que ocorreram só em um sexo foram calculadas sobre o número de indivíduos analisados, desse sexo.

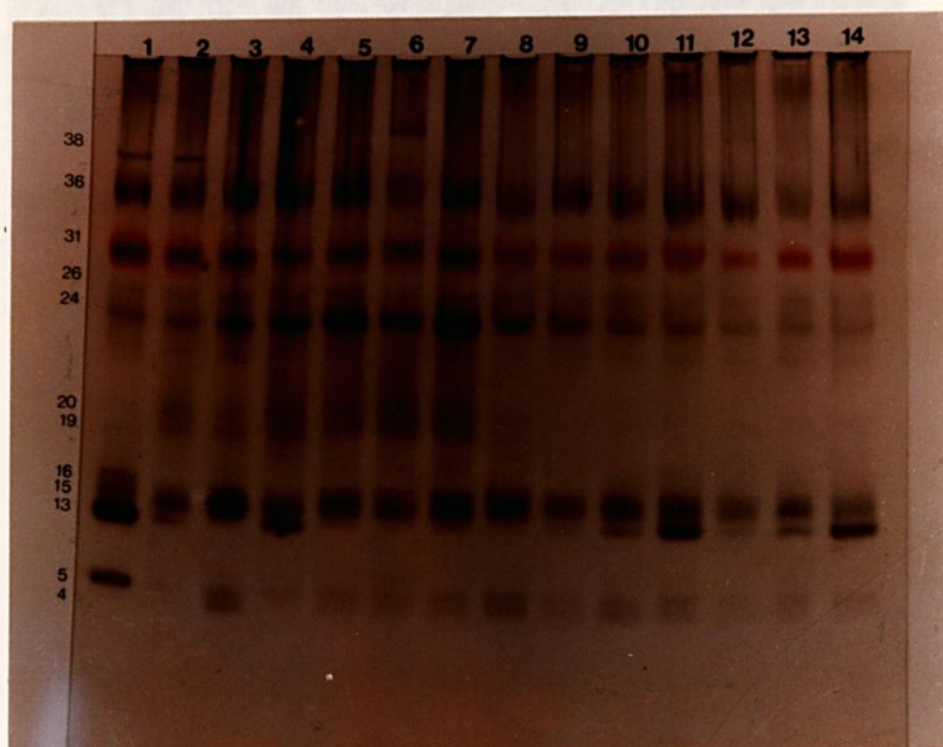


Figura 3. Padrões de esterases na linhagem B25D7. Colunas 1-7= machos, colunas 8-13= fêmeas.

Figura 4. Padrões de esterases na linhagem B20D2. Colunas 1-7= machos, colunas 8-14= fêmeas.

Três esterases foram detectadas exclusivamente nos machos, em B25D7: as bandas alfa 19, 20 e 24, a primeira com frequência em torno de 70% e as duas outras, em torno de 13%. A banda 24 foi detectada nas outras linhagens (com exceção de Buz e B31D1), ocorrendo tanto em machos como em fêmeas e em alta frequência; ao contrário de B25D7.

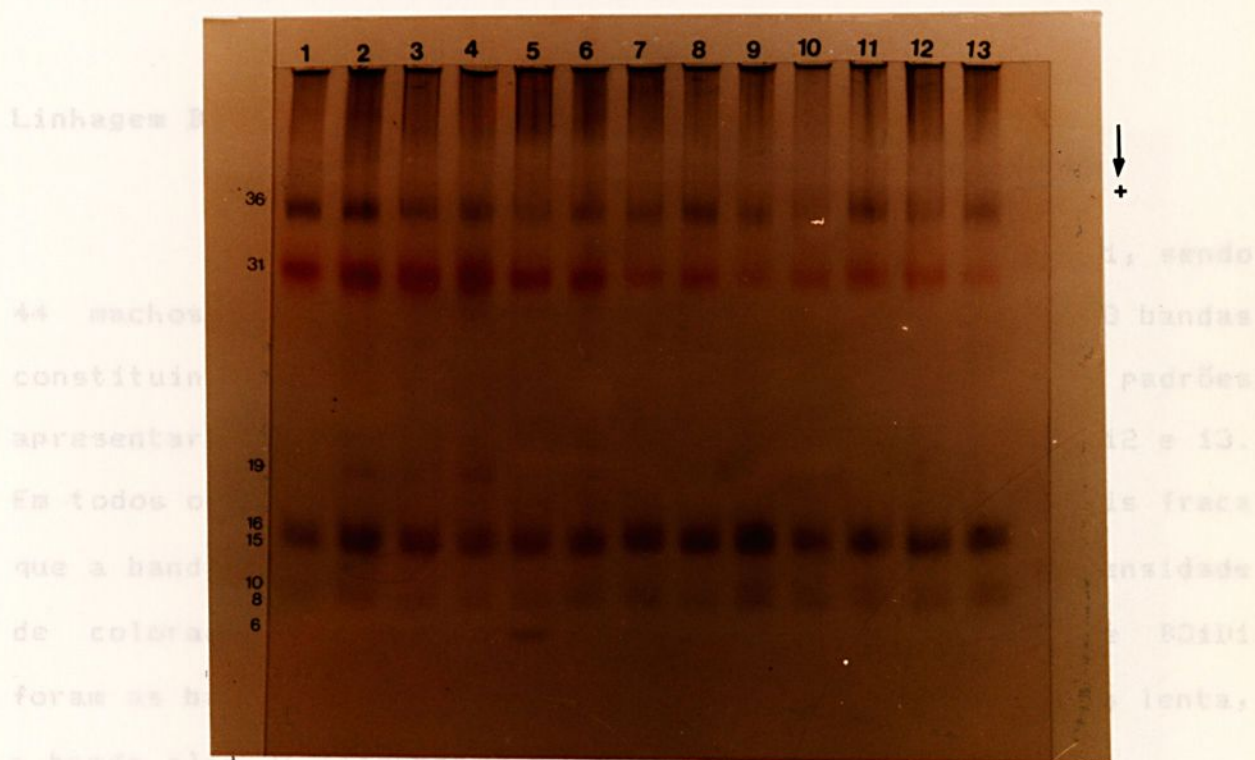


Figura 5. Padrões de esterases na linhagem B25D7. Colunas 1-7= machos, colunas 8-13= fêmeas.

Linhagem A55F11

Em A55F11, foram estudados 82 indivíduos (44 machos e 38 fêmeas) e detectados 26 padrões diferentes, envolvendo 14

Três esterases foram detectadas exclusivamente nos machos, em B25D7: as bandas alfa 19, 20 e 24, a primeira com frequência em torno de 70% e as duas outras, em torno de 15%. A banda 24 foi detectada nas outras linhagens (com exceção de Buz e B3iD1), ocorrendo tanto em machos como em fêmeas e em alta frequência, ao contrário de B25D7.

Linhagem B3iD1

Foram analisados 93 indivíduos da linhagem B3iD1, sendo 44 machos e 49 fêmeas. Nesta linhagem foram observadas 10 bandas constituindo 24 padrões diferentes. Todos os padrões apresentaram as bandas alfa-beta 7 e 8 e as bandas alfa 12 e 13. Em todos os padrões a banda 7 apresentou uma coloração mais fraca que a banda 8, e as bandas 12 e 13 apresentaram igual intensidade de coloração. Outras bandas frequentes nos padrões de B3iD1 foram as bandas alfa 23 e beta 31 e, com uma migração mais lenta, a banda alfa 36 (figuras 3 e 4).

Nesta linhagem foram encontradas cinco esterases ocorrendo apenas nos machos e com frequência superior a 10%, as quais podem ser visualizadas na amostra número 3 constituindo as bandas 30 e 37 e as bandas 22, 35 e 33, mais fracamente coradas. A banda 33 é a mais clara das três.

Linhagem A55F11

Em A55F11, foram estudados 82 indivíduos (44 machos e 38 fêmeas) e detectados 26 padrões diferentes, envolvendo 14



bandas de atividade esterásica.

A linhagem A55F11 apresentou, com maior frequência, as bandas alfa-beta 4, 5, 7, 8, 23 e 24, as alfa 12, 13 e 35 e a beta 31. Os machos de A55F11 apresentaram ainda as bandas 36 e 37, com frequência elevada (figuras 3 e 7).

Um comportamento interessante, no padrão desta linhagem, foi encontrado quanto às bandas 4, 5, 7 e 8. As bandas 4 e 5 ocorrem sempre juntas, sempre juntas, sempre juntas.

As bandas 7 e 8 ocorrem sempre juntas, sempre juntas, sempre juntas. As bandas 12 e 13 ocorrem sempre juntas, sempre juntas, sempre juntas. Os indivíduos eram um poço de um mare.

Linhagem B

machos e

esterásica

principais

bandas encontradas foram as alfa-beta 5, 7, 23 e 24,

esterases que correspondem às bandas alfa 36 e 37 e à banda beta 33 que pode ser vista nas amostras 2, 3 e 7 (figuras 8 e 9).

As bandas 12 e 13, da mesma maneira que nas linhagens

A55F11 e B31D1, encontraram-se sempre associadas. Já as bandas alfa-beta 5 e 7 apresentaram pouca diferença na velocidade de migração, causando dificuldade na sua definição.

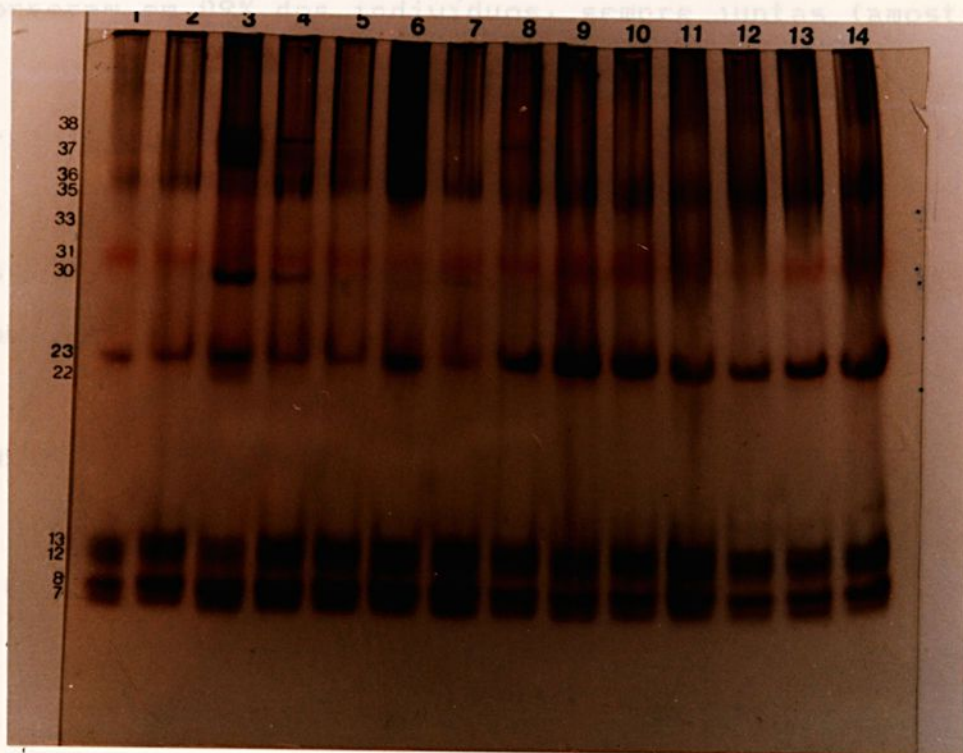


Figura 6. Padrões de esterases na linhagem B31D1. Colunas 1-7= machos, colunas 8-14= fêmeas.

bandas de atividade esterásica.

A linhagem A55F11 apresentou, com maior frequência, as bandas alfa-beta 4, 5, 7, 8, 23 e 24, as alfa 12, 13 e 36 e a beta 31. Os machos de A55F11 apresentaram ainda as bandas 30 e 37, com frequência elevada (figuras 3 e 7).

Um comportamento interessante, no padrão desta linhagem, foi encontrado quanto às bandas 4, 5, 7 e 8. As bandas 4 e 5 ocorreram em 89% dos indivíduos, sempre juntas (amostras 1 a 3 e 6 a 13), sendo a banda 4 mais clara que a 5; as bandas 7 e 8 ocorreram em 56,1%, também sempre juntas (amostras 3, 4, 5, 7, 12 e 13) tendo a banda 7 coloração mais fraca que a 8. Nos indivíduos que apresentaram as quatro bandas, estas geralmente eram um pouco menos coradas.

Linhagem B59Q1

Na linhagem B59Q1 foram estudados 70 indivíduos (37 machos e 33 fêmeas) e observadas 15 bandas com atividade esterásica, constituindo 37 padrões. Nesta linhagem, as principais bandas encontradas foram as alfa-beta 5, 7, 23 e 24, as alfa 12, 13 e 36 e a beta 31. Nos machos, ocorreram ainda as esterases que correspondem às bandas alfa 30 e 37 e à banda beta 33 que pode ser vista nas amostras 2, 3 e 7 (figuras 8 e 9).

As bandas 12 e 13, da mesma maneira que nas linhagens A55F11 e DC1D1, encontraram-se sempre associadas. Já as bandas alfa-beta 5 e 7 apresentaram pouca diferença na velocidade de migração, causando dificuldade na sua definição.



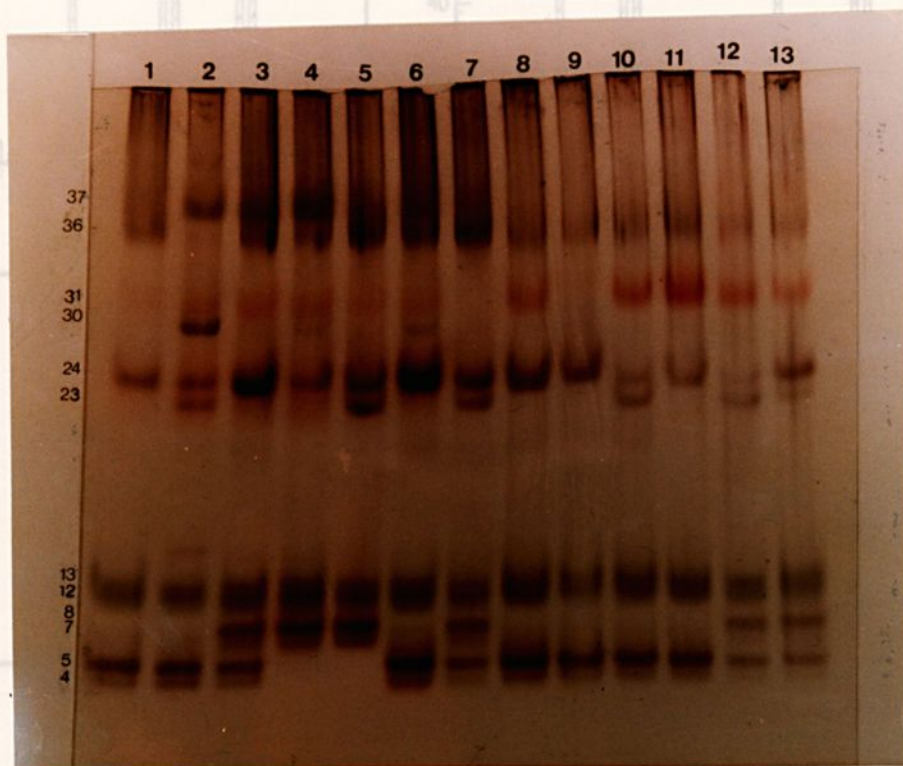


Figura 7. Padrões de esterases na linhagem A55F11. Colunas 1-7= machos, colunas 8-13= fêmeas.

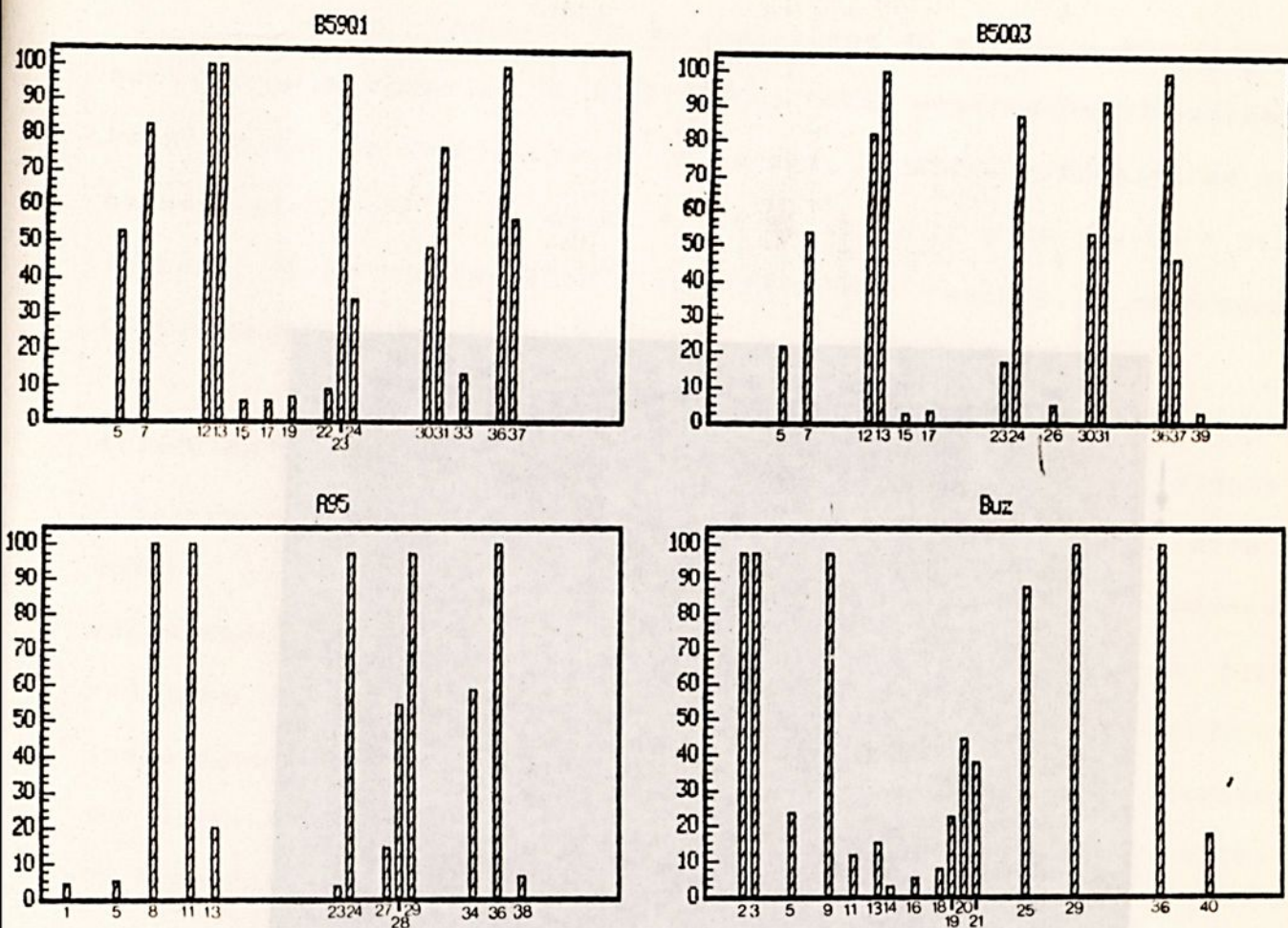


Figura 8. Distribuição das frequências (ordenada) das bandas (abscissa), nos indivíduos das linhagens B59Q1, B50Q3, A95 e Buz. As frequências das bandas que ocorreram só em um sexo foram calculadas sobre o número de indivíduos analisados, desse sexo.

