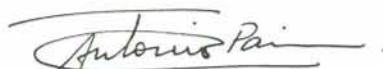


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**POLIMORFISMO ENZIMÁTICO E VARIAÇÃO
MORFOLÓGICA EM UMA POPULAÇÃO
NATURAL DE *Dryas iulia* (FABR. 1775)
(LEPIDOPTERA; NYMPHALIDAE).**



ANTONIO CARLOS PAIM

Dissertação realizada sob a orientação do Dr. Aldo Mellender de Araújo e co-orientação da Dra. Suzana Cavalli-Molina, apresentada ao curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Porto Alegre
1995

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o financiamento da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e projetos (FINEP) e Fundação de Amparo à pesquisa no Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Antônio Paim

Suzelma 557027
26/10/2006

À minha Mãe e às borboletas,
com amor.

AGRADECIMENTOS

Quando parei para escrever estes agradecimentos, muitos nomes povoaram minha lembrança e a rigor uma multidão de amigos, colegas, conhecidos e outros tantos deveriam preencher esta folha. Entretanto, optei por registrar aqui aqueles que agiram “*ex corde*”, sinceramente, sem nada esperar. Devo agir como diziam os antigos “*Reddite quae sunt Caesari Caesaris*”.

- Ao meu orientador Dr. Aldo Mellender de Araújo, um observador metódico, que empregando seu talento de “guru” de maneira tranqüila, jovial e incansável orientou e conduziu com segurança este trabalho ao longo destes anos todos.
- À Dra. Suzana Cavalli-Molina pela sua persistência em auxiliá-me, mesmo quando eu fazia tudo errado, parecendo mesmo não ter aprendido nada. Obrigado pela tua ajuda e pela “paciência de Jó”.
- À minha Mãe que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida e especialmente quando da confecção e reparo das redes entomológicas e pelas “guloseimas” deliciosas.
- À Vera Lúcia Valente Gaieski, “Verinha”, pela amizade, pelo carinho e pelo incentivo que me dispensou. Foi uma honra ter sido seu aluno.
- À amiga e irmã Karen Luisa Haag, “Alemoa”, pelos inestimáveis conselhos, pela amizade autêntica, pela ajuda onipresente, e pela paciência dispensada quando iniciou-me no uso do NCSS. Neste sentido, também foi fundamental a colaboração de Leonardo Lutz.
- Ao amigão Leonardo Lutz, “Leozinho”, e Marise Basso Amaral pela compreensão, incentivo e ajuda no estágio final deste trabalho, pois sem esses dois imensos corações esta dissertação certamente levaria mais tempo.
- Aos amigos: Cláudia Rohde, Gustavo Miranda, Luciano Basso da Silva e Juliana Nonohay, pela colaboração nos trabalhos de campo e no cuidado e alimentação das larvas.



- Às colegas: Clarice S. Alho, Lia Rejane Beviláqua, Cláudia Rocha, Gilson Cunha, Eliana Maria Assmann e Jorge B. Albuquerque, pela presença amiga, coleguismo e pela convivência estimulante de todo dia.
- Aos amigos Mozart da Silva Lauxen e Walter Frederico Strussmann amigos de “ceva e pizzaria” e pela “militância” ativa.
- À grande amiga Ivana que sempre se revelou uma pessoa magnânime principalmente nos momentos críticos de minha vida e que juntamente com Eduardo Velez estiveram sempre prontos a ajudar.
- Ao amigão Victor Hugo Valliatti pela ajuda no início do curso.
- À Lucia Pacheco que sempre estava pronta a ajudar na datilografia dos painéis.
- Ao amigo Elmo J. Cardoso o “mago” da secretaria, pela ajuda técnica sempre presente.
- Ao Mestre, professor, e colega Rocco Alfredo Di Mare, quem primeiro mostrou-me a beleza de estudar as borboletas, pelas discussões e indagações que me fizeram sempre ir além.
- Ao amigão Carlos Cesar da Silva Alves, o “gênio dos computadores” pelo auxílio inextimável no uso do Word 6.0.
- À Martina da Silva, pelo seu trabalho cuidadoso, incansável e pela convivência no Laboratório de Eletroforese.
- Ao amigo Lúcio Fernando Garcia que me acolheu com sua “simplicidade jesuítica” e pelas profundas discussões filosóficas ao vinho branco.
- Ao amigão Alexandre e a família Gonçalves Martins, pela ajuda e pelo acolhimento quando cheguei a Porto Alegre.
- Ao meu amigão, Marcio de Oliveira Buss - "Baxo" - companheiro de acampamentos em Itaara e escaladas ao morro do Elefante. Obrigado pela ajuda com a impressora.