Linhagem B59Q1

Nesta linhagem foram analisados 45 machos e 45 fêmeas perfazendo um total de 90 indivíduos. Foram observados 33 padrões resultantes da combinação de 14 bandas. Em B59Q1 predominaram as bandas alfa-beta 5, 7, 23 e 24, as alfa 12, 13 e 36 e a beta 31. Também foram detectadas somente nos machos, esterases correspondentes

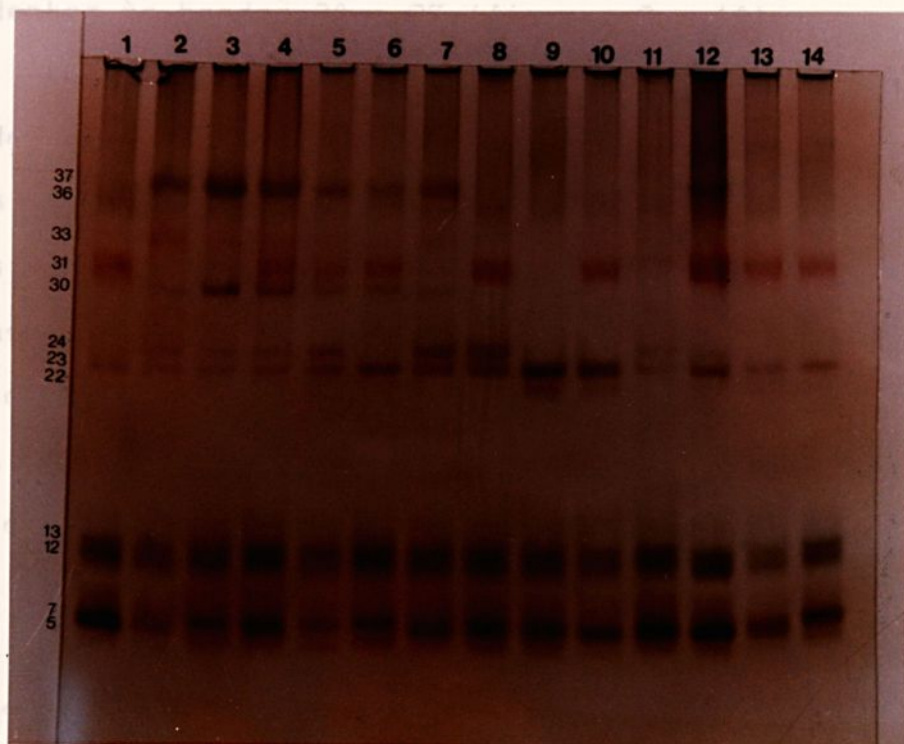


Figura 9. Padrões de esterases na linhagem B59Q1. Colunas 1-7 e 12= machos, colunas 8-11 e 12-14= fêmeas.

eram machos e 37, fêmeas. Foram encontrados 17 padrões diferentes e um total de 13 bandas, número este que constitui o menor detectado nas linhagens analisadas. As principais bandas de A95F3 foram as alfa-beta 8 e 24, as alfa 11, 34 e 36 e a beta 29. A banda alfa-beta 5 que pode ser observada nas amostras 7, 8 e 11, foi observada em poucos indivíduos (figuras 9 e 11).

Linhagem B50Q3

Nesta linhagem foram analisados 45 machos e 45 fêmeas perfazendo um total de 90 indivíduos. Foram observados 33 padrões resultantes da combinação de 14 bandas. Em B50Q3 predominaram as bandas alfa-beta 5, 7, 23 e 24, as alfa i2, i3 e 36 e a beta 3i. Também foram detectadas somente nos machos, esterases correspondentes às bandas 36 e 37 (figuras 8 e 10).

As bandas alfa-beta 5 e 7 também apresentaram a mesma dificuldade de definição que em B59Q1. Entretanto, alguns indivíduos apresentaram a banda 7 com padrão de banda alfa. Quanto às bandas i2 e i3, suas características foram as mesmas encontradas nas linhagens B3iD1, A55F1i e B59Q1, estando bem próximas e tendo igual intensidade de coloração. Contudo, alguns indivíduos apresentaram a banda i3 com uma coloração mais intensa que a i2, e 17,0% mostraram somente a banda i3. A banda 37, vista na amostra 9, foi encontrada somente nesta fêmea.

Linhagem A95F3

Figura 10. Em A95F3 foram estudados 87 indivíduos, dos quais 48 eram machos e 39, fêmeas. Foram encontrados 17 padrões diferentes e um total de 13 bandas, número este que constitui o menor detectado nas linhagens analisadas. As principais bandas de A95F3 foram as alfa-beta 8 e 24, as alfa i1, 34 e 36 e a beta 27. A banda alfa-beta 5 que pode ser observada nas amostras 7, 8 e 11, foi observada em poucos indivíduos (figuras 8 e 11).



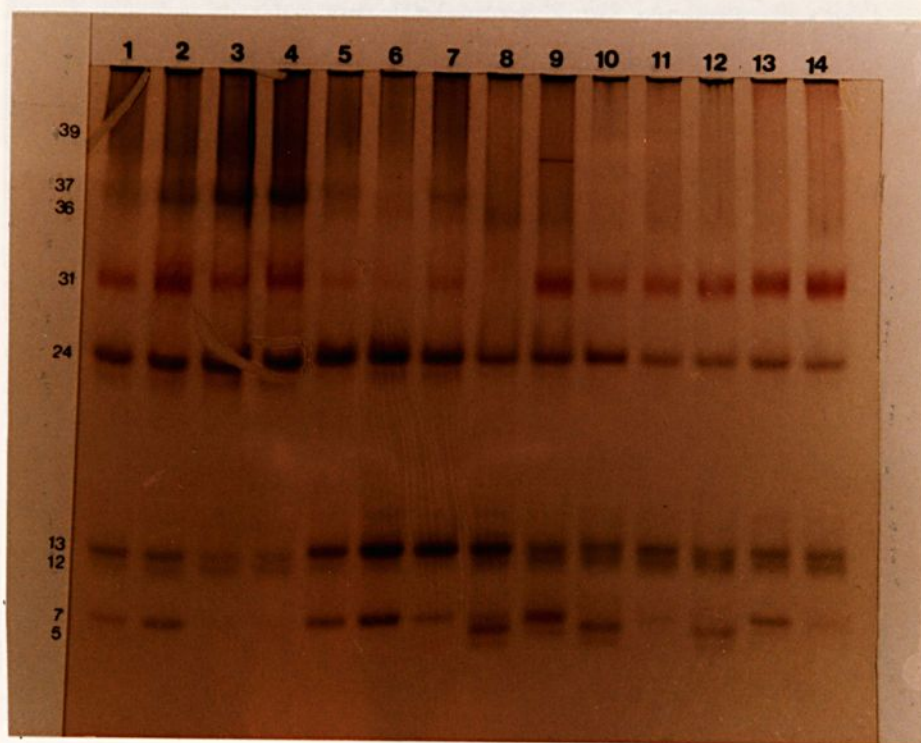


Figura 10. Padrões de esterases na linhagem B50Q3. Colunas 1-7= machos, colunas 8-14= fêmeas.

Alguns machos desta linhagem apresentaram ainda uma alfa-esterase, não detectada nas fêmeas, numerada como banda 28. Esta banda não está presente em nenhum macho da figura 11, mas pode ser vista na figura 13, que será analisada posteriormente.

Linhagem Buz

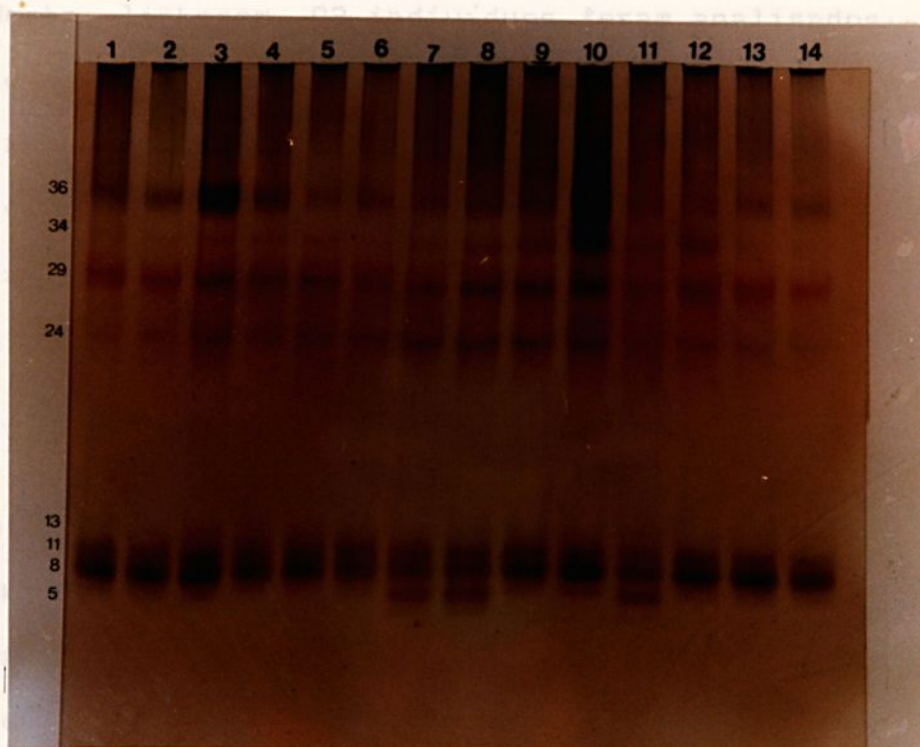


Figura 11. Padrões de esterases na linhagem A95F3. Colunas 1-7= machos, colunas 8-14= fêmeas.

As bandas alfa-beta 2 e 3, semelhantemente às bandas

A banda 7, apareceu em alguns indivíduos, acompanhada por outra mais clara, a banda 11, adquirindo um aspecto duplo, já observado em outras linhagens.

Alguns machos desta linhagem apresentaram ainda uma alfa-esterase, não detectada nas fêmeas, numerada como banda 28. Esta banda não está presente em nenhum macho da figura 11, mas pode ser vista na figura 13, que será analisada posteriormente.

Linhagem Buz

Nesta linhagem, 82 indivíduos foram analisados, sendo 42 machos e 40 fêmeas. Foram verificados 23 padrões e 16 bandas. As bandas mais frequentes foram as alfa-beta 2, 3 e 25, as alfa 7, 20, 21 e 36 e a beta 29 (figuras 9 e 12). Entre as bandas 9 e 19 ocorreram várias outras, pouco frequentes, que podem ser vistas nas amostras 3 e 5 da figura 12. Estas bandas foram as principais responsáveis pela variabilidade de padrões nesta linhagem.

A única banda observada apenas nos machos foi a banda 40, que apresentou uma frequência baixa de 16,7%, não estando presente em nenhuma amostra da figura 12. Em B20D2 esta mesma banda foi detectada em machos e fêmeas.

As bandas alfa-beta 2 e 3, semelhantemente às bandas alfa-beta 4 e 5 de B20D2 e 8 e 10 de B25D7, estiveram presentes sempre conjuntamente e com igual intensidade de coloração.

A banda 7, apareceu em alguns indivíduos, acompanhada por outra mais clara, a banda 11, adquirindo um aspecto duplo, já observado em outras linhagens.



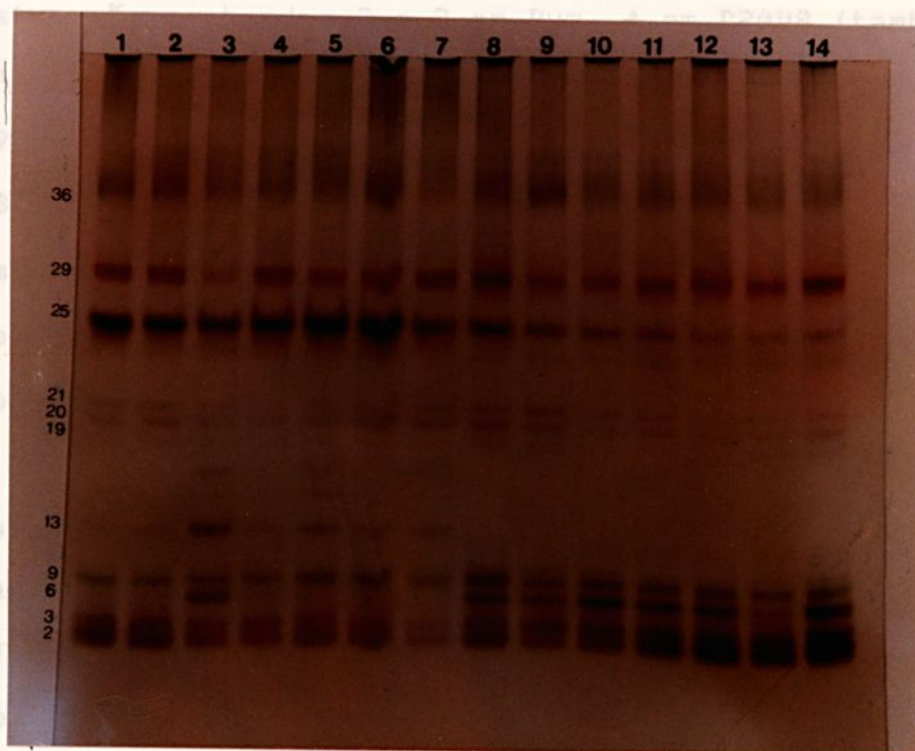


Figura 12. Padrões de esterases na linhagem Buz. Colunas 1-7= machos, colunas 8-14= fêmeas.

4. Variabilidade Interlinhagem dos Padrões de Esterases

A figura 13 apresenta, para fins de comparação, um gel contendo amostras de machos e fêmeas de todas as linhagens, exceto A55F11. Nesta figura, parte das descrições apresentadas separadamente pode ser vista em conjunto. Pode-se notar que todas as linhagens apresentaram bandas alfa-beta na região mais anódica do gel. Estas são as bandas 2 e 3 em Buz, 4 em B20D2 (também em B31D1 e A55F11, embora não mostrado na figura), 5 em B20D2, B31D1, B59Q1 e B50Q3 (também em A55F11 e A95F3), 7 em B31D1, B57Q1 e B50Q3 (também em A55F11), 8 em B25D7, B31D1 e A95F3 (também em A55F11) e 10 em B25D7, as quais formaram duplas na maioria dos casos, exceto nas linhagens B57Q1, B50Q3 e A95F3. Em seguida, observou-se, em todas as linhagens, uma ou duas bandas alfa que em B20D2 e B25D7 correspondem às bandas 15 e 16, em A95F3 à banda 11, em Buz à banda 9 e em B31D1, A55F11, B59Q1 e B50Q3 às bandas 12 e 13.

Todas as linhagens também apresentaram, na porção central do gel, bandas alfa-beta que frequentemente apresentaram uma coloração intensa, como pode ser visto, neste gel, nas linhagens A95F3 (banda 24), B31D1 (banda 23), Buz (banda 25) e no macho da linhagem B50Q3 (banda 24).

Após as bandas alfa-beta, em direção ao cátodo ocorreu, em todas as linhagens, uma banda beta que em Buz e A95F3 corresponde à banda 29 e nas demais linhagens à banda 31.

Esterases detectadas exclusivamente nos machos foram observadas em todas as linhagens e estão representadas, na figura 13, pelas bandas 19 em B20D2 e B25D7, 20 em B20D2, 30, 33 e 35 em



B31D1, 37 em B50Q3 e B59Q1 e 20 em A95T3.

A figura 14 apresenta a distribuição das bandas compartilhadas pelas linhagens analisadas. As bandas 19 e 36 foram compartilhadas por todas as linhagens. Seguiram-se as bandas 17 e 31 que só não foram observadas em A95T3 e Buz e a banda 24 não detectada apenas em B31D1 e Buz e a banda 5, exceto em Buz e B25D7.

As bandas 19 e 20 estiveram presentes nas linhagens

B20D2, B25

usada norma

alfa-naftil

portanto a

somente o

e 20 de Buz

em B20D2

evidenciando

A

compartilha

foram comp

11 e 30; por

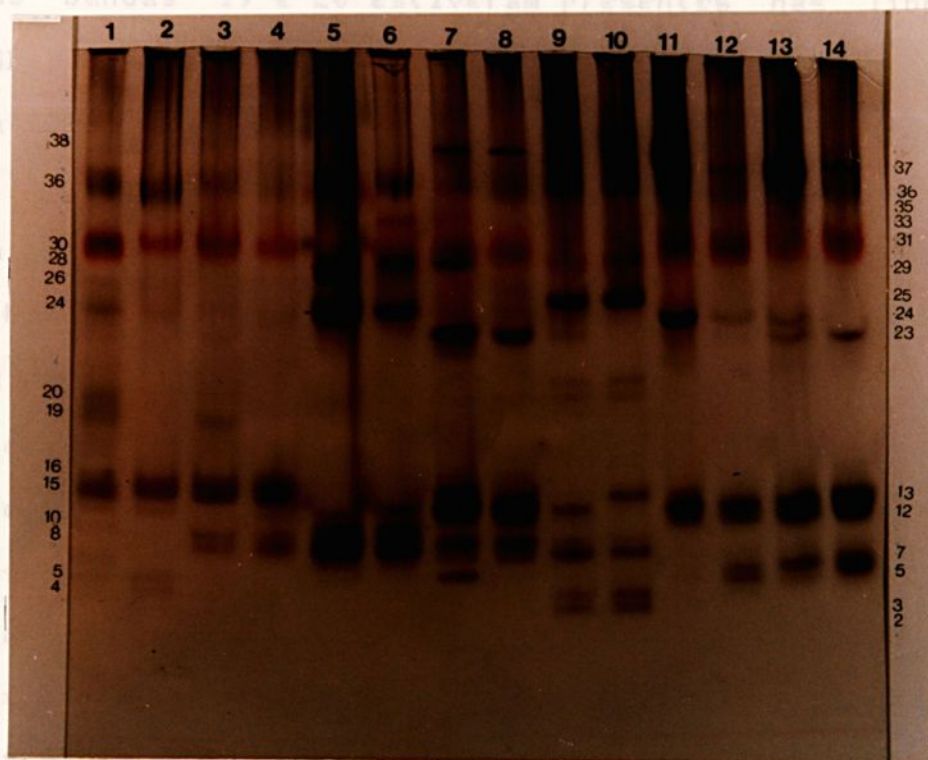


Figura 13. Padrões das linhagens para comparação. Sequências das linhagens nas colunas: 1 e 2= B20D2; 3 e 4= D25D7; 5 e 6= A95T3; 7 e 8= B31D1; 9 e 10= Buz; 11 e 12= B50Q3 e 13 e 14= B59Q1. A coluna da esquerda refere-se sempre aos machos e a da direita, às fêmeas.

padrão de compartilhamento foi bastante variável.

A figura 15 apresenta as bandas detectadas com exclusividade em uma só das linhagens, com as respectivas frequências. Nenhuma banda exclusiva foi detectada nas linhagens A95T3, B50Q3 e B59Q1.

B31D1, 37 em B50Q3 e B59Q1 e 28 em A95F3.

A figura 14 apresenta a distribuição das bandas compartilhadas pelas linhagens analisadas. As bandas 13 e 36 foram compartilhadas por todas as linhagens. Seguiram-se as bandas 17 e 31 que só não foram observadas em A95F3 e Buz e a banda 24 não detectada apenas em B31D1 e Buz e a banda 5, exceto em Buz e B25D7.

As bandas 19 e 20 estiveram presentes nas linhagens B20D2, B25D7 e Buz. Essas bandas na concentração de substrato usada normalmente para coloração (30 mg de beta-naftil e 40 mg de alfa-naftil) não mostraram diferenças de coloração, apresentando, portanto a mesma numeração. Entretanto, no experimento em que somente o beta-naftil foi usado na solução corante, as bandas 19 e 20 de Buz hidrolisaram esse substrato, diferindo destas bandas em B20D2 e B25D7 que não apresentaram a mesma capacidade, evidenciando tratar-se de enzimas diferentes.

As bandas 1, 6, 11, 18, 22, 27, 33 e 40 foram compartilhadas por apenas duas linhagens. Entre elas, a 22 e a 33 foram compartilhadas pelas linhagens B31D1 e B59Q1, e as bandas 11 e 30, por A95F3 e Buz.

As bandas 7, 12, 30 e 37 foram as únicas compartilhadas exclusivamente pelas linhagens B31D1, A55F11, B59Q1 e B50Q3.

Quanto às demais bandas, pode-se considerar que o padrão de compartilhamento foi bastante variável.

A figura 15 apresenta as bandas detectadas com exclusividade em uma só das linhagens, com as respectivas frequências. Nenhuma banda exclusiva foi detectada nas linhagens A55F11, B50Q3 e B59Q1.