- Ao amigo e prof. MSc. Alvaro G. Rossi pelo empréstimo do computador.
- À Maria Nilza Rossi pela ajuda e "apoio logístico" inestimável.
- Obrigado a todos os funcionários e amigos do departamento de Genética que de alguma maneira contribuíram durante a realização deste estudo.

**“Read not to contradict nor to believe
but to weigh and consider”.**

(Bacon)

Antonio

Sumário

Resumo	09
Abstract	11
1 Introdução	12
1.1 Conhecendo <i>Dryas iulia</i>	12
1.2 A complexidade do mundo vivo e a genética de populações	17
1.3 Do indivíduo à população e o paradoxo da rainha vermelha.....	19
1.4 Sobre o polimorfismo e a revolução da eletroforese.....	23
1.4.1 O polimorfismo enzimático em populações naturais.....	32
1.4.2 O polimorfismo enzimático em populações de borboletas.....	33
1.5 Da morfometria ou da variação do tamanho e seu significado	36
1.6 Objetivos.....	46
2 Material e Métodos	47
2.1 Características gerais da área estudada	47
2.2 Amostragens	51
2.2.1 Procedimentos de campo	51
2.3 Criação e manutenção de <i>Dryas iulia</i>	52

2.4	Procedimentos de laboratório	53
2.4.1	Medindo asas	53
2.4.2	Análise eletroforética	55
2.4.2.1	Homogeneização das amostras	55
2.4.2.2	Preparo dos géis e aplicação das amostras	56
2.5	Análise estatística.....	64
2.5.1	Exegese do tamanho	64
2.5.2	Do polimorfismo enzimático	65
3	Resultados	68
3.1	Razão sexual na natureza	68
3.2	Abundância e extinções: características demográficas e flutuações populacionais.....	69
3.3	Padrões da variação morfológica	72
3.3.1	Comparando tamanhos no tempo.....	73
3.4	Sobre o polimorfismo, frequências gênicas e genotípicas	80
3.4.1	Equilíbrio de Hardy-Weinberg para um e dois locos.....	96
3.4.2	Medidas da variabilidade genética.....	98
3.4.3	Estatística F.....	100
4	Discussão	102
5	Bibliografia	124

RESUMO

Dryas iulia pertence à subfamília Heliconiinae e é uma borboleta que prefere voar ao sol, sendo comumente encontrada em clareiras, bordas de florestas e matas secundárias. Ovoposita em espécies de Passifloraceae preferindo, em Porto Alegre e arredores *Passiflora suberosa* e *P. misera* (PÉRICO & ARAÚJO, 1991).

É abundante durante quase todo o ano, excetuando-se os meses frios de inverno, quando suas populações virtualmente se extinguem. Geralmente o maior tamanho populacional é registrado nos meses de abril e maio.

Do ponto de vista genético, *Dryas iulia* apresenta populações grandes e uniformes; em termos de estrutura genética elas se mostram compatíveis com o modelo do isolamento pela distância. Estudos realizados por HAAG (1992), HAAG e cols., (1993) mostraram que os valores de F_{ST} não diferiam de zero para várias amostras (“populações”) do Rio Grande do Sul. O componente devido ao endocruzamento (F_{IS}) também não diferiu de zero, embora seu valor numérico fosse mais elevado do que o esperado.

No presente estudo investigou-se amostras sequenciais (equivalentes a quatro gerações sucessivas) da região de Águas Belas, município de Viamão, RS, quanto a polimorfismos enzimáticos e variação morfológica.

Originariamente os critérios para escolha deste local, foram a detecção, em trabalhos anteriores, por HAAG (1992), HAAG e cols., (1993), de uma situação altamente sugestiva de associação não aleatória entre dois locos enzimáticos (EST e LAP) nesta população, além das medidas lineares realizadas nas asas anteriores mostrarem que os indivíduos dessa população são em média maiores quando comparados com os de outras. As amostragens ocorreram em maio de 1992, junho de 1992, março de 1993 e maio de 1993, (I, II, III e IV amostras respectivamente).

Baseado nos dados de polimorfismo enzimático para os locos *Mdh1*, *Mdh2*, *Pgm1*, *Pgm2*, *Aat1*, *Aat2*, *Est1*, *Est2* e α -*Gpdh*, a população local de *D. iulia* de Águas Belas apresentou, nas quatro amostras, os respectivos valores de heterozigosidade média por loco por indivíduo (H_o): 0,076 (junho/92), 0,097 (maio/92), 0,103 (março/92) e 0,122 (maio/92). O menor valor para este parâmetro ocorreu no inverno, provavelmente por perda de alelos raros devido ao acaso. A proporção de locos polimórficos (P) variou de

55% a 66% entre as referidas amostras, enquanto que o número de alelos por loco (A_e), variou de 1,0 a 5,0, com uma média de 2,36 alelos por loco; o número efetivo de alelos variou de 1,0 a 2,2 alelos por loco. Quase todos os locos apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto *Pgm1* e *Pgm2*, cujos desvios foram significativos, ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) nas amostras I e II, respectivamente.

A estatística F foi utilizada no presente trabalho considerando-se as quatro amostras como representativas de locais diferentes, os valores de F_{IS} e F_{ST} não diferiram de zero, confirmando achados anteriores.

Com relação ao comprimento e perímetro das asas, verificou-se que existem diferenças significativas entre os períodos de coleta ($p < 0,05$). Os menores valores para estas características ocorreram no inverno respectivamente 3,18cm e 7,0cm para machos, 3,05cm e 6,66cm para fêmeas; os maiores valores ocorreram no verão 3,58cm e 7,88cm (machos), 3,52cm e 7,80cm (fêmeas). Também foi demonstrado que existem diferenças entre os sexos, consistentes em todas as amostras sendo os machos, em média, maiores do que as fêmeas e apresentando uma menor variância para esta característica. Estas diferenças foram observadas em todas as amostras coletadas em ABE, e em outras localidades (HAAG & ARAÚJO, 1994). Tais diferenças parecem conferir uma maior autonomia de vôo aos machos e uma maior distância percorrida, bem como maiores chances de escape a predadores, além do que os capacitará a atuarem como agentes dispersantes. Estudos adicionais, não constantes desta Dissertação, indicam que os machos pesam em média menos do que as fêmeas.

Os achados até o momento sugerem, assim, possibilidade de seleção sexual, com as fêmeas escolhendo machos cujos tamanho e perímetro de asa sejam maiores, e próximos a um valor ótimo, implicando em importantes consequências evolucionárias.

Abstract

Dryas iulia is a butterfly that belongs to the subfamily Heliconiinae; it is usually found in forest edges or clearings and among secondary vegetation. They prefer to fly in sunny places, one to three meters above the ground. Females lay their eggs on species of Passifloraceae, particularly, in the outskirts of Porto Alegre, on *Passiflora suberosa* and *P. misera*.

This butterfly is abundant along the year except in the winter when the populations go down nearly extinction. Their greater size normally occur in April and May.

The genetic structure of *D. iulia* populations fit the isolation by distance model. Previous studies by HAAG (1992), HAAG et al. (1993) showed that F_{ST} values are not different from zero in several samples ("populations") from Rio Grande do Sul, so also the inbreeding component (F_{IS}), although numerically greater than the former. In the present study sequential sampling from Águas Belas was done, in May and June 1992 and March and May 1993. These samples were named I, II, III, and IV respectively. The area chosen belongs to the Viamão district and is mainly formed by secondary vegetation associated with *Eucalyptus* species. It was already included in the work of HAAG (1992) where a non-random association between the loci *Est1* and *Lap1* was described.

Results for nine enzymatic loci (*Mdh1*, *Mdh2*, *Pgm1*, *Pgm2*, *Aat1*, *Aat2*, *Est1*, *Est2*, and α -*Gpdh*) showed similar values for the mean heterozygosity per locus per individual (H) in the four samples (0.097 sample I; 0.076 sample II; 0.103 sample III and 0.122 sample IV). The smaller values for H were found in winter-sample II - probably due to loss of rare alleles. Only *Pgm1* and *Pgm2* do not fit the Hardy-Weinberg equilibrium. The proportion of polymorphic loci (P) ranged from 0.55 to 0.66. The number of alleles per locus (A) was between 1 and 5 with an average of 2.36; the effective number of alleles (A_e) ranged from 1 to 2.2 per locus.

Inter-sample comparisons were made for alleles and genotypes distributions according to the Λ statistics (SHIELDS &HEELER, 1979) for three distinct conditions: (a) all samples treated simultaneously; (b) between the two samples prior the winter bottleneck and (c) between the two samples after the winter. The loci *Mdh1*, *Pgm2*, *Aat1* and *Est2* showed significant differences for at least one of the above situations.

An analysis of the F statistics was performed as if the samples were a subdivision of a single population. For both F_{IS} and F_{ST} no evidence was found to reject the null hypothesis.