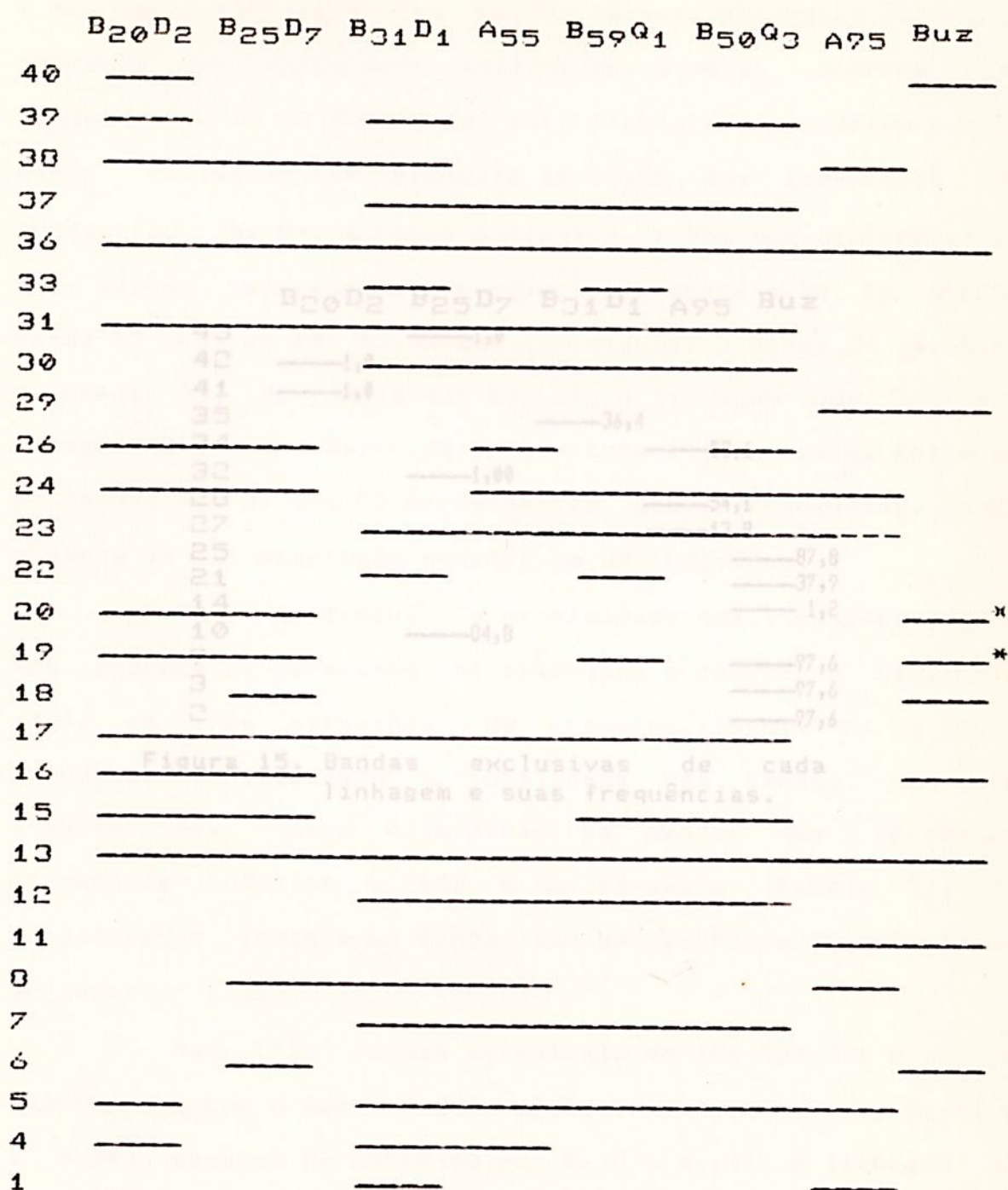


Figura 14. Distribuição das bandas compartilhadas, nas linhagens analisadas. Asteriscos indicam bandas com mesma migração, mas com resposta diferencial às soluções de coloração (ver texto).

A linhagem B20D2 apresentou duas bandas exclusivas, 41 e 42, ambas com frequência baixa, estando presentes em apenas um por cento dos indivíduos analisados. O mesmo ocorreu com as bandas 43 e 32 de B25D7, mas esta linhagem apresentou também a banda exclusiva 10, presente em 04,0% dos indivíduos. B31D1

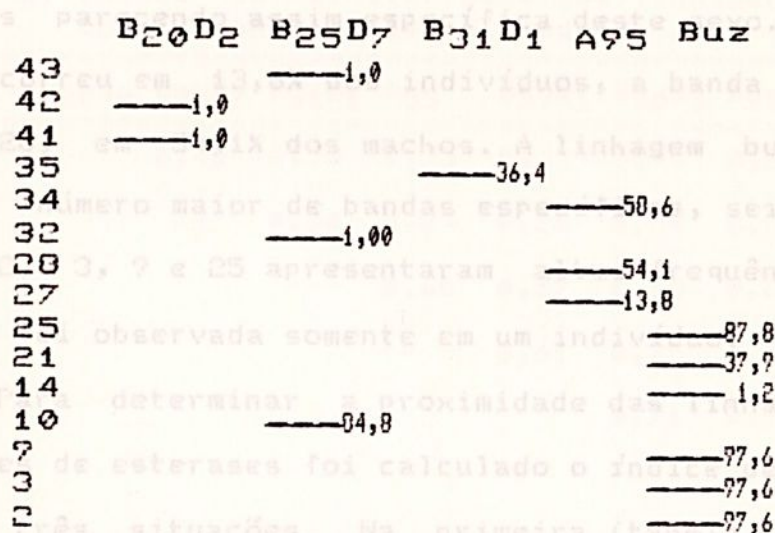


Figura 15. Bandas exclusivas de cada linhagem e suas frequências.

(tabela 4), foram eliminadas as bandas que apresentaram frequência inferior a 10% e na terceira (tabela 5), foram consideradas somente as bandas que apresentaram frequência igual ou superior a 30%.

Nas três formas de cálculo do IS, Buz foi a linhagem que apresentou o menor índice médio (respectivamente, 0,14, 0,13 e 0,08) seguida de A95F3 (0,23, 0,18 e 0,15). A linhagem B20D2 apresentou o índice médio seguinte, em escala crescente (0,33, 0,26 e 0,22), intermediário entre B25D7 (0,31, 0,24 e 0,17) e B31D1 (0,37, 0,31 e 0,29), mas mais próxima da primeira do que desta última. As linhagens A55F11 (0,42, 0,41 e 0,39), B5901 (0,40, 0,39 e 0,30) e B5063 (0,43, 0,33 e 0,37) apresentaram, nas

A linhagem B20D2 apresentou duas bandas exclusivas, 41 e 42, ambas com frequência baixa, estando presentes em apenas um por cento dos indivíduos analisados. O mesmo ocorreu com as bandas 43 e 32 de B25D7, mas esta linhagem apresentou também a banda exclusiva 10, presente em 34,0% dos indivíduos. B31D1 apresentou uma única banda exclusiva, a 35, que ocorreu em 36,4% dos machos parecendo assim específica deste sexo. Em A95F3, a banda 27 ocorreu em 13,8% dos indivíduos, a banda 34 em 58,6%, e a banda 23, em 54,1% dos machos. A linhagem buz foi a que apresentou número maior de bandas específicas, seis. Entre elas, as bandas 2, 3, 7 e 25 apresentaram altas frequências, enquanto a banda 14 foi observada somente em um indivíduo.

Para determinar a proximidade das linhagens com base nos padrões de esterases foi calculado o índice de Similaridade (IS), em três situações. Na primeira (tabela 3) o IS foi calculado considerando a totalidade das bandas. Na segunda (tabela 4), foram eliminadas as bandas que apresentaram frequência inferior a 10% e na terceira (tabela 5), foram consideradas somente as bandas que apresentaram frequência igual ou superior a 30%.

Nas três formas de cálculo do IS, Buz foi a linhagem que apresentou o menor índice médio (respectivamente, 0,14, 0,13 e 0,08) seguida de A95F3 (0,23, 0,18 e 0,15). A linhagem B20D2 apresentou o índice médio seguinte, em escala crescente (0,33, 0,26 e 0,22), intermediário entre B25D7 (0,31, 0,24 e 0,19) e B31D1 (0,37, 0,31 e 0,29), mas mais próxima da primeira do que desta última. As linhagens A55F11 (0,42, 0,41 e 0,39), B59Q1 (0,40, 0,39 e 0,33) e B50Q3 (0,43, 0,33 e 0,37) apresentaram, nas



Tabela 3. índice de similaridade das linhagens analisadas, considerando todas as bandas.

	B20D2	B25D7	B31D1	A55	B59Q1	B50Q3	A95	Buz	média
B20D2	---	0,48	0,30	0,35	0,33	0,41	0,20	0,22	0,33
B25D7		---	0,30	0,29	0,28	0,29	0,25	0,27	0,31
B31D1			---	0,60	0,57	0,52	0,24	0,06	0,37
A55				---	0,61	0,75	0,29	0,07	0,42
B59Q1					---	0,71	0,22	0,11	0,40
B50Q3						---	0,23	0,07	0,43
A95							---	0,16	0,23
Buz								---	0,14

Tabela 4. índice de similaridade das linhagens analisadas, considerando as bandas que apresentaram frequência igual ou superior a 10%.

	B20D2	B25D7	B31D1	A55	B59Q1	B50Q3	A95	Buz	média
B20D2	---	0,47	0,13	0,32	0,32	0,27	0,10	0,19	0,26
B25D7		---	0,16	0,23	0,23	0,19	0,20	0,17	0,24
B31D1			---	0,56	0,56	0,53	0,16	0,08	0,31
A55				---	0,71	0,71	0,23	0,09	0,41
B59Q1					---	0,71	0,16	0,05	0,39
B50Q3						---	0,10	0,10	0,38
A95							---	0,23	0,18
Buz								---	0,13

três tabelas, valores mais próximos entre si do que de qualquer das demais linhagens, especialmente nas tabelas 4 e 5. Pode-se observar que a tabela 3 é a que apresenta as diferenças de índices eidos mencionadas de forma mais nítida.

Aplicada a Análise de Dependência (ANADEP) considerando as 20 bandas mais frequentes verificou-se que as comparações

Tabela 5. índice de similaridade das linhagens analisadas, considerando as bandas que apresentaram frequência igual ou superior a 30%.

	B20D2	D25D7	B31D1	A55	D57Q1	B50Q3	A95	Buz	média
B20D2	---	0,41	0,11	0,31	0,25	0,20	0,13	0,12	0,22
B25D7		---	0,21	0,20	0,13	0,15	0,16	0,07	0,19
B31D1			---	0,50	0,53	0,50	0,13	0,06	0,29
A55				---	0,75	0,73	0,20	0,05	0,39
D57Q1					---	0,80	0,13	0,06	0,38
B50Q3						---	0,15	0,07	0,37
A95							---	0,15	0,15
Buz								---	0,08

FT2, que explica 18,6% da dependência total, mostra a dissimilaridade entre os grupos de linhagens vistas através das bandas (e das bandas vistas através das linhagens).

Comparando os resultados obtidos pela Análise de Dependência com os índices Médios de Similaridade, a diferença obtida é que a primeira agrupa B31D1 junto com A55F11, B57Q1 e B50Q3 e a segunda permite separar aquela linhagem destas. Considerando, porém, os valores de IC individuais e não suas médias, pode-se observar que os maiores valores estão de fato nas comparações entre B31D1, A55F11, B57Q1 e B50Q3, o que reforça os dados da ANADEP.

três tabelas, valores mais próximos entre si do que de qualquer das demais linhagens, especialmente nas tabelas 4 e 5. Pode-se observar que a tabela 5 é a que apresenta as diferenças de índices médios mencionadas de forma mais nítida.

Aplicada a Análise de Dependência (ANADEP) considerando as 20 bandas mais frequentes verificou-se que as comparações linhagens X bandas esterásicas apresentou a mesma relação de proximidade ou separação das linhagens, tanto no gráfico FT1 X FT2, como FT1 X FT3 e FT2 X FT3. Por esta razão, apresentamos apenas a figura correspondente à comparação dos fatores FT1 X FT2 (figura 16).

Os fatores FT1, FT2 e FT3, explicam 76,8% da dependência das linhagens em relação ao perfil marginal. Os fatores FT1 e FT2, são fatores de contraposição de linhagens. FT1 explica 36,5% e permite a visualização da separação de B20D2, B25D7 e A95F3 das demais linhagens e FT2, que explica 21,7%, permite ver a separação de A95F3 e Buz de B20D2 e B25D7. O fator FT3, que explica 18,6% da dependência total, mostra a dissimilaridade entre os grupos de linhagens vistas através das bandas (e das bandas vistas através das linhagens).

Comparando os resultados obtidos pela Análise de Dependência com os índices Médios de Similaridade, a diferença obtida é que a primeira agrupa B3iD1 junto com A55Fii, B59Q1 e B50Q3 e a segunda permite separar aquela linhagem destas. Considerando, porém, os valores de IS individuais e não suas médias, pode-se observar que os maiores valores estão de fato nas comparações entre B3iD1, A55Fii, B59Q1 e B50Q3, o que reforça os dados da ANADEP.



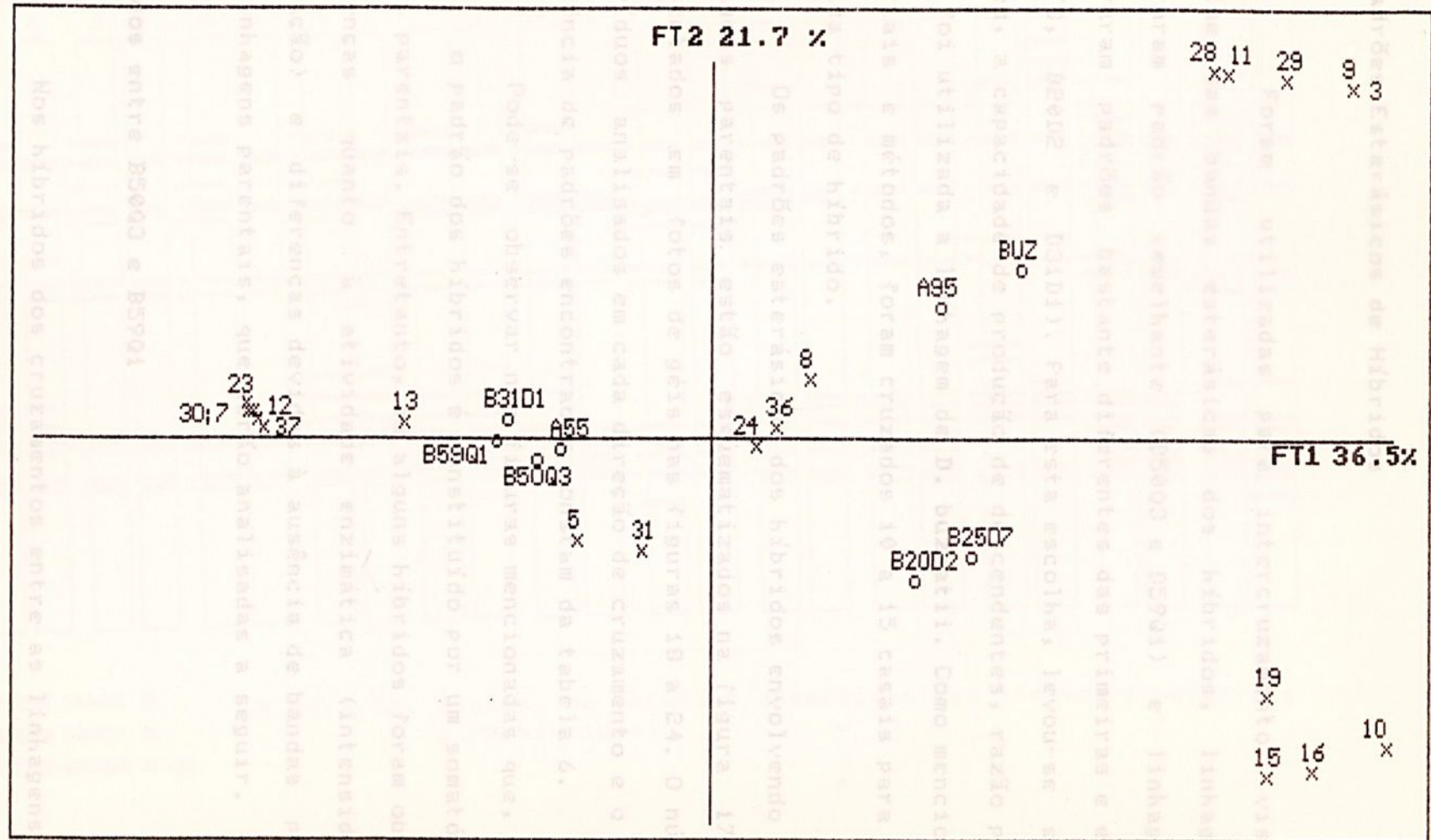


Figura 16. ANADEP - Linhagens e bandas esterásicas em FT1xFT2 (58,2%). As linhagens estão representadas por (o) e as bandas por (x). (ver apêndice)

4. Padrões Esterásicos de Híbridos

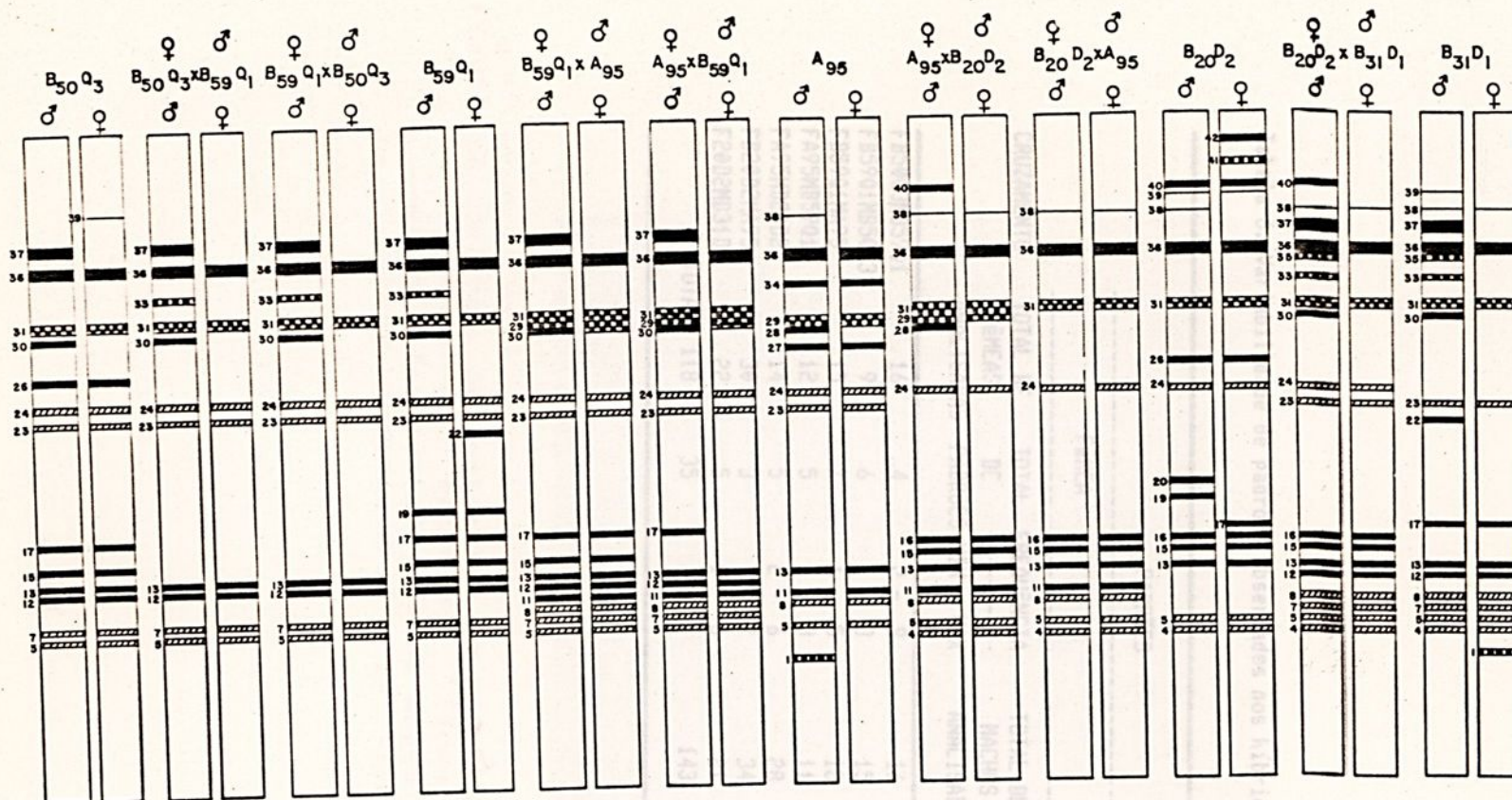
Foram utilizadas para intercruzamento, visando à análise das bandas esterásicas dos híbridos, linhagens que mostraram padrão semelhante (B50Q3 e B59Q1) e linhagens que mostraram padrões bastante diferentes das primeiras e entre si (A95F3, B20D2 e D3iD1). Para esta escolha, levou-se em conta também, a capacidade de produção de descendentes, razão pela qual não foi utilizada a linhagem de *D. buzzatii*. Como mencionado em materiais e métodos, foram cruzados 10 a 15 casais para obtenção de cada tipo de híbrido.

Os padrões esterásicos dos híbridos envolvendo as cinco linhagens parentais estão esquematizados na figura 17 e são apresentados em fotos de géis nas figuras 18 a 24. O número de indivíduos analisados em cada direcção de cruzamento e o número e frequência de padrões encontrados constam da tabela 6.

Pode-se observar nas figuras mencionadas que, de modo geral, o padrão dos híbridos é constituído por um somatório das bandas parentais. Entretanto, em alguns híbridos foram observadas diferenças quanto à atividade enzimática (intensidade de coloração) e diferenças devidas à ausência de bandas presentes nas linhagens parentais, que serão analisadas a seguir.

Híbridos entre B50Q3 e B59Q1

Nos híbridos dos cruzamentos entre as linhagens B50Q3 e B59Q1 (figuras 17 a 19), a banda 17, presente em ambas as linhagens parentais, não foi detectada em nenhum dos 56 híbridos



 BANDA β
 BANDA α
 BANDA α-β

Figura 17. Bandas de esterase observadas nas linhagens parentais e em híbridos.