Morphological variation was measured by wing length and perimeter. An analysis of variance considering the four periods of study for each variable showed statistical differences ($p < 0.05$), with the average for the winter being smaller for both sexes. For wing length these values were 3.18 cm (males) and 3.05 cm (females); for wing perimeter, 7.00 cm and 6.66 cm respectively. The largest values were observed in the summer, being 3.58 cm (males) and 3.52 cm (females) for wing length and 7.88 cm (males), 7.80 cm (females) for wing perimeter. Consistent differences (all samples) were verified between the sexes, males being greater than females, in the average and with smaller variance. The same was reported by HAAG and ARAÚJO (1994) within the Águas Belas populations as well as in relation to other localities. These findings are suggestive of a strong male ability to fly greater distances or to escape predators, being responsible probably by a large proportion of the gene flow. On the other hand females would exert sexual selection through the choice of males with larger wings, perhaps close to an optimum.

Antonio

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conhecendo *Dryas iulia*

Os insetos têm beneficiado os humanos de muitas maneiras ao longo da história. Estes benefícios podem ser agrupados em três categorias principais que são: intelectual, econômico e ecológico. Na esfera intelectual os insetos, dada a sua vasta diversidade, contribuem de maneira inquestionável para a nossa fascinação pelo mundo natural. Borboletas, libélulas e outros insetos aumentam incontestavelmente a beleza da Terra, e seu simbolismo tem figurado proeminentemente na arte e literatura de todas as culturas. As ciências da Genética, Biologia evolucionária e Medicina estariam hoje muito atrasadas não fosse o uso criativo de *Drosophila* e vários Lepidoptera.

Em termos econômicos pode-se citar a constante luta entre produtores rurais e os insetos herbívoros, a produção do mel e da seda, entre outros. O valor ecológico não é facilmente diferenciado do seu papel econômico, uma vez que muitas das funções desempenhadas pelos insetos nos ecossistemas têm conseqüências, das quais dependemos biologicamente. A este respeito a polinização por insetos deve ser citada, visto que plantas que afetam-nos biologicamente e esteticamente requerem insetos polinizadores, tanto quanto os necessitam nossas lavouras. Além disso, devido a sua aparência conspícua e suscetibilidade a fatores ambientais, as borboletas são capazes de fornecer informações

sobre mudanças nas características ambientais dos ecossistemas, servindo como notáveis indicadores biológicos (PYLE e cols., 1981).

Alguns grupos de organismos são especialmente adequados para estudos evolucionários, como por exemplo, moscas *Drosophila*, o caracol *Cepaea* e os tentilhões de Darwin. Entre os grupos apropriados, devem ser incluídas as borboletas da região Neotropical, especialmente as da família Nymphalidae com seus heliconíneos, sua grande radiação adaptativa, seus complexos miméticos envolvendo muitas espécies, e.g., anel tigre, anel laranja etc. Na realidade, FORD (1975) já enfatizava a adequabilidade das borboletas para estudos evolutivos, ao dizer: “their wing-patterns do provide exceptional opportunities for detecting phenotypic variation” (p.9).

DRYAS

Dentro dos lepidópteros, *Dryas* chama atenção pela sua ampla distribuição geográfica, desde o sul dos Estados Unidos ao norte do Uruguai (De VRIES, 1987). Apesar dessa extensa distribuição, não apresenta qualquer diferenciação morfológica (i.e., diferentes padrões na coloração das asas, como acontece em *Heliconius spp.*).

MABILDE (1896) foi o primeiro naturalista colecionador a arrolá-la em seu “Guia Practica para os principiantes colleccionadores de Insectos” para o Rio Grande do Sul, referindo-se a ela como *Colaenis julia*, seu antigo epíteto específico.

Dryas iulia pertence à família Nymphalidae, tribo Heliconiini, na qual encontramos os gêneros *Agraulis*, *Dione*, *Dryadula*, *Podotricha* e *Philaethria*, além daquele que dá nome à tribo, *Heliconius*. *Agraulis vanillae* e *Dione juno* são conhecidas como os principais inimigos da cultura do maracujá na América. Todos estes, com exceção de *Heliconius*, compartilham uma característica conspícua: a venação da asa

posterior falha na formação da célula discal fechada, uma condição tida como ancestral (BROWN, 1981). Essa ancestralidade tem sido corroborada por evidências moleculares (GILBERT, 1991; BROWER, 1994).

As fêmeas costumam copular mais de uma vez, e ambos os sexos apresentam um comportamento poligâmico (obs. pessoal, PIANKA e cols., 1977, BROWN, 1981; GARCIAS, 1983). Os ovos de *Dryas* são postos isolados em gavinhas secas ou ocasionalmente sobre a vegetação associada. Suas larvas são canibais. As plantas hospedeiras utilizadas são espécies de *Passiflora* (maracujá-do-mato) do subgênero *Plectostema*, especialmente *Passiflora suberosa* e *P. misera*, as mais abundantes em vários locais do Rio Grande do Sul. Também utilizam espécies do subgênero *Granadilla*: *Passiflora elegans*, *P. actinia* e *P. caerulea*, embora estas confirmem um valor mais baixo para a taxa de desenvolvimento quando comparadas com os valores registrados para larvas alimentadas com espécies do subgênero *Plectostema* (PÉRICO & ARAÚJO, 1991). O uso de mais de um subgênero para ovoposição é considerado uma característica primitiva e aparece também em *Agraulis vanillae*. As larvas passam por quatro estágios, que sob condições ideais, podem durar em torno de 17 dias, alcançando então o estágio de pupa que apresenta uma duração média de nove dias. Geralmente as pupas são encontradas na posição vertical, em ramos mortos, próximas ao solo (obs. pessoal, BROWN, 1981). Após este período emerge da pupa o adulto. Em geral, a duração de todo ciclo sob condições controladas de temperatura e umidade, não ultrapassa vinte e oito dias (obs. pessoal; GARCIAS, 1983).

De um modo geral, encontramos os imagos em todos os microhabitats da região neotropical, embora sejam claramente mais abundantes em bordas e clareiras de matas secundárias e florestas ou bosques perturbados, preferindo locais abertos com luz solar direta. Talvez venha daí o nome: δρυαζ (dryás), que em grego significa “carvalho, a árvore de Zeus”, essa ninfa era encarregada do cuidado dos bosques, sendo por isso encontrada em suas imediações (BRANDÃO, 1991). Alimenta-se de néctar de muitas espécies de flores, segundo GILBERT (1991) flores não especializadas à polinização por borboletas, preferindo aquelas com corolas pequenas de coloração chamativa, por exemplo: *Lantana camara*, *L. selowii*, *Euphorbia pulcherrima* e *Impatiens balsamina*.

É imediatamente distinguida pela coloração laranja-brilhante da superfície dorsal de suas asas e pela cor negra na borda das mesmas. As fêmeas são mais escuras e opacas quando comparadas com os machos. Apresenta um vôo rápido, agitado e regular, o que rendeu-lhe os sugestivos nomes populares de “fogo no ar” ou “labareda” (BIEZANKO & LINK, 1972). Segundo informa CHAI (1988; 1990), é uma espécie relativamente palatável, e parece evitar a predação através do vôo rápido.

No estado do Rio Grande do Sul, voa nos meses de temperatura amena, primavera, verão e outono, não sendo avistada nos meses frios de inverno, quando suas populações provavelmente se extinguem, salvo nos locais com o chamado “inverno quente” (Depressão Central e noroeste do Estado) cujas médias mínima de 11°C e máxima de 23°C são verificadas nos meses de junho e agosto.

Dryas iulia compartilha um padrão de coloração com alguns membros da tribo Heliconiini, com os quais compõe o chamado “anel mimético mülleriano laranja”, ou

simplesmente anel laranja, que GARCIAS (1983) dividiu em dois, baseando-se na coloração das asas (padrões dorsal e ventral).

Um ponto ainda obscuro é se a semelhança morfológica apresentada pelas espécies que integram o anel laranja, bem como outros anéis, seja devido a convergência, onde espécies não relacionadas se assemelham no padrão de coloração, compartilhando características por terem evoluído sob regimes de seleção similar em ambientes similares, ou se essas características se devam a que todas estas espécies sejam oriundas de um ancestral comum.

Esta espécie vem sendo objeto de estudos ecológico-evolutivos em populações naturais no Rio Grande do Sul há alguns anos (ARAÚJO & VALENTE, 1981; GARCIAS, 1983; HAAG, 1988; PÉRICO & ARAÚJO, 1991; HAAG e cols., 1993; HAAG & ARAÚJO, 1994).

Recentemente HAAG (1992), (ver também HAAG & cols., 1993 e HAAG & ARAÚJO, 1994), comparando seis populações naturais detectou em uma das populações estudadas, Águas Belas (ABE), município de Viamão, a ocorrência de uma associação não aleatória (desequilíbrio de ligação) entre dois locos enzimáticos (*Est1* e *Lap1*), e um desvio significativo em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para um loco de fosfoglicomutase (*Pgm2*). Além disso a análise morfológica realizada com medidas das asas anteriores, mostrou que a população de ABE juntamente com a população de Sapucaia (área do Parque Zoológico), diferenciou-se das demais com as quais foram comparadas, sendo que naquelas, a dimensão linear tomada em centímetros, da inserção da asa ao ápice desta (comprimento da asa) mostrou-se significativamente maior.