Tabela 6. Variabilidade de padrões observados nos híbridos

CRUZAMENTO	PADRÕES					
	FÊMEA			MACHO		
	TOTAL DE	TOTAL	FREQUÊNCIA	TOTAL DE	TOTAL	FREQUÊNCIA
	FÊMEAS	DE	-----	MACHOS	DE	-----
	ANALISADAS	PADRÕES	MIN - MAX	ANALISADOS	PADRÕES	MIN - MAX
FB50Q3MB59Q1	16	4	2 - 9	16	9	1 - 9
FB59Q1MB50Q3	9	6	1 - 3	15	9	1 - 3
FB59Q1MA95	15	7	1 - 5	18	13	1 - 4
FA95MB59Q1	12	5	1 - 3	11	7	1 - 4
FA95MD20D2	14	5	2 - 6	28	10	1 - 8
FB20D2MA95	30	3	1 - 17	34	3	2 - 17
F20D2MD31D1	22	5	1 - 6	21	12	1 - 3
TOTAL	118	35		143	63	

Figura 10. Padrões de esterasas de parentais e híbridos. B59Q1 (colunas 1 - macho e 2 - fêmea); B50Q3 (colunas 3 - macho e 4 - fêmea); fêmeas B50Q3 X machos B59Q1 (5 a 9 machos híbridos e 10 a 14 fêmeas híbridas).

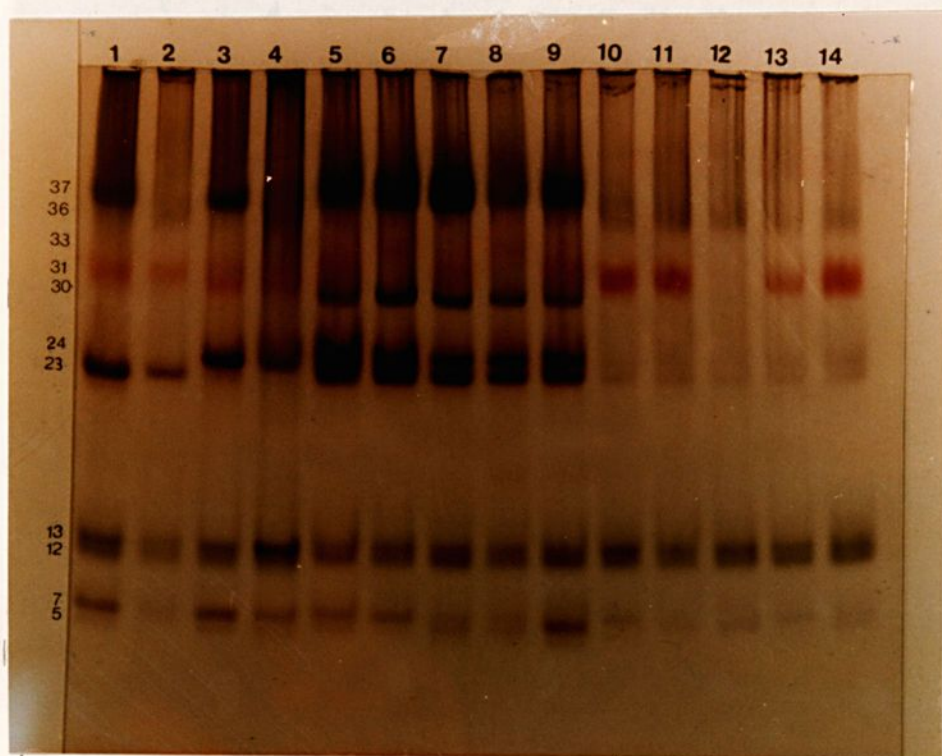


Figura 19. Padrões de esterases de parentais e híbridos. B59Q1

Figura 18. Padrões de esterases de parentais e híbridos. B59Q1 (colunas 1 - macho e 2 - fêmea); D50Q3 (colunas 3 - macho e 4 - fêmea); fêmeas B50Q3 X machos B59Q1 (5 a 7 machos híbridos e 10 a 14 fêmeas híbridas).

analisados, nas duas direções de cruzamento. Também as bandas 19 e 22 (presentes em B59Q1) e 23 (presente em B50Q3) não foram observadas nos híbridos. Contudo deve-se ressaltar que as quatro bandas mencionadas apareceram, nas linhagens parentais, com frequências entre 3 e 10%.

As bandas 23 e 24, presentes em fêmeas e machos das

linhagens parentais e nos machos

parentais

porém, em

apenas em

atividade no

Híbridos ent

No

17, 20 e

observadas

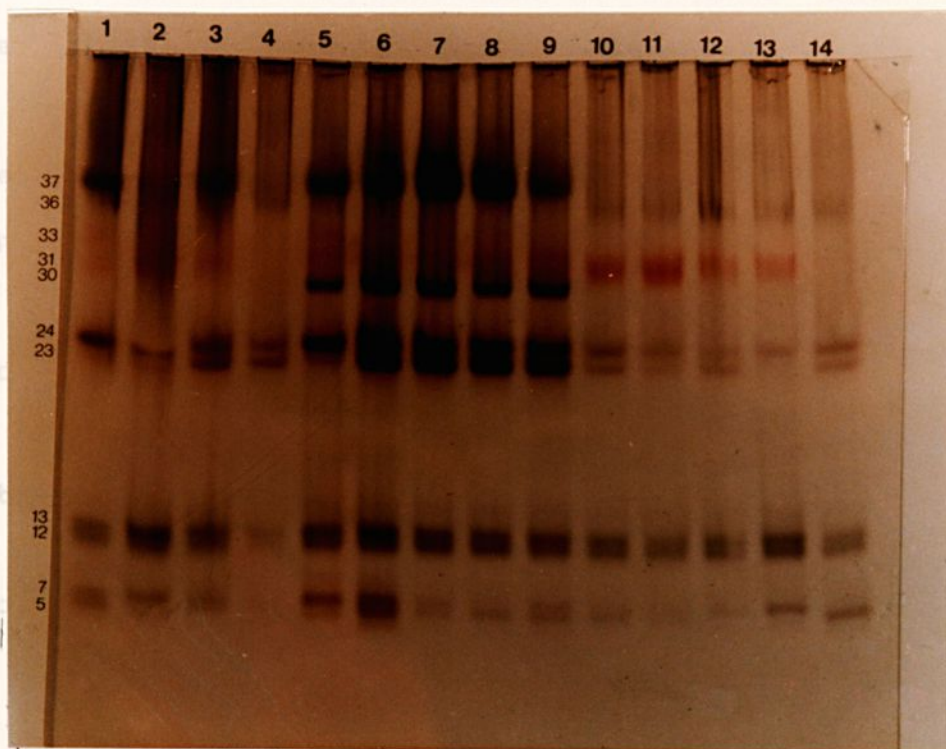


Figura 19. Padrões de esterases de parentais e híbridos. B50Q3 (colunas 1- macho e 2- fêmea); B59Q1 (colunas 3- macho e 4- fêmea); fêmeas B59Q1 X machos B50Q3 (5 a 9 machos híbridos e 10 a 14- fêmeas híbridas).

que as das bandas mencionadas anteriormente, respectivamente 13,8 e 30,6%. Há porém a possibilidade de não terem sido detectadas nos híbridos devido à sua baixa atividade já na linhagem parental.

A banda 37, observada apenas nos machos da linhagem B59Q1, manifestou-se da mesma maneira nos híbridos das duas direções de cruzamento, reforçando a idéia de uma especificidade

analisados, nas duas direções de cruzamento. Também as bandas 19 e 22 (presentes em B59Q1) e 26 (presente em B50Q3) não foram observadas nos híbridos. Contudo deve-se ressaltar que as quatro bandas mencionadas apareceram, nas linhagens parentais, com frequências entre 3 e 10%.

As bandas 23 e 24, presentes em fêmeas e machos das linhagens parentais, mostraram constantemente uma maior atividade nos machos híbridos do que nas fêmeas híbridas. Nas linhagens parentais essa maior atividade foi também observada nos machos, porém, em poucos indivíduos. Também as bandas 30 e 37, presentes apenas em machos parentais e machos híbridos, mostraram maior atividade nos últimos.

Híbridos entre B59Q1 e A95F3

Nos híbridos entre as linhagens B59Q1 e A95F3 (figuras 17, 20 e 21) não foram observadas as bandas 30 e 1 (ambas observadas em A95F3) e 19 e 22 (observadas em B59Q1), as quais também ocorreram nas linhagens parentais com frequências inferiores a 10%. Também não foram observadas, nos híbridos, as bandas 27 e 34, presentes em A95F3 com frequência mais elevada que as das bandas mencionadas anteriormente, respectivamente 13,8 e 50,6%. Há porém a possibilidade de não terem sido detectadas nos híbridos devido à sua baixa atividade já na linhagem parental.

A banda 37, observada apenas nos machos da linhagem B59Q1, manifestou-se da mesma maneira nos híbridos das duas direções de cruzamento, reforçando a idéia de uma especificidade



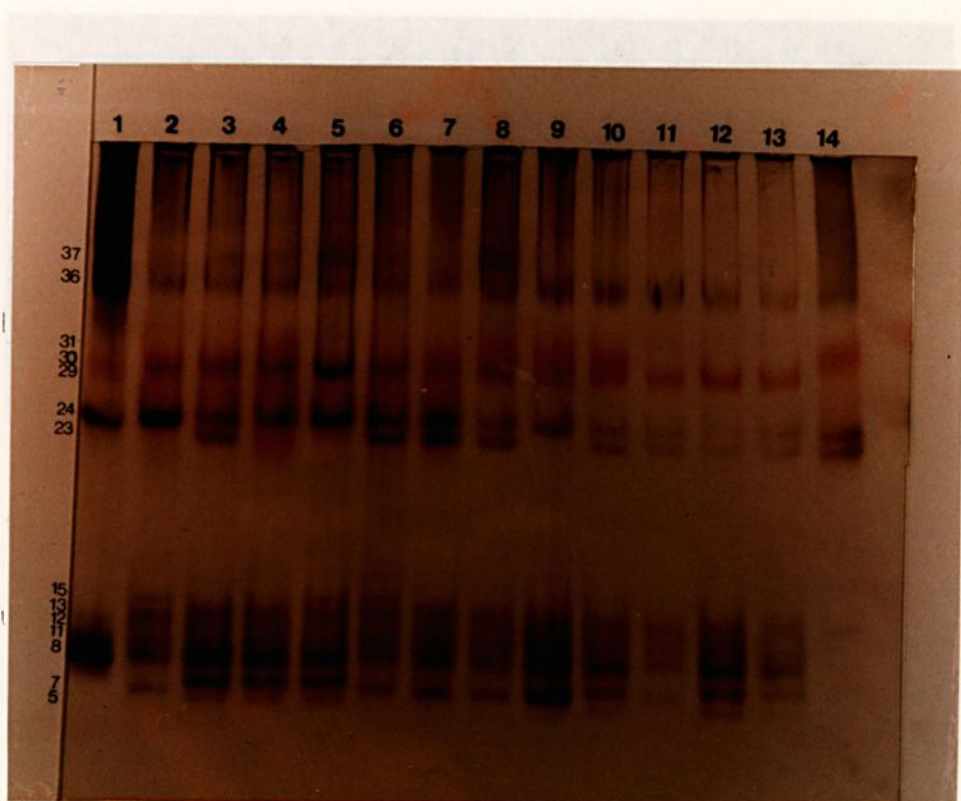


Figura 20. Padrões de esterases de parentais e híbridos. B59Q1 (coluna 1- macho); A95F3 (coluna 2- macho); fêmeas D59Q1 X machos A95F3 (colunas 3 a 8- machos e colunas 9 a 13- fêmeas); B59Q1 (coluna 14- machos).

para os machos.

A banda 28, observada em A95F3 não foi visualizada nos híbridos, havendo porém a possibilidade de não ter sido identificada por estar muito próxima da banda 30.

Como observado no cruzamento anterior, os machos híbridos destes cruzamentos apresentaram um reforço na coloração das bandas

Híbridos em

não foram

quatro ban

apareceram

valor, pas

(A95F3) e

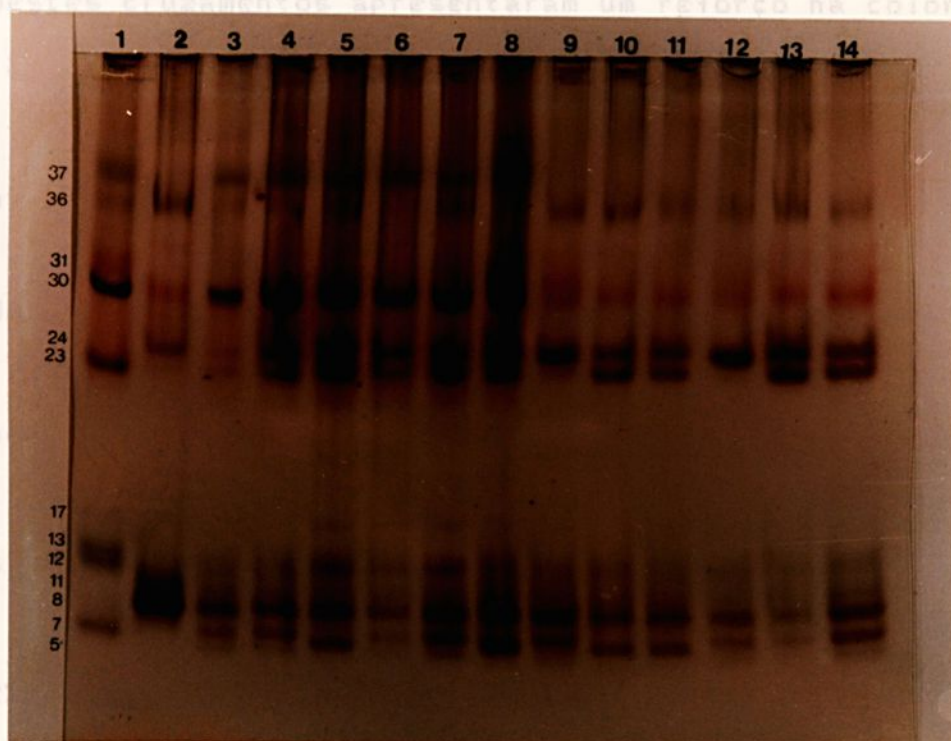
(B20D2) e

mais elevadas, principalmente as 26 e 34 (respectivamente, 30,7 e

Figura 21. Padrões de esterases de parentais e híbridos. B59Q1 (Coluna 1- macho); A95F3 (coluna 2- macho); fêmeas A95F3 X machos B59Q1 (colunas 3 a 8- machos e colunas 9 a 14- fêmeas).

destacar, porém, o que ocorre com as bandas 19 e 26, encontradas exclusivamente em machos da linhagem B20D2; com uma frequência de 70% e que não foram detectadas nos híbridos analisados.

Deve-se ressaltar também, o comportamento das bandas 20 e 29 presentes em A95F3. A banda 28, exclusiva dos machos A95F3, onde esteve presente com frequência de 50%, foi observada apenas em machos híbridos da direção fêmea A95F3 x macho B20D2, mas não nos cruzamentos recíprocos. A banda 27, altamente frequente



para os machos.

A banda 28, observada em A95F3 não foi visualizada nos híbridos, havendo porém a possibilidade de não ter sido identificada por estar muito próxima da banda 30.

Como observado no cruzamento anterior, os machos híbridos destes cruzamentos apresentaram um reforço na coloração das bandas 23 e 24.

Híbridos entre A95F3 e B20D2

Nos híbridos de A95F3 com B20D2 (figuras 17, 22 e 23) não foram detectadas oito bandas presentes somente em B20D2 e quatro bandas presentes apenas em A95F3. Algumas dessas bandas apareceram com frequências inferiores a 10% ou próximas desse valor, nas linhagens parentais. É o caso das bandas 1 e 23 (A95F3) e das bandas 17, 37, 41 e 42 (B20D2). As bandas 26 (B20D2) e 27 e 34 (A95F3) são bandas que apresentaram frequências mais elevadas, principalmente as 26 e 34 (respectivamente, 52,9 e 50,6%), mas que têm baixa atividade nas linhagens parentais podendo ter passado despercebidas nos híbridos. Vale a pena destacar, porém, o que ocorre com as bandas 19 e 20, encontradas exclusivamente em machos da linhagem B20D2, com uma frequência de 90% e que não foram detectadas nos híbridos analisados.

Deve-se ressaltar também, o comportamento das bandas 28 e 29 presentes em A95F3. A banda 28, exclusiva dos machos A95F3, onde esteve presente com frequência de 50%, foi observada apenas em machos híbridos da direção fêmea A95F3 com macho B20D2, mas não nos cruzamentos recíprocos. A banda 29, altamente frequente



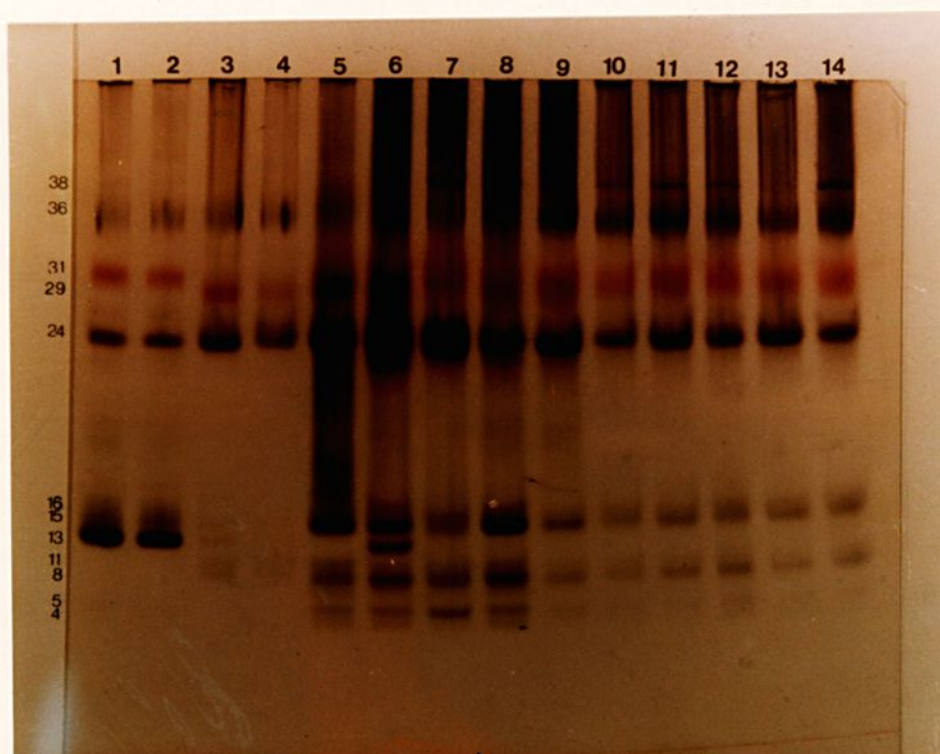


Figura 22. Padrões de esterases de parentais e híbridos. B20D2 (Colunas 1 e 2- machos); A95F3 (colunas 3 e 4- machos); fêmeas A95F3 X machos B20D2 (colunas 5 a 9- machos e colunas 10 a 14- fêmeas).

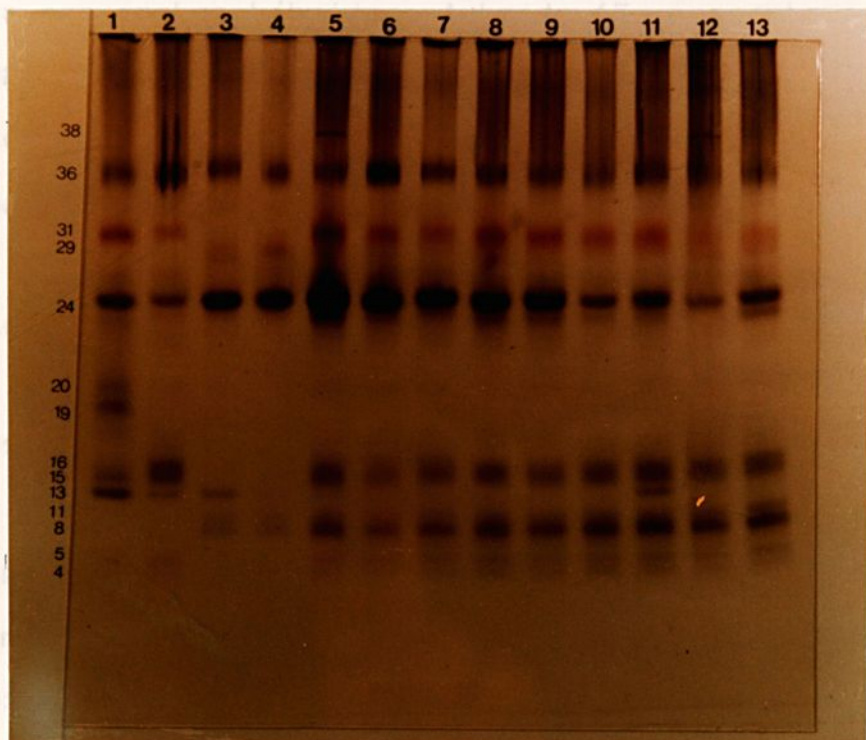


Figura 23. Padrões de esterases de parentais e híbridos. B20D2 (Colunas 1- machos e 2- fêmea); A95F3 (colunas 3- macho e 4- fêmea); fêmeas B20D2 X machos A95F3 (colunas 5 a 7- machos e colunas 10 a 13- fêmeas).

em ambos os sexos da linhagem A95F3 (78%), também foi detectada apenas no cruzamento entre fêmea A95F3 e macho B20D2, nos descendentes de ambos os sexos.