Dryas iulia apresenta populações grandes, não subdivididas onde os principais agentes responsáveis pela uniformidade tanto genética quanto morfológica seriam os machos. Esta suposição é apoiada por evidências oriundas da análise do polimorfismo enzimático e da morfometria.

1.2 A complexidade do mundo vivo e a abordagem da genética de populações

A diferenciação das populações em determinados padrões geográficos é um fato amplamente conhecido. Diferenças sutis no entanto, podem ocorrer em locais muito próximos. Na região de Itapuã, localizada a 60 km de Porto Alegre, ocorrem simpatricamente as espécies de *Passiflora misera* e *P. suberosa* sendo ambas abundantes na mata que margeia a Lagoa Negra. Todavia, a medida que nos elevamos no terreno *P. misera* vai desaparecendo, de tal forma que na cota 50-60m acima do nível da lagoa, somente *Passiflora suberosa* é encontrada (ARAÚJO com. pess.). Ora, isso pode representar diferenças de nicho ecológico muito importantes em um nível espacial extremamente pequeno. Talvez o exemplo mais conhecido seja os “efeitos de área” (“area effects”) que ocorrem na diferenciação de populações do gastrópodo *Cepaea nemoralis* (CAIN & CURREY, 1963). BROWN (1976) criou o termo “microrrefúgios”, para a diferenciação no comportamento, ecologia e genética de *Heliconius spp.* no estado de São Paulo. À semelhança dos refúgios do quaternário, porém em escala muito reduzida, esses locais poderiam abrigar comunidades de insetos e plantas bem particulares. Para entendermos o papel das interações genético-ecológicas e as abordagens populacionais devemos partir de um esquema simplificado do funcionamento dos organismos.

Os organismos são, em última análise, uma cadeia de eventos iniciando nos genes; estes codificam proteínas enzimáticas que catalisam reações bioquímicas determinando padrões de respostas e reações celulares. Estas reações determinam características fisiológicas e morfológicas que possibilitam os organismos sobreviver e reproduzirem-se em um dado ambiente. Entretanto os ambientes são complexas interações de fatores bióticos e abióticos. No mundo real os ambientes não são iguais, existindo fatores que influenciam o estado fisiológico e comportamental ou a adaptação resultante dos indivíduos. Estes fatores exibem uma descontinuidade em muitas escalas no espaço e no tempo. Desta forma processos operando ao nível dos organismos individuais podem determinar propriedades das populações (KOEHL, 1989). Para DOBZHANSKY (1970), os ambientes não são constantes nem uniformes, e em ecossistemas terrestres a mais óbvia teia de fragmentos espaciais é aquela criada pela distribuição da vegetação (WIENS, 1976); em qualquer tempo diversos genótipos são necessários para explorá-los. Além disso, os organismos necessitam manter a adaptação a estes ambientes para que possam se estabelecer como populações .

Devido à dificuldade de se estudar toda a cadeia de fenômenos que liga a variação genética à adaptação aos ambientes, pode-se abordar a questão de duas formas distintas. Uma seria conhecer as frequências genótípicas, como elas mudam no tempo e no espaço e tentar ligar à essa observação algum fator explicativo. A outra abordagem usa a distribuição de fenótipos de duas ou mais gerações consecutivas, caracterizadas por uma média e uma variância, para a partir disso, inferir os fatores evolucionários atuantes (LEWONTIN, 1974; GRANT, 1986; GRANT & GRANT, 1993). Essas duas abordagens

tem desempenhado importante papel no avanço do nosso entendimento do processo evolutivo no tempo.

1.3 Do indivíduo à população e o paradoxo da rainha vermelha

Podemos definir uma população como sendo o conjunto de indivíduos distribuídos no espaço a um dado tempo (coexistência espacial e temporal) de tal maneira que haja possibilidade de intercruzamento entre eles. Para estudar uma população é necessário reconhecer seus componentes individualmente, i.e., saber se os indivíduos são unitários ou modulares. Esta distinção se faz necessária para que perguntas como: em que estágio do ciclo de vida encontram-se os indivíduos, em que proporção um indivíduo difere do outro etc. possam ser respondidas. Além disso a dinâmica de uma população deve ser descrita de modo que possamos compreender certas questões sobre: que fatores determinam as flutuações no número de indivíduos, porque algumas populações flutuam pouco e outras apresentam grandes flutuações, que fatores são importantes na manutenção do número de indivíduos (KREBS, 1985; BEGON & MORTIMER, 1986; LAWTON, 1988). Podemos caracterizar uma população por parâmetros descritivos ou demográficos e estruturais ou genéticos. Os parâmetros descritivos tem o objetivo de descrever e explicar a distribuição e a abundância dos organismos no espaço e no tempo. São também chamados de processos demográficos e procuram definir o valor de N (número de indivíduos), a taxa de nascimentos, mortalidade e migração, os quais são influenciados por fatores bióticos e abióticos. Ao nível dos parâmetros estruturais ou genéticos uma população é caracterizada por sua estrutura genética, isto é, o conjunto de frequências