Ainda nos mesmos híbridos, quanto às diferenças de atividade, observamos que a banda 24, presente nas duas linhagens parentais e nos híbridos obtidos nas duas direções, mostrou-se mais corada nos machos híbridos. A banda 15, presente apenas na linhagem B20D2 e nos híbridos das duas direções de cruzamento, também mostrou maior atividade em alguns machos híbridos da direção fêmea A95F3 com macho B20D2.

Híbridos entre B20D2 e B31D1

Os híbridos entre as linhagens B20D2 e B31D1 que são obtidos em uma só direção de cruzamento (fêmea B20D2 com machos B31D1) (figura 17 e 24) não apresentaram sete das bandas presentes nas linhagens parentais. Entre elas, as bandas 1 (B31D1), 41 e 42 (B20D2) 17 e 39 (ambas as linhagens) podem não ter sido encontradas nos híbridos por estarem presentes, nas linhagens parentais, com frequências próximas ou inferiores a 10%.

A banda 22, encontrada apenas nos machos da linhagem B31D1, com frequência próxima de 35% e a banda 26 que ocorre na linhagem B20D2 com frequência próxima de 55%, podem não ter sido detectadas nos híbridos devido à sua baixa atividade na linhagem parental. As bandas 30 e 37 (bandas alfa, encontradas nos machos da linhagem B31D1) 33 e 35 (bandas beta, encontradas nos machos da mesma linhagem), também estiveram presentes exclusivamente nos



machos híbridos.

Nos híbridos de B20D2 com B31D1 observou-se uma maior atividade da banda 13, evidenciada principalmente nas fêmeas da figura 24. Na mesma figura pode-se observar que os machos apresentam uma maior atividade quanto às bandas 23 e 24.

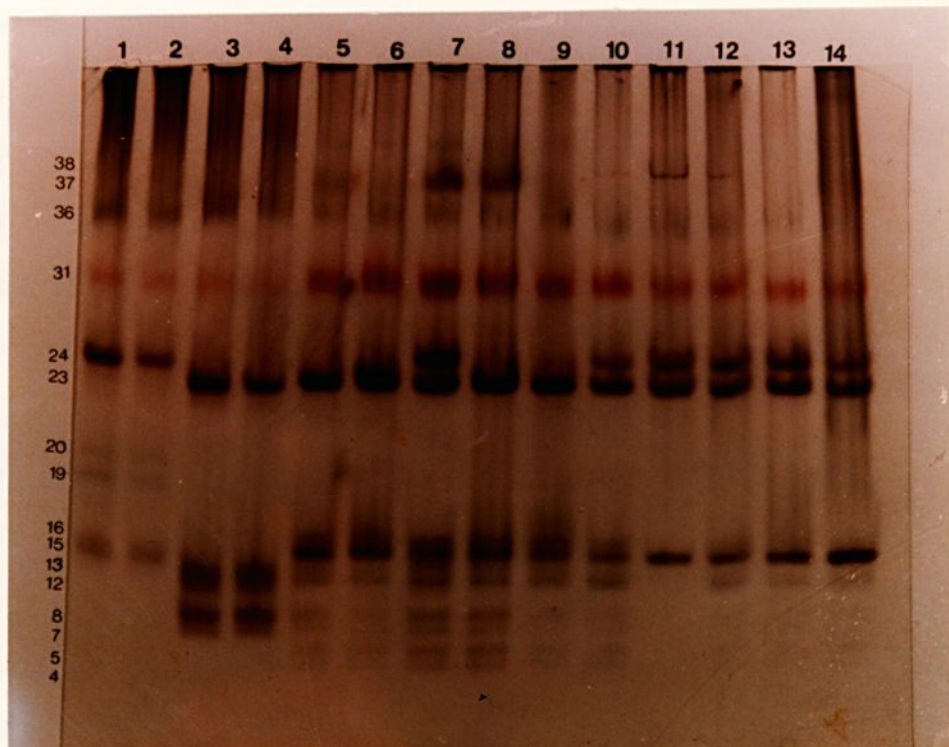


Figura 24. Padrões de esterases de parentais e híbridos. B20D2 (Colunas 1 e 2- machos); B31D1 (colunas 3 e 4- machos); fêmeas B20D2 X machos B31D1 (colunas 5 a 9- machos e colunas 10 a 14- fêmeas).

machos híbridos.

Nos híbridos de D20D2 com B31D1 observou-se uma maior atividade da banda 15, evidenciada principalmente nas fêmeas da figura 24. Na mesma figura pode-se observar que os machos apresentam uma maior atividade quanto às bandas 23 e 24. EWONTIN, 1966, para *D. pseudobscura*; JOHNSON et al., 1966, para 76 espécies de vários grupos; BARKER e MULLEY, 1974, para *D. buzzatii*; CARRASCO et al., 1974, para *D. dunni*; e CERON, 1988 para *D. mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos).

O presente trabalho foi realizado com oito linhagens isofêmicas, sendo sete da superespécie *D. serido* e uma de *D. buzzatii*. Das sete primeiras, cinco são atualmente classificadas como *D. serido* e duas como *D. koepferae*. O interesse em estudar estas linhagens está em que seu "status" evolutivo ainda não está bem definido com base nos marcadores analisados anteriormente, para os quais elas mostram um padrão complexo de diferenciação.

Foi analisado o padrão de esterases e alguns desses linhagens foram inter cruzadas para melhor estabelecer as relações de homologia entre as bandas e verificar se ocorrem fenômenos de regulação gênica, manifestados nos híbridos.

Nas linhagens foram encontradas 43 bandas esterásicas, sendo que a de menor número de bandas foi A95F3, com 13, e a de maior número B31D1, com 18.

Comparado aos dados de outros autores, o número de bandas observado neste trabalho, situa-se entre os maiores já encontrados. Por exemplo, foram descritas 10 bandas em *D. melanogaster* (WRIGHT, 1963) e posteriormente 22 bandas (HEALY et al., 1971), 12 em *D. virilis* e em espécies relacionadas (Mc



IV. DISCUSSÃO

Um polimorfismo enzimático extenso, resultante de diferenças de mobilidade eletroforética esterásica, foi descrito para muitas espécies de *Drosophila* (por exemplo HUBBY e LEWONTIN, 1966, para *D. pseudoobscura*; JOHNSON et al., 1966, para 76 espécies de vários grupos; PARKER e MULLEY, 1976, para *D. buzzatii*; CARRASCO et al., 1984, para *D. dunni*; e CERON, 1988 para *D. mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos).

O presente trabalho foi realizado com oito linhagens isofêmicas, sendo sete da superespécie *D. serido* e uma de *D. buzzatii*. Das sete primeiras, cinco são atualmente classificadas como *D. serido* e duas como *D. koepferae*. O interesse em estudar estas linhagens está em que seu "status" evolutivo ainda não está bem definido com base nos marcadores analisados anteriormente, para os quais elas mostram um padrão complexo de diferenciação.

Foi analisado o padrão de esterases e algumas dessas linhagens foram intercruzadas para melhor estabelecer as relações de homologia entre as bandas e verificar se ocorrem fenômenos de regulação gênica, manifestados nos híbridos.

Nas linhagens foram encontradas 43 bandas esterásicas, sendo que a de menor número de bandas foi A95F3, com 13, e a de maior número B3iD1, com 19.

Comparado aos dados de outros autores, o número de bandas observado neste trabalho, situa-se entre os maiores já encontrados. Por exemplo, foram descritas 10 bandas em *D. melanogaster* (WRIGHT, 1963) e posteriormente 22 bandas (HEALY et al., 1971), 12 em *D. virilis* e em espécies relacionadas (Mc



REYNOLDS, 1967), seis em *D. aldrichi* e *D. mulleri* (JOHNSON et al., 1960), 14 em *D. laticola*, 9 em *D. flavomontana*, 7 em *D. borealis* e 12 em *D. montana* (BAKER, 1980) e de 15 a 20 em *D. buzzatii* (EAST, 1982). No presente trabalho, *D. buzzatii* mostrou 16 bandas.

A combinação das 43 bandas, encontradas neste trabalho, originou um número de padrões variável entre 17 (A95F3 e B25D7) e 37 (B59Q1).

Os machos de todas as linhagens, exceto *D. buzzatii*, apresentaram uma variabilidade maior que as fêmeas, especialmente nas linhagens B3iD1, B25D7 e A95F3. Grande parte dessa variabilidade aumentada nos machos é devida à presença de bandas macho-específicas.

A frequência com que os padrões ocorreram, nas linhagens, foi bastante variável. As linhagens B25D7 e B3iD1 foram as que apresentaram as maiores frequências para um de seus padrões (80% e 71%, respectivamente), ambos observados nas fêmeas. Esse mesmo padrão, frequente nas fêmeas B25D7, acrescido de uma banda específica, teve também uma frequência elevada entre os machos (44%).

Deve-se ressaltar que as fêmeas B25D7 e B3iD1 foram as que apresentaram menor número de padrões (4 e 5, respectivamente), seguidas de A95F3 (8). Esses números de padrões correspondem à um quarto (B25D7 e B3iD1) e metade (A95F3) do número de padrões de seus respectivos machos. Nas fêmeas A95F3, o padrão mais frequente entre os oito encontrados foi observado em 38% dos indivíduos.

A frequência dos padrões nos demais casos, porém, foi relativamente baixa e sempre inferior a 30%. Muitos dos padrões foram detectados em um só indivíduo, fêmea ou macho.

A variabilidade observada, quanto ao número de padrões e suas frequências, concorda com os dados dos autores segundo os quais as esterases são muito variáveis (por exemplo, COBBS, 1976). KOJIMA, GILLESPIE e TOBARI (em COBBS, 1976), propuseram que o alto grau de variabilidade encontrado nas esterases é uma adaptação ao grande número de substratos diferentes, sobre os quais as enzimas operam na natureza. JOHNSON (1974) sugeriu que o comportamento diferencial na regulação metabólica pode ser um mecanismo seletivo para manter o polimorfismo em loci como o da esterase-5 em *D. pseudoobscura*.

É importante ressaltar que as linhagens isofêmicas utilizadas neste trabalho, vêm sendo mantidas em laboratório há um tempo relativamente longo (12 a 15 anos), em temperatura constante e mesmo meio de cultura (banana-cacto), mas que apesar disso elas mantêm uma variabilidade, que pode ser considerada elevada e os padrões de variabilidade, qualitativa e quantitativamente diferentes entre si.

A caracterização das bandas, no presente trabalho, levou em conta a crítica à pressuposição de que proteínas que migram na mesma posição são geneticamente as mesmas (Por exemplo, RICHARDSON E SHOULS, 1976). Por isso, para detectar possíveis diferenças entre as bandas que apresentaram uma mesma mobilidade eletroforética, foram usadas soluções de coloração diferentes. Assim, foi verificada a especificidade das bandas ao alfa e ao beta-naftil acetato, isolados, e às misturas de ambos em



concentrações diferentes. Isto permitiu detectar bandas de mesma mobilidade eletroforética mas com afinidades diferentes aos substratos. Essas bandas devem corresponder a esterases determinadas por genes distintos.

Segundo JOHNSON et al. (1966), a especificidade ao alfa ou beta-naftil acetato é fracamente definida, de modo que se alfa ou beta-naftil acetato são usados, separadamente, como substratos, em géis de uma mesma espécie, são obtidos padrões de bandas semelhantes e nenhuma especificidade é detectada. A única variação no gel é quanto à coloração, vermelha ou azul escuro.

No presente trabalho, entretanto, usando alfa ou beta-naftil acetato, separadamente, foi possível notar que nem todas as esterases que hidrolisam o alfa-naftil acetato apresentam a capacidade de hidrolisar o beta-naftil acetato ou, se o fazem, sua atividade é extremamente diminuída, como no caso das bandas 9, 11, 12, 13, 15, 16, 19, 20, 28, 30 e 37. Por outro lado, todas as esterases que hidrolisam o beta-naftil acetato, apresentam a capacidade de hidrolisar, também, o alfa-naftil acetato.

Ainda segundo JOHNSON et al (1966), se alfa e beta-naftil acetato são usados juntos, em uma mesma solução corante, as taxas de hidrólise dos dois ésteres, por algumas esterases, são suficientemente diferentes, predominando o azul escuro (alfa-esterases) ou o vermelho (beta-esterases).

CARRASCO et al. (1984), também observaram que a coloração de esterases com a mistura de alfa e beta-naftil acetato dava melhor resolução e revelava diferenças na especificidade ao substrato. Esses autores estabeleceram seis zonas eletroforéticas de atividade enzimática em *Drosophila*



dunni, sendo as zonas A, C e D, alfa-esterases que se coravam de azul forte, as zonas E e F, beta-esterases e coravam-se de vermelho forte e a zona B que se corava em rosa ou azul suaves, difícil de definir em termos de especificidade ao substrato.

No presente trabalho, a proporção dos substratos utilizados na reação de coloração (15 mg de beta-naftil e 20 mg de alfa-naftil) permitiu identificar, entre as 43 bandas detectadas, três padrões diferentes de coloração: bandas escuras (pretas), bandas vermelhas e bandas com uma coloração intermediária entre o vermelho e o preto, correspondendo, respectivamente, às alfa-esterases, beta-esterases e alfa-beta-esterases.

Entre as 43 bandas, 25 são alfa-esterases, 8 são beta-esterases e 10 alfa-beta-esterases.

Todas as linhagens apresentaram bandas alfa-beta em duas regiões do gel: (1) na região anódica, correspondendo às bandas 4 e 5 em B20D2, 6 e 10 em B25D7, 4, 5, 7 e 8 em B3iD1 e A55Fii, 5 e 7 em B59Qi e B50Q3, 5 e 6 em A95F3, 2 e 3 em Buz; e (2) na porção central, correspondendo às bandas 24 em B20D2 e B25D7, 23 em B3iD1, 23 e 24 em A55Fii, B59Qi, B50Q3 e A95F3 e 25 em Buz.

Quanto às bandas com especificidade para o beta-naftil acetato, todas as linhagens apresentaram uma delas com frequência maior, na porção central do gel, em seguida às bandas alfa-beta centrais. Essa banda é a 29 em A95F3 e Buz e a 31, nas demais linhagens. Acima destas, em direção ao cátodo, estão presentes a banda 33 em B3iD1 e B59Qi, e a banda 35 em B3iD1. As demais bandas beta (1, 32, 41 e 43) foram pouco frequentes e

distribuídas próximo à banda 33 (banda 32) ou nas extremidades dos géis (bandas 1, 41 e 43).

Dentre as bandas alfa, deve-se ressaltar, devido à elevada frequência, as bandas 7 em Buz, 11 em A95F3, 12 e 13 em B31D1, A55F11, B59Q1 e B50Q3 e 15 e 16 em B20D2 e B25D7, situadas logo acima das bandas alfa-beta anódicas; a banda 36, próxima ao cátodo, presente em todos os indivíduos de todas as linhagens e, também, com frequências elevadas, as bandas 19 e 20 em B20D2 e B25D7, as bandas 30 e 37 em B31D1, A55F11, B59Q1 e B50Q3 e a banda 28 em A95F3, sendo estas cinco detectadas apenas em machos. As demais bandas alfa, presentes com frequências variáveis, estiveram distribuídas por toda a extensão do gel (bandas 6, 14, 17, 18, 21, 22, 26, 27, 34, 38, 39, 40 e 42).

Nem todas as bandas detectadas no presente trabalho, exclusivamente em indivíduos do sexo masculino, podem ser consideradas sexo-específicas. Mas, levando em consideração a frequência de cada banda e também sua ocorrência exclusivamente nos machos, em mais de uma linhagem, entendemos que é possível considerar específicas dos machos, com boa margem de segurança, sete bandas, incluindo as seguintes bandas alfa:

- Bandas 19 e 20 em B20D2 (frequências de 88% para ambas).
- Bandas 19 e 20 em B25D7, a primeira com frequência de 67% e a segunda com frequência de 14%. Embora esta última frequência não seja alta, por analogia com B20D2, achamos possível considerá-la macho-específica em B25D7.
- Banda 20 em A95F3 (frequência de 54%).
- Banda 30 em B31D1, B50Q3, A55F11 e B59Q1 (frequências de 84%, 50%, 50% e 49%, respectivamente).

-Banda 37 em B59Q1, B50Q3, A55F11 e B31D1 (frequências de 57%, 47%, 46% e 36%, respectivamente).

Também entendemos que podem ser consideradas macho-específicas as seguintes bandas beta:

-Banda 33 em B31D1 e B59Q1 (frequências de 36% e 13%, respectivamente). Neste caso também foram consideradas as frequências e a presença repetida em mais de uma linhagem.

-Banda 35 em B31D1 (frequência de 36%).

As bandas 28, 30, 33, 35 e 37 tiveram sua condição de esterase macho-específica verificada também nos híbridos das linhagens parentais que apresentavam essas bandas.

A banda alfa 22, encontrada exclusivamente nos machos de B31D1 com frequência de 36% não foi incluída na relação de bandas sexo-específicas por ser uma banda de coloração tênue, o que pode dar margem a erro na detecção. Além disso, essa banda foi encontrada apenas em fêmeas na linhagem B59Q1, com uma frequência de 9%. Ela deverá ser analisada mais detalhadamente em outro trabalho.

As bandas alfa sexo-específicas têm em comum, além da ocorrência exclusiva em machos, a incapacidade de hidrolisar o beta-naftil acetato na ausência do alfa-naftil. Essas características, juntas, sugerem tratar-se de uma enzima com função comum.

Um caso interessante de modificação, entre as linhagens, na sexo-especificidade é o que ocorre com as bandas 19 e 20. Essas bandas, macho-específicas em B20D2 e B25D7 ocorreram, também, em Buz (frequências respectivamente, de 22% e 44%), e em B59Q1 (apenas a banda 19, com frequência de 7%); porém, em machos



e fêmeas. Mas em Buz, estas bandas hidrolisaram o beta-naftil na ausência do alfa-naftil, o que não ocorreu com as mesmas bandas em B20D2 e B25D7 (a baixa frequência da banda 19 em B59Q1 não permitiu obter essa informação). Esses dois fatos indicam tratar-se de esterases diferentes, com a mesma mobilidade eletroforética. A mesma numeração foi mantida, neste caso, porque nas condições normais do experimento a coloração das referidas bandas era igual em todas essas linhagens.

Em resumo, com relação às bandas macho-específicas, as linhagens B20D2 e B25D7 têm em comum as bandas alfa 17 e 20, as linhagens B59Q1, B50Q3, A55Fii e B3iDi compartilham as bandas alfa 30 e 37 e as linhagens B3iDi e B59Q1 compartilham a banda beta 33. A linhagem B3iDi apresenta ainda, com exclusividade, a banda beta 35. A linhagem A95F3 é a única a apresentar a banda alfa 28 e a linhagem de *D. buzzatii* não apresentou bandas macho específicas.

KAMBYSELLIS et al. (1968) detectaram em *D. aldrichi*, uma esterase exclusiva dos machos, predominantemente presente no bulbo ejaculatório. Ocasionalmente, esta esterase estava presente em fêmeas recém-acasaladas, aparentemente transmitida pelo macho durante a cópula. Esta esterase apresentou uma especificidade para o beta-naftil acetato, sendo denominada esterase-F. JOHNSON et al. (1968), baseado no fato destas bandas estarem presentes no gel em forma única ou tripla, sugeriu que seu loco estrutural estaria localizado em um autossomo, mas que sua expressão seria limitada ao sexo.

Uma beta-esterase macho-específica, também denominada est-F, foi detectada em *D. dunni*, estando presente em 70% dos



machos e totalmente ausente nas fêmeas. Semelhantemente à beta-esterase macho-específica de *D. aldrichi*, estava situada próxima ao cátodo e, também, semelhantemente às beta-esterases situadas de forma predominante no bulbo ejaculatório, era inibida pelo álcool (CARRASCO et al., 1984). Ceron (1988) detectou, também, uma beta-esterase presente somente nos machos de *D. arizonensis*, designada est-9, com frequência de 77%. Este mesmo autor encontrou duas alfa-esterases macho-específicas, est-10 e est-12, em *D. arizonensis* e *D. mulleri*.

Não temos conhecimento de outro caso de bandas alfa macho específicas, além do descrito por Ceron (1988) e das bandas alfa descritas no presente trabalho. Pode-se aventar a hipótese de que sejam características de espécies do complexo *mulleri*.

Contrariamente ao que foi observado por Ceron (1988), em *D. mulleri* e *D. arizonensis*, espécies do mesmo complexo das linhagens analisadas neste trabalho, nenhuma banda mostrou-se específica das fêmeas.