gênicas e genóticas e sua dinâmica. Este é um conceito fundamental em evolução e conservacionismo, pois informa como a variabilidade está “empacotada” ou estruturada na natureza. Assim, populações com elevado valor de f (coeficiente de endocruzamento) apresentam-se geneticamente empobrecidas, como ocorre em uma espécie de felinos do sul da África, *Acynonix jubatus jubatus* (“cheetah”) (O’BRIEN & WILDT, 1983; O’BRIEN e cols., 1985; RAYMOND & O’BRIEN, 1993), com o elefante marinho da América do norte, *Mirounga angustirostris* (BONNELL & SELANDER, 1974) e com a borboleta *Paranassius mnemosyne* no sul da França (DESCIMON & NAPOLITANO, 1993). Tais populações são extremamente vulneráveis a pressões seletivas, estando desse modo mais propensas a extinções.

Por um lado, entender o padrão da amplitude e frequência das flutuações populacionais é um dos problemas centrais em ecologia, uma vez que eventos de extinção e recolonização podem aumentar a oportunidade para a atuação da deriva e fluxo gênico (SLATKIN, 1985; McCAULEY, 1988). Todavia para se conseguir esse entendimento é necessário que populações sejam acompanhadas no tempo. A genética de populações, por outro lado, preocupa-se com a dinâmica dos genes nas populações e suas mudanças no tempo. Deste modo um importante papel no avanço do nosso entendimento da complexidade do mundo vivo é desempenhado pela conexão da genética de populações com a ecologia e a biologia populacional (FORD, 1975; MERREL, 1981). Todos concordamos em algum grau com a proposição de que a natureza é de grande complexidade. Para entender essa complexidade é necessário o uso de modelos que simplifiquem o padrão complexo do mundo, extraindo elementos simples e examinando-os

(FUTUYMA, 1992). YABLOKOV (1986) enfatiza a importância do estudo da evolução a partir das populações, uma vez que sob o ponto de vista genético, um número menor do que 100 espécies de animais tem sido estudadas.

Virtualmente todos os fatores ambientais variam, e é importante distinguir a variação espacial da temporal. Fatores que afetam uma população em um dado local podem não afetar de modo apreciável a sobrevivência em outro local. Populações locais expostas a diferentes estados do ambiente podem tomar caminhos evolutivos bastante diversos. Entretanto, a escala espacial na qual o ambiente varia depende efetivamente da distância quase os membros da espécie tipicamente se deslocam (LEVINS, 1968; HOWE & WESTLEY, 1988).

Uma população que vive num ambiente e o explora é composta por organismos que variam quanto à eficiência nesta atividade, em função de suas características morfológicas e fisiológicas. Deste modo mudanças evolucionárias podem ser detectadas e estudadas em organismos vivos, pelo estudo de suas características fenotípicas, no tempo ecológico. Tem sido sugerido que os principais avanços evolucionários são o resultado da interação entre condições especiais do ambiente que apresentam um desafio particular, e a resposta para esta mudança por parte das populações que estão preparadas para responder em virtude de um potencial latente de seleção apropriado (STEBBINS & HARTL, 1988). Esta resposta leva a alterações nas frequências de fenótipos, de muitos genes diferentes mas interatuantes (STEBBINS, 1982). Todavia é errôneo pensar nas populações ou espécies como simples recipientes passivos de um rigoroso destino externo; elas

participam ativamente numa troca dialética entre organismos e ambiente (FUTUYMA, 1992).

Os organismos não usam todo o espaço físico de um ambiente, somente aquele que é de relevada importância para suas necessidades (e.g., atividades ligadas a sua fisiologia, comportamento, reprodução, etc.); assim o ambiente é delimitado a partir da percepção dos organismos (i.e., da *umwelt* dos mesmos) e depende do “design” ou “bauplâne” destes (GOULD, 1988). Deste modo, mesmo que possamos ver os organismos de uma população em toda parte numa referida área, efetivamente eles estão usando somente uma fração dela, o nicho ecológico fundamental, que é o conjunto de recursos e fatores físicos que permitem a sobrevivência e a reprodução (HOWE & WESTLEY, 1988). *Ipsa facto*, há uma relação direta entre as dotações genéticas possíveis dos organismos e seu meio ambiente. DOBZHANSKY (1970) usou a expressão “conjunto gênico coadaptado” referindo-se ao sistema de genes que interagem harmonicamente dentro de uma população local.