Um outro tipo de variabilidade intralinhagem observada neste trabalho, refere-se à presença de diferenças na intensidade de coloração de uma mesma banda em indivíduos de mesma linhagem, sugerindo tratar-se de diferenças na quantidade de enzima presente. Com relação a essa variação, podemos citar POLYAKOVA e KOROCHKIN (1986). Esses autores observaram, em um estudo de isoenzimas esterásicas de várias espécies de *Drosophila* do grupo *virilis*, que flutuações casuais ocorrem na direção de um fortalecimento ou enfraquecimento de alfa-esterases, atribuindo estas flutuações a peculiaridades fisiológicas dos indivíduos.



Uma tentativa de analisar as bases genéticas das bandas esterásicas detectadas no presente trabalho, foi feita apenas em relação às bandas cujo comportamento é característico e constante.

Em uma mesma linhagem, bandas com mobilidade eletroforética acentuadamente diferente foram atribuídas a locos diferentes e bandas com mobilidade eletroforética e afinidade ao substrato iguais, em linhagens diferentes, foram atribuídas ao mesmo alelo.

Em uma mesma linhagem, bandas com mobilidade próxima e mesma afinidade ao substrato foram consideradas alelos de mesmo loco. Por outro lado, houve pelo menos um caso de bandas com mobilidade eletroforética igual ou extremamente próxima e diferentes afinidades ao substrato, atribuídas a alelos de locos diferentes.

Assim, três locos parecem bem definidos nas oito linhagens analisadas. Um compreende as bandas alfa-beta centrais (bandas 23, 24 e 25), o segundo é constituído pelas bandas beta 27 e 31 e o terceiro pela alfa-esterase da banda 36.

Quanto ao loco correspondente às alfa-beta centrais, as observações indicam que cada banda corresponde a um alelo diferente e que essa esterase é uma enzima monomérica, uma vez que nenhuma banda intermediária foi detectada em indivíduos heterozigotos. O alelo correspondente à banda 24, só não ocorreu em Buz e B3101, o alelo correspondente à banda 23 esteve presente em B3101, A55F11, B59Q1, B50Q3 e A95F3, e o alelo da banda 25 foi exclusivo de Buz.



O loco correspondente às beta-esterases parece possuir dois alelos, correspondentes às bandas 29 e 31, sendo o alelo da banda 29 presente em A95F3 e Buz e o alelo da banda 31 presente nas demais linhagens.

A banda alfa 36 parece corresponder a um loco monomórfico, uma vez que essa banda ocorreu em todos os indivíduos analisados, aparentemente sem nenhuma variação. Essa banda detectada em todos os indivíduos de todas as linhagens, deve corresponder a alguma atividade essencial nas linhagens analisadas.

É importante destacar a característica observada quanto às alfa-beta-esterases mais anódicas e quanto à algumas alfa-esterases (bandas 12, 13, 15 e 16). Essas bandas ocorreram em duplas em uma grande porcentagem dos indivíduos de mesma linhagem. Por exemplo, no caso das alfa-beta-esterases mais anódicas da linhagem A55Fii, que compreendem as bandas 4, 5, 7 e 8, as bandas 4 e 5 ocorreram sempre juntas em 89% dos indivíduos analisados e estiveram ausentes nos demais. Já as bandas 7 e 8 ocorreram juntas em 56% dos indivíduos e estiveram ausentes nos 44% restantes. Se considerarmos as banda 4 e 5 alelos entre si, 89% dos indivíduos deveriam ser heterozigotos e os 11% restantes homozigotos para um possível alelo nulo, ou portadores de genes supressores. Por outro lado, para considerar essas duas bandas como produtos de dois locos diferentes precisamos imaginar uma ligação completa entre eles (não haver recombinação) ou uma frequência muito baixa de recombinação não detectada na amostra, uma vez que a presença de uma banda implica sempre na presença da outra. O mesmo raciocínio pode ser feito com as bandas 7 e 8.



TSUNO et al. (1984) verificaram que, em *D. virilis*, um alelo para o loco Est-alfa em homozigose, determina duas bandas e um alelo para o loco Est-beta em homozigose, determina três bandas, o que foi demonstrado através de cruzamentos. Os autores propuseram que esse padrão multibanda seria devido a um mecanismo desconhecido gerado por montagem ("splicing") diferencial do RNA_m, ou então, devido a uma possível duplicação em tandem, sendo esses genes estreitamente ligados. COSTA et al. (1977) já haviam encontrado o mesmo caso para o loco Est-6, em *D. melanogaster*, e por meio de testes específicos obteve alguns recombinantes.

Bandas alfa em forma de duas frações foram observadas também em *D. montana*, *D. litoralis*, *D. eozana* e *D. laticola* além de *D. virilis* (POLYAKOVA e KOROCHKIN, 1986). Porém, a genética dessas bandas não foi discutida.

Assim, com base na literatura, a duplicidade de bandas encontradas no presente trabalho, talvez possa também ser explicada pela presença de genes duplicados, estreitamente ligados, por montagem diferencial dos RNAm ou ainda por isoenzimas secundárias (decorrentes de modificações pós-transcricionais). Deste modo, no primeiro caso, cada dupla de banda representaria dois locos diferentes, e nos dois últimos casos, as bandas 4 e 5 representariam um alelo e as banda 7 e 8 outro alelo para o loco das alfa-beta-esterases mais anódicas.

Para estabelecer com exatidão o real número de locos existentes em cada linhagem para essas bandas duplas (alfa-beta-esterases anódicas e alfa-esterases) serão necessários outros estudos mais direcionados ao problema, envolvendo cruzamentos e também, análise das propriedades bioquímicas dessas enzimas.



Além desses locos mencionados, outros ainda podem ser definidos. É o caso das bandas 38 e 39, que são distintas de todas as demais, por serem caracteristicamente delgadas. Ambas localizam-se próximas ao cátodo e possivelmente constituem alelos de um mesmo loco. A banda 39 foi detectada em B20D2, B31D1 e B50Q3, e a banda 38 em B20D2, B25D7, B31D1 e A95F3. Essas bandas ocorreram em baixa frequência, sendo que a frequência máxima alcançada foi de 12% para a banda 38, em B31D1. Essa mesma banda foi observada em 33% dos híbridos entre fêmeas B20D2 e machos B31D1 e em 58% dos híbridos entre fêmea A95F3 e macho B20D2.

As observações deste trabalho são indicativas de que outros cinco locos podem ainda ser responsáveis pelas bandas macho-específicas, um loco correspondendo às bandas 17 e 20 em B20D2 e B25D7, outro às bandas 28 em A95F3 e 30 em B31D1, A55F11, B57Q1 e B50Q3, um terceiro correspondendo à banda beta 33 em B31D1 e B57Q1, outro à banda beta 35 em B31D1 e, um último, à banda 37 em B31D1, A55F11, B57Q1 e B50Q3.

Parte das informações para estabelecer essa relação banda-loco foram obtidas por meio da análise dos híbridos. Por exemplo, a suposição de que as bandas beta 33 e 35 são devidas a alelos de locos diferentes, surgiu porque um mesmo híbrido entre B20D2 e B31D1 apresentou as duas bandas e estas estavam presentes somente na linhagem parental B31D1.

Segundo MORTON e SINGH (1985), as alfa e beta-esterases constituem duas famílias de enzimas homólogas em *Drosophila*. Beta-esterases foram identificadas em todas as espécies de *Drosophila* e vários estudos têm sugerido a existência de homologia entre elas.



PHIB (NARA) A homologia entre as beta-esterases 5 de *D. pseudoobscura* e 6 de *D. melanogaster* foi evidenciada por meio da análise da especificidade ao substrato; ambas apresentaram o mesmo comportamento frente a diferentes soluções corantes. Entretanto, estas enzimas estão localizadas em diferentes tecidos: a est-5 predomina nos olhos e hemolinfa e a est-6 no bulbo ejaculatório, demonstrando que estas estão sob diferentes formas de regulação (ARNASON e CHAMBER, 1984).

Já LUNDAY e FARMER (1983) sugeriram a homologia entre a esterase-5 de *D. pseudoobscura* e a esterase D de *D. aldrichi* e *D. mulleri*, todas localizadas na hemolinfa e nos olhos.

CERON (1988) denominou de esterase-D, a esterase encontrada em *D. mulleri* e *D. arizonensis*, que parece corresponder à esterase i de *D. buzzatii* e à esterase 5 de *D. mojavensis*.

Como a esterase i de *D. buzzatii* (EAST, 1982) parece corresponder à banda 29 encontrada no presente trabalho, uma vez que foi a única beta-esterase apresentada por *D. buzzatii*, segue-se que o loco para beta-esterase verificado neste trabalho é homólogo aos demais encontrados em outras espécies de *Drosophila*.

EAST (1982) verificou que a esterase-i ocorre somente na hemolinfa e propôs que esta enzima, junto com a esterase-J, que apresenta a mesma especificidade ao substrato, modulam a titulação do hormônio juvenil.

As alfa-esterases geralmente encontram-se distribuídas por todo o organismo e presentes durante todos os estádios de desenvolvimento, em *Drosophila*. São enzimas monoméricas e inibidas por reagentes do grupo SH, como por exemplo o PCMB e



PHMB (NARISE, 1973; MORTON e SINGH, 1985). Como exemplo de enzimas que apresentam essas características pode-se incluir a esterase C de *D. melanogaster*, descrita por BECKMAN e JOHNSON (1964), a esterase-4 de *D. pseudoobscura* descrita por MORTON e SINGH (1985) e cuja homologia com a est-C de *D. melanogaster* foi sugerida pelo mesmo autor; a esterase-2 de *D. buzzatii*, sendo que, nessa espécie, esta enzima ocorre predominantemente no aparelho digestivo, sugerindo um papel na digestão e desintoxicação (EAST, 1982); e a esterase-5 de *D. mulleri* (CERON, 1988) que também se comporta como uma enzima monomérica e está presente durante todo o desenvolvimento. *intensidade de coloração das bandas* Para traçar um paralelismo entre as alfa-esterases identificadas neste trabalho e as demais alfa-esterases encontradas na literatura, serão necessários o uso de inibidores, a verificação da distribuição nos tecidos e um estudo do comportamento dessas enzimas, durante o desenvolvimento.

O estudo dos padrões de esterases nos híbridos mostrou que eles são constituídos basicamente por um somatório das bandas parentais. Entretanto, algumas diferenças na intensidade de coloração de suas bandas quando comparadas às bandas parentais, e mesmo ausência de bandas que são altamente frequentes nas linhagens parentais, sugerem alterações quanto ao nível de atividade enzimática. Essas alterações podem ser decorrentes de mecanismos de regulação. *servado em cruzamentos intralinhagens.*

Aumentos na intensidade de coloração, indicando um aumento na expressão gênica, foram verificados nas bandas alfa-beta 23 e 24. Ambas ocorrem em machos e fêmeas das linhagens B5043 e B5901. Nos machos híbridos das duas direções de



cruzamentos entre essas linhagens, as duas bandas apareceram mais intensamente coradas. O mesmo fenômeno foi observado no intercruzamento de A95F3 com B59Q1. Essas mesmas bandas apareceram isoladas em B3iD1 (banda 23) e B20D2 (banda 24) e manifestaram, também, maior atividade nos machos híbridos da única direção em que essas linhagens se intercruzam, isto é, fêmeas B20D2 com machos B3iD1. Também nos machos híbridos das duas direções do intercruzamento de A95F3 com B20D2, a banda 24 (presente em ambas as linhagens parentais) é mais intensamente corada.

Esse fenômeno de aumento na intensidade de coloração das bandas 23 e 24 em machos híbridos, foi também verificado em alguns machos das linhagens parentais, porém, em nível mais discreto. Portanto, o que ocorre nos híbridos é só uma intensificação de um fenômeno que ocorre nas linhagens parentais, e exclusivamente com os machos.

A banda alfa 15 é outro exemplo de manifestação mais intensa, ocorrendo nos machos híbridos dos cruzamentos de fêmeas A95F3 X machos B20D2 e em fêmeas e machos híbridos dos cruzamentos entre fêmeas B20D2 X machos B3iD1. É preciso destacar, que os cruzamentos entre A95F3 e B20D2 produzem descendentes nas duas direções, mas, apenas na direção mencionada ocorre o comportamento diferencial da banda 15. Esse comportamento não foi observado em cruzamentos intralinhagens.

As esterases macho-específicas correspondentes às bandas 36 e 37, também apresentaram uma atividade enzimática aumentada nos machos híbridos entre as linhagens B50Q3 e B59Q1 (ambas apresentam as duas bandas).



Deve-se ressaltar que tanto as bandas 23 e 24, como as bandas 15, 30 e a 37 estiveram também presentes em híbridos de outros cruzamentos envolvendo as linhagens em que ocorrem, mas em nenhum outro caso, além dos mencionados, manifestaram-se da forma descrita.

CERON (1988) detectou esse fenômeno de aumento da intensidade de coloração em bandas esterásicas de híbridos entre *Drosophila mulleri* e *D. arizonensis*, incluindo também esterases macho-específicas. Esse autor atribuiu o reforço da atividade à soma das expressões dos genes das duas espécies, como decorrência de um mecanismo de regulação "cis-acting", envolvido na atividade dos dois alelos.

No presente trabalho, essa explicação poderia ser utilizada para as bandas 23 e 24, consideradas alelos de um mesmo loco e para as bandas 30 e 37.

Como a intensificação das bandas 23 e 24 só foi observada em machos, é possível que as mesmas estejam relacionadas com alguma atividade específica deste sexo, embora não sejam macho-específicas como as bandas 30 e 37.

No caso da banda 15, a mesma explicação de atividade aumentada pela soma da expressão gênica das linhagens intercruzadas não se aplica, pois essa banda, estava presente em uma só das linhagens parentais dos híbridos analisados.

Podemos supor que a maior atividade enzimática nos híbridos, seja devida a um aumento da síntese de proteínas específicas que ocorre nessa situação "anormal" de estarem presentes em uma mesma célula, cromossomos que evoluíram em separado. Mecanismos de regulação emergenciais desse tipo, foram



admitidos por BICUDO e RICHARDSON (1977), para explicar o caso de amplificação gênica relacionado à atividade organizadora nucleolar, em híbridos entre *D. mulleri* e *D. arizonensis*.

A outra situação de bandas presentes em uma das linhagens parentais e ausentes nos híbridos, onde eram esperadas devido ao número de indivíduos usados nos cruzamentos, ocorreu com as bandas macho-específicas 19 e 20. Nos híbridos dos cruzamentos envolvendo a linhagem B20D2, onde essas bandas ocorrem com frequência de 98%, (A95F3 X B20D2, nas duas direções e fêmea B20D2 X macho B0iD1) essas bandas não foram detectadas.

Outro caso de supressão ocorreu com as bandas alfa 20 e beta 29. A banda 20 é macho-específica e ocorre na linhagem A95F3. Nos cruzamentos entre fêmeas B20D2 e machos A95F3, nenhum macho híbrido apresentou essa banda. Na direção recíproca, porém, ela esteve presente. Poder-se-ia pensar que essa banda seja ligada ao cromossomo X, porém, outros cruzamentos indicam tratar-se de esterase determinada por um gene autossômico.

Quanto à banda 29, presente em A95F3, também não foi detectada em híbridos de cruzamentos entre machos dessa linhagem e fêmeas B20D2. Porém, a banda 31, presente em B20D2, considerada alelo da banda 29, manifestou-se normalmente nos híbridos das duas linhagens. Nos cruzamentos das linhagens A95F3 e B20D2 com outras linhagens, as bandas 29 e 31 manifestaram-se normalmente, reforçando a idéia do envolvimento de mecanismos supressores.

Casos de supressão da atividade gênica de uma das espécies parentais em híbridos, foram detectadas quanto à atividade organizadora nucleolar. Basicamente, dois mecanismos parecem estar envolvidos. Um mecanismo foi chamado



"desbalanceamento de ativadores" e atua principalmente em híbridos de espécies relacionadas, sendo a supressão dos genes para RNAr de uma das espécies devida ao menor número de elementos ativadores ("enhancers") apresentado por esta (REEDER e KOAN, 1984). O segundo mecanismo é o "fator espécie-específico", que atua entre espécies distantemente relacionadas, e a supressão é causada pela incapacidade do fator transcricional de uma espécie em reconhecer o promotor do gene ribossômico da outra espécie (REEDER, 1990).

Mecanismos dessa natureza podem estar envolvidos na supressão das bandas 19 e 20 de B20D2 e das bandas 20 e 22 de A95F3. Também neste caso, outros estudos envolvendo cruzamentos, somados à uma análise ao nível molecular são necessários.

Procuramos utilizar a variabilidade esterásica das linhagens analisadas neste trabalho, para estabelecer relações de proximidade evolutiva entre elas. Tentativas para quantificar a diferenciação entre populações, baseadas na variabilidade enzimática, têm sido realizadas utilizando índices que medem a similaridade e a distância entre as mesmas. Sabemos que os resultados obtidos por esse processo, existentes na literatura, nem sempre são concordantes, e que, no presente trabalho, a essas limitações deve-se acrescentar o fato de que foi utilizado um número pequeno de linhagens isofêmicas. Tendo em vista, porém, a existência de outros estudos mais amplos, utilizando outros marcadores que podem servir de elementos de comparação, consideramos válida a presente tentativa.



Classe IV O índice de Similaridade de WHITNEY et al. (1968) foi calculado utilizando-se o número de bandas compartilhadas, considerando cada banda uma característica, independentemente da relação loco-gene. O IS foi calculado para: (a) todas as bandas, (b) só as bandas com frequência igual ou superior a 10% e (c) só as bandas com frequência igual ou superior a 30%.

Com base na proximidade das médias dos IS calculados para cada linhagem, em relação às demais, especialmente nas situações (b) e (c), é possível estabelecer cinco classes constituídas da seguinte maneira: Classe I, composta pelas linhagens B20D2 e B25D7 (atualmente classificadas como D. koepferae); Classe II composta pela linhagem B3iDi (atualmente classificada como D. serido); Classe III constituída pelas linhagens A55Fii, B59Q1 e B50Q3 (também classificadas como D. serido); Classe IV pela linhagem A95F3 (atualmente classificada como D. serido) e Classe V constituída pela linhagem de D. buzzatii. Utilizando-se a classificação das linhagens com base no

Já na avaliação das relações de proximidade entre as linhagens, com base na Análise de Dependência (CORDEIRO, 1987) que se baseou nas vinte bandas mais frequentes em todas as linhagens, modifica essa classificação pela inclusão de B3iDi na classe de A55Fii, B59Q1 e B50Q3 (figura 16). Isto faz sentido se considerarmos que os maiores valores de IC entre as linhagens, nas três condições calculadas (a, b e c), foram obtidos, de um lado entre B20D2 e B25D7 e de outro entre B3iDi, A55Fii, B59Q1 e B50Q3. Desta forma o número de classes é reduzido para quatro: Classe I constituída por B20D2 e B25D7, Classe II constituída por B3iDi, A55Fii, B59Q1 e B50Q3, Classe III constituída por A95F3 e



Classe IV por *D. buzzatii*.

Dados da literatura mostram que diferentes linhagens da superespécie *D. serido* apresentam um padrão complexo de distribuição das características ou marcadores analisados previamente (BAIMAI et al., 1983 - cromossomos metafásicos; RUIZ et al., 1982; TOSI et al., 1982; TOSI e SENE, 1989 e WASSEKMAN e RICHARDSON, 1987 - cromossomos politênicos; SILVA e SENE, 1991 - morfologia do edeago; BIZZO, 1983 e MADI-RAVAZZI, 1988 - isolamento reprodutivo).

A complexidade dessa distribuição de características e suas implicações, têm sido bastante discutidas por autores como SENE et al., 1982, 1988; TOSI e SENE, 1989.

Considerando os resultados obtidos na presente análise de esterases como mais um marcador no estudo da diferenciação das linhagens de *Drosophila serido* e *D. Koepferae*, apresentamos na tabela 7, uma visão de conjunto dos resultados existentes.

Utilizando-se a classificação das linhagens com base no IS médio dado pelos padrões de esterases, nos cálculos b e c, vemos que ela concorda inteiramente, com a classificação dada pela morfologia do edeago (SILVA e SENE, 1991) e pelo cariótipo (BAIMAI, 1983).

Considerando, porém, os resultados da Análise de Dependência, observa-se que não há concordância completa com esses marcadores, mas sim com os dados de isolamento reprodutivo (BIZZO, 1983; MADI-RAVAZZI, tese de doutorado em fase de redação).

Desta forma os resultados de esterase corroboram a idéia de que as linhagens presentemente classificadas como *D.*



serido não pertencem a um mesmo "status" evolutivo. Pelo menos A95F3 deve corresponder a outra espécie, como indicam os resultados de cariótipo (BAIMAI et al., 1983), edeago (SILVA, 1983 e SILVA e SENE, 1991) e isolamento reprodutivo (BIZZO, 1983; MARI-RAVAZZI, 1988 e tese de doutoramento em fase de redação).

Tabela 7. Visão geral da diferenciação das linhagens da superespécie *D. serido* analisadas, com base nos marcadores utilizados na literatura e no presente trabalho.

LINHAGEM	CARIÓTIPO*	INVERSÕES**	EDEAGO***	ISOLAMENTO**** REPRODUTIVO	PADRÃO DE***** ESTERASE	
					IS(̄)	ANADEP
R20D2	IV	III	E	V	I	I
B25D7	IV	III	E	V	I	I
D31D1	V	II	D	II	II	II
A55	I	IV	B	II	III	II
B59Q1	I	IV	B	II	III	II
B50Q3	I	IV	B	II	III	II
A95	II	IV	C	III	IV	III

*BAIMAI et al. 1983; ** TOSI, 1982; TOSI e SENE, 1987; *** SILVA e SENE, 1991; **** BIZZO, 1983;

***** presente trabalho.



serido não pertencem à um mesmo "status" evolutivo. Pelo menos A95F3 deve corresponder a outra espécie, como indicam os resultados de cariótipo (BAIMAI et al., 1993), edeago (SILVA, 1990 e SILVA e SENE, 1991) e isolamento reprodutivo (BIZZO, 1993; MADI-RAVAZZI, 1988 e tese de doutoramento em fase de redação), além dos resultados de esterase, em qualquer dos cálculos de proximidade realizados.

A supressão de bandas em intercruzamentos de B20D2 com A95F3 e B3iDi, pode também ser tomada como um reforço para a classificação dessas linhagens como espécies diferentes. Deve ser lembrado também que MADI-RAVAZZI (1993) descreveu amplificação de material genético nos híbridos entre A95F3 e B20D2, características até agora só observada em híbridos interespecíficos.

A indicação de uma diferenciação em mosaico mencionada por SENE et al. (1990) e TOSI e SENE (1999), segundo a qual as populações de *D. serido* analisadas se diferenciaram mais ou menos simultaneamente, a partir do isolamento de populações de mesma espécie com distribuição geográfica contínua, também é reforçada pelos dados dos padrões de esterases. Os autores mencionados admitem que esse isolamento ocorreu durante os ciclos paleoclimáticos do período quaternário, com a expansão da vegetação úmida e a retração da vegetação seca, que inclui as cactáceas a que as espécies do complexo *D. serido* estão associadas.

Com base nas bandas compartilhadas e exclusivas foi construída a Figura 25 que mostra um padrão pelo qual as populações dessa superespécie poderiam ter se isolado,



provavelmente em ciclos sucessivos de retração da vegetação seca.

Pretende-se ampliar o número de linhagens analisadas, quanto às esterases, para obter maiores informações referentes à diferenciação dessas populações e, juntamente com os demais marcadores, contribuir para um melhor conhecimento do processo evolutivo.

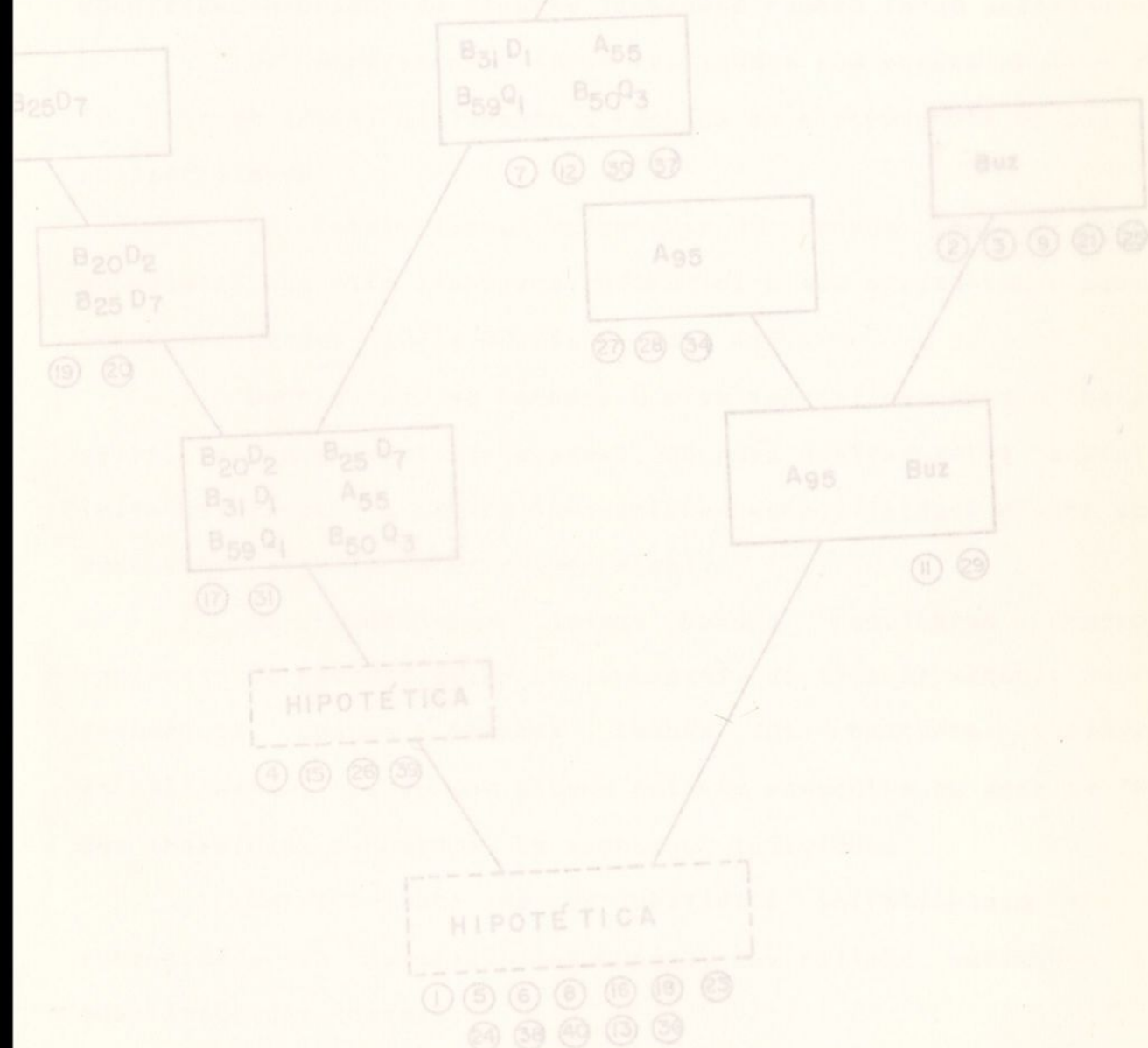


Figura 25 - Hipótese de divergência das linhagens isofêrmicas analisadas, estabelecida com base nas bandas esterásicas compartilhadas e exclusivas.

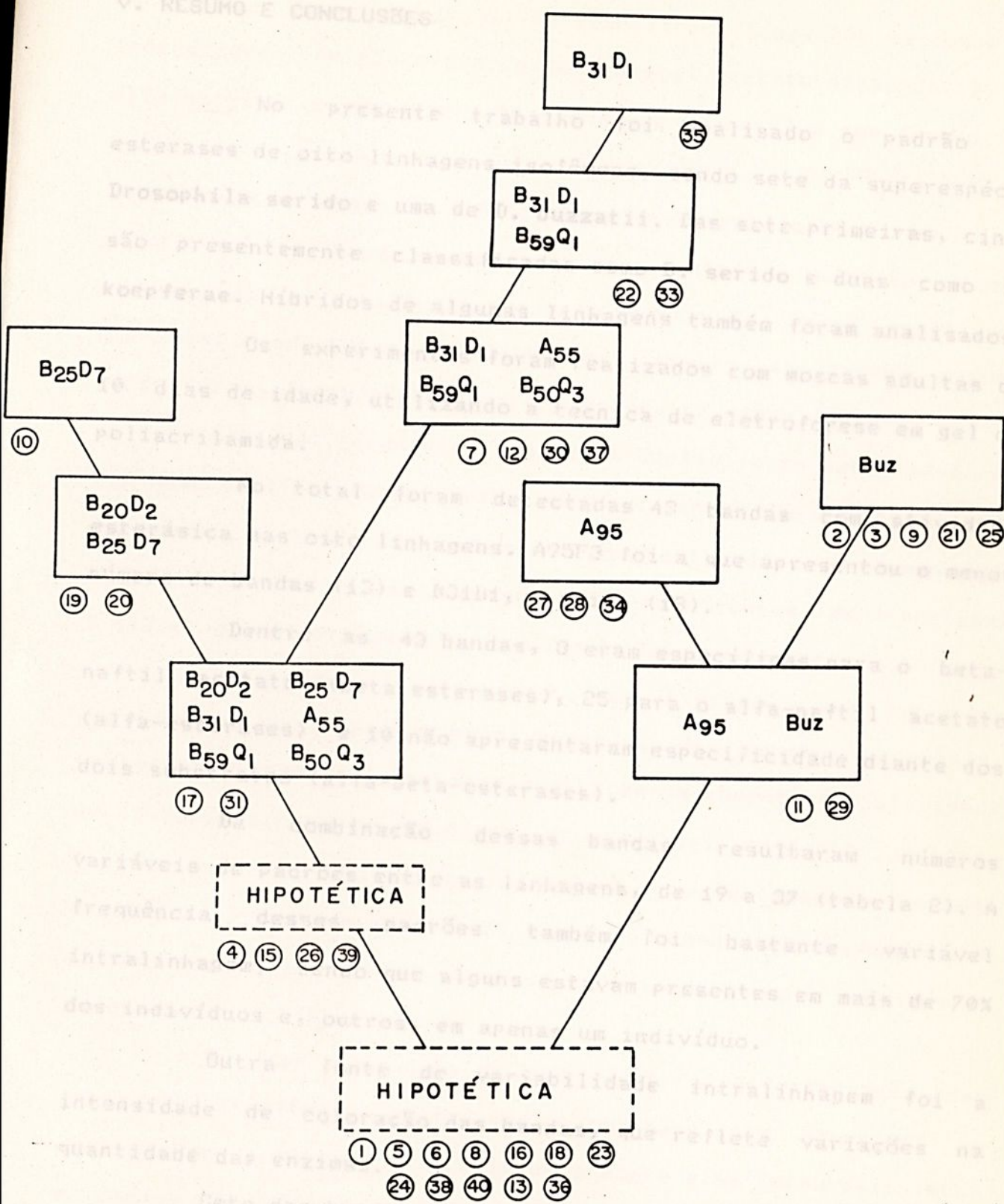


Figura 25 - Hipótese de divergência das linhagens isofêneas analisadas, estabelecidas com base nas bandas esterásicas compartilhadas e exclusivas.

V. RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho foi analisado o padrão de esterases de oito linhagens isofêneas, sendo sete da superespécie *Drosophila serido* e uma de *D. buzzatii*. Das sete primeiras, cinco são presentemente classificadas como *D. serido* e duas como *D. koepferae*. Híbridos de algumas linhagens também foram analisados.

Os experimentos foram realizados com moscas adultas de 10 dias de idade, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.

No total foram detectadas 43 bandas com atividade esterásica nas oito linhagens. A25F3 foi a que apresentou o menor número de bandas (13) e B3101, o maior (18).

Dentre as 43 bandas, 9 eram específicas para o beta-naftil acetato (beta-esterases), 25 para o alfa-naftil acetato (alfa-esterases) e 10 não apresentaram especificidade diante dos dois substratos (alfa-beta-esterases).

Da combinação dessas bandas resultaram números variáveis de padrões entre as linhagens, de 19 a 37 (tabela 2). A frequência desses padrões também foi bastante variável intralinhagem, sendo que alguns estavam presentes em mais de 70% dos indivíduos e, outros, em apenas um indivíduo.

Outra fonte de variabilidade intralinhagem foi a intensidade de coloração das bandas, que reflete variações na quantidade das enzimas.

Sete das bandas que foram encontradas exclusivamente em machos podem ser consideradas, com boa margem de segurança, específicas desse sexo, sendo cinco alfa-esterases e duas beta-



esterases. Essas bandas alfa, sexo-específicas, têm em comum a incapacidade de hidrolisar o beta-naftil acetato na ausência do alfa-naftil, o que sugere tratar-se de uma enzima com função em comum. III - constituída por A23413, B3901 e B3903; Classe IV

por A23413. Com base na mobilidade eletroforética e no padrão de coloração das bandas, comparando-se parentais e híbridos ficou evidenciada a existência de pelo menos três locos genéticos, presentes em todas as linhagens. Quanto às bandas macho-específicas, foram atribuídas à presença de cinco locos.

Bandas presentes sempre em duplas foram detectadas e, com base na literatura, atribuídas a variantes não alélicas, isto é, genes de locos diferentes fortemente ligados, a isoenzimas secundárias ou a diferentes RNAm resultantes de montagem ("splicing") diferencial do produto de um mesmo gene.

O padrão esterásico dos híbridos mostrou ser constituído basicamente pelo somatório das bandas parentais. Entretanto, algumas esterases mostraram um aumento de atividade em híbridos de determinados cruzamentos, enquanto outras, frequentes nas linhagens parentais, aparentemente estavam suprimidas. Tanto a supressão, quanto o aumento de atividade de algumas bandas foram atribuídos a mecanismos reguladores decorrentes da hibridação.

Em uma tentativa de quantificar a diferenciação das linhagens isofêneas analisadas, com base nas esterases, e estabelecer a relação de proximidade entre elas foram calculados o índice de Similaridade (IS) e a Análise de Dependência (ANADEP).



Os valores médios de IS permitiram dividir as linhagens analisadas em cinco classes: Classe I - constituída das linhagens B20D2 e B25D7; Classe II - constituída por B3iD1; Classe III - constituída por A55F1j, B59Q1 e B50Q3; Classe IV - por A75F3; Classe V - por *D. buzzatii*. Já os resultados da ANADEP permitiram agrupar as linhagens em quatro classes, sendo a diferença devida à reunião das linhagens das classes II e III em uma mesma classe, nessa análise.

Comparando-se os resultados de ambos os testes com os de outros marcadores, analisados anteriormente, observa-se que o agrupamento das linhagens isofêmeas, pela ANADEP, concorda inteiramente com a divisão em classes estabelecida com base em dados de isolamento reprodutivo, enquanto o agrupamento das mesmas linhagens pelo IS médio concorda com os dados quanto à morfologia do edeago e ao cariótipo.

Um aspecto importante na discussão desses resultados é que, qualquer das duas classificações aponta a linhagem A95F3 como tendo "status" evolutivo diferente das demais linhagens de *Drosophila* serido analisadas neste trabalho, constituindo, ao que tudo indica, uma terceira espécie na superespécie *D. serido*.

The combination of the esterase bands produced a variable number of intraisofemale line patterns, ranging from 17 to 30. The frequencies of these patterns were also very variable. In different isofemale lines some of these patterns were found in more than 70% of the individuals while others were found in a single fly.



VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

A comparative analysis was made of the esterase isoenzyme patterns of eight isofemale lines, seven of the *Drosophila serido* superspecies and one of *D. buzzatii*. Five of the seven isofemale lines are at present classified as *D. serido* (B31D1, A55F11, B59Q1, B50Q3 and A95F3) and two as *D. koepferae* (B20D2 and B25D7). Hybrids of some isofemale lines were also studied. Electrophoretic mobility and staining patterns of bands

Ten day old adult flies, varying between 33 to 57 individuals of each sex per isofemale line, were analyzed by electrophoresis in polyacrilamide gels.

In all, 43 bands in the spectrum of esterase isoenzymes were detected in the eight isofemale lines. The smallest and the greatest numbers of esterase bands were found, respectively, in A95F3 and B31D1.

Among the 43 esterase bands, eight exhibited specific reaction with beta-naphtyl acetate (beta-esterases), 25 preferentially cleaved alfa-naphtyl acetate (alfa-esterases) and ten did not exhibit specific reaction with alfa or beta-naphtyl acetate (alfa-beta esterases).

The combination of the esterase bands produced a variable number of intrainisofemale line patterns, ranging from 17 to 37. The frequencies of these patterns were also very variable. In different isofemale lines some of these patterns were found in more than 70% of the individuals while others were found in a single fly.

Values of SI were used to separate isofemale lines into 5 classes: Class I - constituted by B20D2 and B25D7; Class



Differences among isofemale lines also included variation in the amount of enzymes present in different individuals or populations.

Among bands detected exclusively in males, seven may be considered sex-specific. Five are alfa-esterases and two beta-esterases. These male-specific alfa-esterases have in common the incapacity to cleave beta-naphtyl acetate in the absence of alfa-naphtyl, denoting a possible common function.

Electrophoretic mobility and staining patterns of bands point to the existence of at least three genetic loci present in every isofemale line studied. In its turn, male bands were thought to be controlled by other five other loci.

Two cases of double bands were detected in some isofemale lines. In the literature, such cases have been attributed to completely linked genes of different loci, to secondary isoenzymes or even to different mRNA_s resulting from differential splicing of the product of a single gene.

Esterase patterns in the hybrids were basically constituted by the sum of parental bands. However, some cases of esterases with increased activity, as well as esterases apparently suppressed in hybrids, were found. Both cases were attributed to regulatory mechanisms activated by hybridization.

The Similarity Index (SI) and the Analysis of Dependence (ANADEP) were calculated in an attempt to quantify the differentiation of the isofemale lines studied, on the bases of esterases bands.

Mean values of SI were used to separate isofemale lines into 5 classes: Class I - constituted by B2002 and B25D7; Class



II - constituted by B3iDi; Class III - including A55Fii, B52Qi and B50Q3; Class IV - including A75F3; and Class V - including D. buzzatii. W. N. Serun esterases. Two types of esterase (A and B)

Hydroly. On the basis of ANADEP data, however, isofemale lines could be divided into 4 classes, instead of 5, the difference being due to the grouping of isofemale lines in classes II and III. The comparison of these data on esterases with results on other features previously studied, using the same isofemale lines, shows that their separation by ANADEP test accords with data on reproductive isolation while their separation by CI test follows aedeagus and karyotype data. in *Drosophila pseudoobscura*.

Heredit. Both tests, however, are in accord with each other in the indication of A95F3 as presenting a different status relative to the other isofemale lines classified as D. serido, thus reinforcing data in literature which suggest the same. *Dros. Inf. Serv.*, v. 60, p. 52-53, 1984.

ARFAGAU, H., FOURNIER, D., TOUTANT, J. P. Analysis of acetylcholinesterase. Molecular forms during the development of *D. melanogaster*. Evidence for the existence of an amphiphilic monomer. *Insect Biochem.*, v. 18, n. 8, p. 539-545, 1988.

AYALA, F. J., POWELL, J. R., TRACEY, M. L., MOURZO, C. A., PEREZ-SALAS, S. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural population of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, v. 74, p. 113-139, 1972.

BAIMAI, V., SENE, F. M., PEREIRA, M. A. G. R. Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactus breeding species of the *Drosophila repleta* species group. *Genetics*, v. 80, n. 2, p. 81-91, 1983.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRIGE, W. N. Serum esterase. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenil acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.*, v. 53, p. 110-117, 1953.
- ARAV, R., RIMON, S. Purification and characterization of acetylcholinesterase from bull testes. *Bioch. Bioph. Acta*, v. 916, p. 313-320, 1987.
- ARNASON, E. An experimental study of neutrality at the malic dehydrogenase and esterase-5 loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Hereditas*, v. 96, p. 13-27, 1982.
- ARNASON, E., CHAMBER, G. B. Substrate specificity of esterase in *D. pseudoobscura* and *D. melanogaster* with notes on tissue localization of esterase-5 in *D. pseudoobscura*. *Dros. Inf. Serv.*, v. 60, p. 52-53, 1984.
- ARPAGAU, M., FOURNIER, D., TOUTANT, J. P. Analysis of acetylcholinesterase. Molecular forms during the development of *D. melanogaster*. Evidence for the existence of an amphiphilic monomer. *Insect Biochem.*, v. 18, n. 6, p. 539-545, 1988.
- AYALA, F. J., POWELL, J. R., TRACEY, M. L., MOURÃO, C. A., PEREZ-SALAS, S. V. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural population of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, v. 70, p. 113-139, 1972.
- BAIMAI, V., SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. R. Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactus breeding species of the *Drosophila repleta* species group. *Genetica*, v. 60, n. 2, p. 81-91, 1983.



- BAKER, W. K. R. Evolution of the alpha-esterase duplication within the *montana* subphylum of the *virilis* species group of *Drosophila*. *Genetics*, v. 94, p. 733-740, 1980.
- BARKER, J. S. F. Population genetics of *Opuntia* breeding *Drosophila* in Australia. In: BARKER, J. S. F., STAMER, W. T. (Ed.) *Ecological Genetics and Evolution in the cactus-yeast Drosophila Model System*. Sidney: Academic Press Australia, 1982. p. 207-224.
- BARKER, J. S. F., MULLEY, J. C. Isozyme variation in natural population of the *Drosophila buzzatii*. *Evolution*, v. 30, p. 213-233, 1976.
- BARKER, J. S. F., VACEK, D. C., EAST, P. D., STAMER, W. T. Allozymes and genotypes of *Drosophila buzzatii*: feeding and oviposition preferences for microbial species, and habitat selection. *Aust. J. Biol. Sci.*, v. 39, p. 47-58, 1986.
- BECKMAN, L., JOHNSON, F. H. Esterase variation in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, v. 51, p. 212-220, 1964.
- DICUDO, H. E. H. C., RICHARDSON, R. H. Gene regulation in *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* and their hybrids: the nucleolar organizer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 74, p. 3498-3502, 1977.
- DIZZO, N. M. V. Estudo sobre a biologia e isolamento reprodutivo de *Drosophila serido*. São Paulo, p. 71. 1980. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- CARRASCO, C. E., PÉREZ-CHIESA, Y., BRUCK, D. The esterases of *Drosophila dunni*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 77B, n. 3, p. 375-379, 1984.



- CERON, C. R. *Padrão de esterases no desenvolvimento de Drosophila mulleri, D. arizonensis e seus híbridos*. São Paulo, p. 142, 1988. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. *Model System*. Sidney:
- CERON, C. R., SANTOS, J. R., BICUDO, C. R. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 15, n. 1, p. 201-203, 1992. *Comp. Biochem.*
- COBBS, G. Polymorphism for dimerizing ability at the esterase-5 locus in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, v. 82, p. 53-62, 1976.
- COBBS, G., RUIZ, A. *Drosophila koepferae*: a new member of
- COBBS, G., PRAKASH, S. A comparative study of the esterase-5 locus in *Drosophila pseudoobscura*, *D. persimilis* and *D. miranda*. *Genetics*, v. 85, p. 697-711, 1976. *G. Biochemical and*
- CORDEIRO, J. A. *Analysis of dependency*. Campinas: Instituto de Matemática da Universidade Estadual de Campinas, 1987. (Relatório Técnico, n. 48/87).
- COSTA, R., DANIELI, G. A., MORDINI, E. Exceptional three-band heterozygotes at the esterases 6 locus in *D. melanogaster*. *Dros. Inf. Serv.*, v. 52, p. 31-32, 1977. *Ann.*, v. 264, n. 32, p.
- DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Methods and application to serum proteins. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, v. 121, p. 404-427, 1964. *Genic heterogeneity in natural population. I. The number of*
- DELMILING, O., TAYLOR, R. A. Esterase 25 (ES-25): identification and characterization of a new kidney argylesterase of the house mouse, genetically linked to Ly-10 on chromosome 12. *Biochem. Genet.*, v. 25, n. 9/10, p. 639-646, 1987.
- DELMILING, O., WASSMER, R. Genetic characterization of esterase-20 (ES-20) of the house mouse. *Biochem. Genet.*, v.



- 29, n. 1/2, p. 55-64, 1971. 777-78, 1971.
- CAST, P. D. Non-specific esterases of *Drosophila buzzatii*. In: BARKER, I. S. F., STAMER, W. T. (Ed.) *Ecological Genetics and Evolution. The ractus-yeast Drosophila Model System*. Sidney: Academic Press Australia, 1982. p. 320-339. 1980.
- FARMER, J. L., CARTER, M. W. Properties of partially purified allozymes of esterase-5 of *D. pseudoobscura*. *Comp. Biochem. physiol.*, v. 93b, n. 2, p. 451-459, 1987. *Univ. Texas Publ.*
- FONTDEVILA, A., PLA, C., HASSON, E., WASSERMAN, M., SANCHEZ, A., NAVEIRA, H., RUIZ, A. *Drosophila koepferae*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae) superespecies taxon. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 81, n. 3, p. 380-385, 1988.
- HEALY, M. J., DUMANCIC, M. M., OAKESHOTT, J. O. Biochemical and Physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, v. 29, n. 7/8, p. 365-388, 1971.
- HIGA, H. H., MANZI, A., VARKI, A. O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids. Purification, characterization, and properties of a glycosylated rat liver esterase specific for 2-O-acetylated sialic acids. *Biol. Chem.*, v. 264, n. 32, p. 19435-19442, 1989. *The esterases in the body tissues of*
- HUBBY, J. L., LEWONTIN, R. C. A molecular approach to the study of genic heterogeneity in natural population. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, v. 54, p. 577-594, 1966. (L): Optimum assay conditions.
- JOHNSON, F. M. A recessive esterase deficiency in *Drosophila*. *J. Hered.*, v. 55, p. 76-79, 1964.
- JOHNSON, F. M. Isozyme polymorphisms in *Drosophila ananassae*: Genetic diversity among island population in the south



pacific. *Genetics*, v. 68, p. 777-785, 1971.

JOHNSON, F. M., RICHARDSON, R. H., KAMBYSELLIS, H. P. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. III. Qualitative comparison of the esterases of *D. aldrichi* and *D. mulleri*. *Biochem. Genetic.*, v. 1, p. 237-247, 1960.

JOHNSON, F. M., KANAPI, C. G., RICHARDSON, R. H., WHEELER, H. R., STONE, W. S. XVIII. An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparison. *Univ. Texas Publ.*, v. 6615, p. 517-532, 1966.

JOHNSON, G. B. Enzyme polymorphism and metabolism. *Science*, v. 184, p. 28-37, 1974.

JUNGE, W. Carboxylesterases. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*, 3. ed. Weinheim: Chemie, 1984. v. 4, p. 2-7.

JUNGE, W., KILLES, H. Arylesterases. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*, 3. ed. Weinheim: Chemie, 1984. v. 4, p. 7-14.

KAMBYSELLIS, H. P., JOHNSON, F. M., RICHARDSON, R. H. Isoenzyme variability in species of the genus *Drosophila*. IV. Distribution of the esterases in the body tissues of *Drosophila aldrichi* and *D. mulleri* adults. *Biochem. Genet.*, v. 1, p. 247-265, 1968.

KAPIN, M. A., AHMAD, S. Esterases in larval tissue of gypsy moth *Lymantria dispar* (L.): Optimum assay conditions, quantification and characterization. *Insect Biochem.*, v. 10, p. 331-337, 1980.

KEITH, T. P. Frequency distribution of esterase-5 alleles in the two populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, v.



- 105, p. 135-155, 1900. J. L. Tissue localization of esterase 3
- KIDAMBI, S. P., MAHAN, J. R., MATCHES, A. G., BURKE, J. J.,
NUNNA, R. R. Genetic variability for esterase enzyme in
Onobrychis species. *Theor. Appl. Genet.*, v. 00, p. 433-436,
1990. *Faculdade de Biologia, São José do Rio Preto*, p. 103,
- KNIBB, W. R., EAST, P. D., BARKER, J. S. F. Polymorphic
inversion and esterase loci complex on chromosome 2 of
Drosophila buzzatii. I. Linkage disequilibria. *Aust. J. Biol.
Sci.*, v. 40, p. 257-269, 1987. M. C. *Isolamento reprodutivo e*
- KOROCHKIN, L. I., ARONSHTAM, A. A., MATVEEVA, N. M. Genetics of
esterases in *Drosophila*. III. Influence of different
chromosomes on esterase pattern in *Drosophila*. *Biochem. Genet.*,
v. 12, n. 1, p. 7-24, 1974. *of a sex pheromone in Drosophila*
- KORT, C. A. D., GRANGER, M. A. Regulation of the juvenile
hormone titer. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 26, p. 1-20, 1981. *of*
- LALMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly
of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685,
1970. *p. 1017-1037, 1970.*
- LEE, H., TO, R. J. B., LATIA, R. K., BIELY, P., SCHNEIDER, H.
Some properties of extracellular acetylxytan esterase produced
by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *App. Environ. Microbiol.*
v. 53, n. 12, p. 2831-2834, 1987. *seminal-fluid esterase 6 in*
- LEIBEL, W. S. An analysis of esterase activities from surgeonfish
tissues yields evidence of an atypical pseudocholinesterase.
Comp. Biochem. Physiol., v. 91B, n. 3, p. 437-447, 1980. *in two*
- LITH, H. A., BIEMAN, M., ZUTPHEN, R. F. M. Purification and
molecular properties of rabbit liver esterase ES-1A. *Eur. J.
Biochem.*, v. 104, p. 545-551, 1989.

- LUNDAY, A. J., FARMER, J. L. Tissue localization of esterase-5 in *Drosophila pseudoobscura*. *Biochem. Genet.*, v. 21, p. 453-463, 1983.
- MADI-RAVAZZI, L. Aspectos citogenéticos, reprodutivos e especiação em *Drosophila serido*. São José do Rio Preto, p. 106, 1988. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. *Genet.*, v. 23, p. 959-973, 1985.
- MADI-RAVAZZI, L.; RÍCUDO, H. E. H. C. Isolamento reprodutivo e pareamento cromossômico entre linhagens da superespécie *D. serido*. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 14, n. 3, p. 70, 1991.
- MANE, S. D., TOMPKINS, L., RICHMOND, R. C. Male esterase-6 catalyzes the synthesis of a sex pheromone in *Drosophila melanogaster* females. *Science*, v. 222, p. 419-421, 1983a.
- MANE, S. D., TEPPER, C. S., RICHMOND, R. C. Studies of esterase-6 in *D. melanogaster*. XIII. Purification and characterization of the two major isozymes. *Biochem. Genet.*, v. 21, p. 1019-1039, 1983b.
- MAREYNOLDS, M. S. Homologous esterases in three species of the virilis group of *Drosophila*. *Genetics*, v. 56, p. 527-540, 1967.
- MEIKLE, D. B., SHEEHAN, K. B., PHILLIS, D. H., RICHMOND, R. C. Localization and longevity of seminal-fluid esterase 6 in mated females *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, v. 36, n. 2, p. 93-101, 1990.
- HILLER, S., NOVAK, R. A comparative study of esterases in two strains of anopheline mosquitoes by isoelectric focusing. *Int. J. Biochem.*, v. 15, n. 12, p. 1409-1415, 1983.
- Syst. Ecol.*, v. 10, n. 5, p. 301-386, 1990.

- MIZIANTY, T. J., CASE, S. T. Demonstration of genetic control of esterase A in *Drosophila melanogaster*. *J. heredity*, v. 62, n. 6, p. 345-348, 1971.
- MORAES, M. A. M. Estudo do comportamento sexual de *D. serido*. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 14, n. 3, p. 104, 1971.
- HORTON, R. A., SINGH, R. S. Biochemical properties, homology and genetic variation of *Drosophila* "nonspecific" esterases. *Biochem. Genet.*, v. 23, p. 959-970, 1985.
- MOTOYAMA, M., DAUTERMAN, W. C. The role of non-oxidative metabolism in organophosphorus resistance. *J. Agr. Food. Chem.*, v. 22, p. 350-355, 1974.
- NARISE, S. Esterase isozymes of *Drosophila virilis*: purification and properties of alfa and beta esterases isozymes. *Jpn. J. genet.*, v. 40, n. 2, p. 119-132, 1973.
- NARISE, S., HURBY, J. L. Purification of esterase-5 from *Drosophila pseudoobscura*. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 122, p. 291-299, 1966.
- NATHER, F. C., SENE, F. M., PRADO, P. R. K., HANERIM, M. H. Estudo do padrão de som de machos durante a corte sexual de *D. serido*. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 14, n. 3, p. 100, 1971.
- OLIVEIRA, A. K., CORDEIRO, A. R. Genetics of esterase A and its relationship with developmental rate in selected strains of *Drosophila melanogaster*. *Rev. Bras. Biol.*, v. 42, n. 4, p. 725-731, 1982.
- PADHI, K. B., KHODA-BUKHSH, A. R. Xanthine dehydrogenase isozymes in twenty species of teleostean fishes: tissue distribution and possible taxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 10, n. 5, p. 381-386, 1979.



- PEN, J., RONGEN, H. A. H., BEINTEMA, J. J. Purification and properties of esterase-4 from *Drosophila mojavensis*. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 787, p. 203-207, 1984.
- PEN, J., SCHIPPER, A., RONGEN, H. A. H., BEINTEMA, J. J. Differences in specificity and catalytic efficiency between allozymes of esterase-4 from *D. mojavensis*. *Mol. Biol. Evol.*, v. 3, n. 4, p. 366-373, 1986. *Biochem. Genet.*, v. 14, p. 447-456.
- PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R., SENE, F. H. Notes on breeding and feeding sites of some species of the Repleta group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Cienc. Cult.*, v. 35, n. 9, p. 1313-1319, 1983. *ibid.*, v. 27, n. 12, p. 1403-1405, 1975.
- POLYAKOVA, E. V., KOROCHKIN, L. I. Investigation of the spectrum of esterase isoenzymes in various species of *Drosophila* of the virilis group. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, v. 22, n. 3, p. 156-161, 1986. *Science*, v. 207, p. 1403-1405, 1975.
- PRAKASH, S., LEWONTIN, R. C., HUBBY, J. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, v. 61, p. 841-850, 1969. M. A. Q. R., VILELA, C. R. Contrasting
- PROCUNIER, W. S., SMITH, J. J., RICHMOND, K. C. Physical mapping of the esterase-6 locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, v. 84, p. 203-208, 1971.
- RAUSCHENBACH, I. Y., LUKASHINA, N. S., BUDKER, V. G., KOROCHKIN, L. I. Genetics of esterases in *Drosophila*. IX. Characterization of the JM-esterase in *D. virilis*. *Biochem. Genet.*, v. 25, n. 9/10, p. 687-704, 1987.

- REEDER, R.H. rRNA synthesis in the nucleolus. *Trends Genet.*, v. 6, n. 12, p. 390-395, 1990.
- REEDER, R. H., ROAN, J. G. The mechanism of Dominance Nucleolar in *Xenopus* hybrids. *Cell*, v. 39, p. 39-40, 1984.
- RICHARDSON, R. H., SMOUSE, P. E. Patterns of molecular variation. I. Interspecific comparison of electromorphs in the *Drosophila mulleri* complex. *Biochem. Genet.*, v. 14, p. 447-466, 1976.
- RICHMOND, R. C., SENIOR, A. Esterase 6 of *Drosophila melanogaster*: kinetics of transfer to females, decay in females and male recovery. *J. Insect Physiol.*, v. 27, n. 12, p. 849-853, 1981.
- RICHMOND, R. C., GILBERT, D. G., SHEEHAN, K. B., GROMKO, M. H., BUTTERWORTH, F. H. Esterase 6 and reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Science*, v. 207, p. 1403-1405, 1980.
- RUIZ, A., FONTDEVILA, A., WASSERMAN, H. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. III. Cytogenetic relationships between two sibling species of the buzzatii cluster. *Genetics*, v. 101, p. 503-510, 1982.
- SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R. Contrasting patterns of differentiation inferred from traditional genetic markers in the process of speciation. *Pac. Sci.*, v. 42, n. 1-2, p. 01-30, 1980.
- SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R. Evolutionary aspects of cactus breeding *Drosophila* species in south America. In: *Ecological genetics and evolution*. Sidney: Academic Press, 1982. p. 97-166.

- SENE, F. M., VAL, F. C., VILELA, C. R., PEREIRA, M. A. G. R. Preliminary data on geographic distribution of *Drosophila* species in South America. *Pap. Avulsos Zool.*, v. 30, n. 22, p. 315-326, 1980. *Illis. Genet. Res.*, v. 31, p. 217-222, 1988.
- SHEEHAN, K., RICHMOND, R. C., COCHRANE, B. J. Studies of esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. III. The developmental patterns and tissue distribution. *Insect Biochem.*, v. 7, p. 443-450, 1977.
- AGNON, D., SIMON, J. P. Isoenzymatic variability
- SILVA, A. F. G. Sistemática de *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Cienc. Cult.*, v. 33, n. 7, p. 384, 1981.
- SILVA, A. F. G., SENE, F. M. Morphological and geographic variability in *D. serido* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v. 35, n. 2, p. 455-460, 1971. *Illis. Insect Biochem.*, v. 31, p. 217-222, 1988.
- STEINER, W. W. M., JOHNSON, W. E. Techniques for electrophoresis of hawainian *Drosophila*. *US - IBP. Island Ecosyst. Tech. Report.*, v. 30, p. 1-21, 1973.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. Diferenciação das populações de *D. serido*. Uma análise morfológica visando entender o processo de especiação. *Rev. Brasil. genét.*, v. 14, n. 3, p. 103, 1991.
- TOSI, D. *Análise das inversões cromossômicas de D. serido*. São Paulo, p. 42, 1982. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências- Universidade de São Paulo.
- MC, F. M. Preliminary
- TOSI, D., SENE, F. M. Further studies on chromosomal variability in the complex taxon *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Brasil. Genet.*, v. 12, n. 4, p. 729-745, 1989.
- C. H., HACKNESS, H. I. Esterases: problems of
- TSUITA, T., MIYADA, T., OKUDA, H. Purification of rat kidney carboxylesterase and its comparasion with other tissue



- esterases. *J. Biochem.*, v. 103, 327-331, 1989.
- TSUNO, K. Contribution of recombinant produced by females flies heterozygous for Est-alfa alleles to genic variation of *Drosophila virilis*. *Genet. Res.*, v. 51, p. 217-222, 1988.
- TSUNO, K., AOTSUKA, K. T., OHBA, S. Further genetic variation at the esterase loci of *Drosophila virilis*. *Biochem. Genet.*, v. 22, n. 3/4, p. 323-337, 1984. *Exp. Biol.*, v. 19, n. 66, 1989.
- VASSEUR, L., GAGNON, D., SIMON, J.-P. Isoenzymatic variability among population and varieties of wild leek (*Allium tricoccum*). *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 18, n. 5, p. 321-324, 1990.
- VENKATESH, K., CRAWFORD, C. L., ROE, R. M. Characterization and the developmental role of plasma juvenile hormone esterase in the adult cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem.*, v. 18, n. 1, p. 53-61, 1988.
- VILELA, C. R., SENE, F. M. Two new neotropical species of the "repleta" group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Pap. Avulsos Zool.*, São Paulo, v. 30, n. 20, p. 295-299, 1977.
- VILELA, C. R., SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. R. On the *Drosophila* fauna of chaco and east slopes in Argentina. *Rev. Bras. Biol.*, v. 40, n. 4, p. 837-841, 1980.
- VILELA, C. R., PEREIRA, M. A. Q. R., SENE, F. M. Preliminary data on geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brasil. II. The Repleta group. *Cienc. Cult.*, v. 35, n. 1, p. 66-68, 1983.
- WALKER, C. H., MACKNESS, H. I. Esterases: problems of identification e classification. *Biochem. Pharmacol.*, v. 32, n. 22, p. 3265-3269, 1983.

- WASSERMAN, M., RICHARDSON, R. H. Evolution of brasilian *Drosophila mulleri* complex species. *J. Hered.*, v. 78, p. 282-286, 1987.
- WHITNEY, P. J., VAUGHAN, J. G., HEALE, J. B. A disc electrophoretic study of the proteins of *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae*, and *Fusarium oxysporum* with reference to their taxonomy. *J. Exp. Bot.*, v. 19, n. 60, 1968.
- WHITTAKER, M. Cholinesterases. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*, 3. ed. Weinheim: Chemie, 1984. v. 4, p. 52-74.
- WILLADSEN, P., McKENNA, R. V., RIDING, G. A. Purification and characterization of an esterase from the tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochem.*, v. 17, n. 5, p. 659-664, 1987.
- WRIGHT, T. R. F. The genetics of an esterase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 100, p. 307-314, 1963.
- ZOUDS, E., DELDEN, W. Substrate-preference polymorphism at an esterase locus of *Drosophila mojavensis*. *Genetics*, v. 100, p. 307-314, 1982.
- ZOUDS, E., DELDEN, W., ODENSE, R., DIJK, H. An esterases duplication in *Drosophila*: differences in expression of duplicate loci within and among related species. *Biochem. Genet.*, v. 20, p. 927-942, 1982.



VIII. APÊNDICE

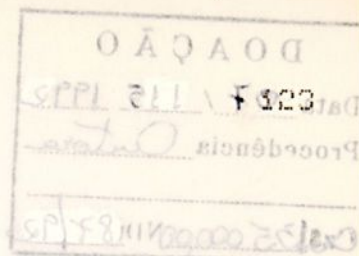


Tabela 8. Organização dos dados que permitiram a construção da figura 16

BANDA	B20D2	B25D7	B31D1	A55F11	B57Q1	B50Q3	A75F3	BUZ
3	0	0	0	0	0	0	0	98
5	70	0	2	89	53	21	5	0
7	0	0	100	56	83	53	0	0
9	01	85	100	56	0	0	100	0
9	0	0	0	0	0	0	0	98
10	0	85	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	100	11
12	0	0	100	100	100	82	0	0
13	29	4	100	100	100	100	20	15
15	100	93	0	0	6	2	0	0
16	95	93	0	0	0	0	0	5
17	87	67	0	0	7	0	0	22
23	0	0	87	15	97	17	3	0
24	86	16	0	82	34	88	98	0
28	0	0	0	0	0	0	54	0
29	0	0	0	0	0	0	98	100
30	0	0	84	50	49	53	0	0
31	100	99	99	81	77	92	0	0
36	100	100	100	100	100	100	100	100
37	0	0	30	46	56	47	0	0