Levando em consideração tudo o que foi dito acima, pode-se afirmar que para existir, uma população deve estar adaptada ao seu ambiente imediato, i. e., a maioria de seus indivíduos devem possuir genótipos e fenótipos que os capacitem a sobreviver e reproduzir. Para persistir, uma população deve ser capaz de permanecer adaptada. Sua estrutura genética deverá ser suficientemente flexível para que novos genótipos surgidos possam ser perpetuados em resposta às inevitáveis mudanças no ambiente (METTLER e cols., 1988). Podemos imaginar como VAN VALEN (1973) que as populações acompanham o curso do ambiente, correndo como faziam Alice e Rainha Vermelha no

país das maravilhas. Como a Rainha Vermelha e Alice, as populações constantemente estão “correndo” para permanecerem no mesmo lugar (i. e., adaptadas). É claro que esta é apenas uma metáfora, as populações não “correm, seguem ou mudam” ativamente, elas mudam devido a que genótipos mais competitivos substituem aqueles menos adaptados através da seleção natural (FUTUYMA, 1992).

1.4 Sobre o polimorfismo e a revolução da eletroforese

A diversidade genética é onipresente na natureza, *ubique et nusquam* (por toda parte e sempre), um fato de observação usual. O exame dos organismos que nos rodeiam, pertençam eles ao reino animal ou vegetal, mostra uma grande variação; os filhos se diferenciam dos pais, os irmãos não só distinguem-se facilmente entre si, como apresentam características morfológicas distintas que os fazem diferentes de outros parentes.

O inexorável processo da mutação garante uma contínua produção de novas variantes, enquanto o igualmente inexorável processo de adaptação ao ambiente e a deriva genética moldam a distribuição da diversidade genética no espaço e no tempo. A amplitude do modo pelo qual as populações podem responder aos desafios do ambiente é determinada pelo estoque de variação genética contida nas populações que compõem a espécie. A variabilidade se apresenta de duas maneiras distintas: a variação contínua e a descontínua. Na variação contínua, freqüentemente chamada quantitativa ou morfométrica, temos, entre dois extremos de uma distribuição de freqüências, uma infinidade de valores intermediários, e. g., peso e altura em humanos; enquanto que na

variação descontínua também chamada de polimórfica não há intermediários entre as classes, grupos sanguíneos por exemplo (ENDLER, 1986).

A diversidade genética pode ser abordada sob o ponto de vista estatístico, uma vez que é também uma propriedade de um grupo de indivíduos, população ou amostra, sendo deste modo caracterizada por média e variância.

O surgimento da técnica de eletroforese de proteínas provocou grandes mudanças na abordagem dos problemas propostos pela genética de populações, a partir da década de 60. A eletroforese em gel é uma técnica satisfatória e simples que separa proteínas baseada na carga elétrica e no tamanho das moléculas. Uma vez que proteínas são o produto quase direto dos genes, a variação de mobilidade em uma dada proteína enzimática geralmente representa variação no segmento de DNA que a codificou. Além disso, por ser uma técnica simples, torna possível o estudo da variação genética com um investimento moderado de tempo e dinheiro (AYALA, 1982).

Dois aspectos principais atraíram os pesquisadores para esta técnica: (1) a detecção de uma quantidade de variação impressionante e (2) esta se mostrou ser hereditária. Através desta abordagem, tem sido possível estimar a quantidade de variabilidade genética em populações e espécies, estudar o padrão temporal e/ou geográfico desta e determinar o grau de divergência entre diferentes níveis taxonômicos (SELANDER & WHITMAN, 1983; LEWONTIN, 1991).

Em menos de trinta anos nosso conhecimento do tipo, da natureza e da extensão da variação genética aumentou dramaticamente com o uso desta técnica. Enquanto em 1960, muitos geneticistas estavam preocupados com a aparente pobreza de variação

disponível para as mudanças evolucionárias, a maior preocupação dos evolucionistas atuais é explicar como esta vasta quantidade de variação genética que de fato existe pode ser mantida nas populações naturais (HARTL & CLARK, 1989; HARTL, 1991).

A definição de polimorfismo foi apresentada por FORD (1940) como: “a ocorrência conjunta numa mesma localidade de duas ou mais formas descontínuas de uma espécie em uma proporção tal, que a mais rara delas não possa ser mantida meramente por mutação recorrente”. A partir de 1966 o conceito de polimorfismo foi revisto para abranger os dados revelados pela eletroforese, e MORTON (1967) propôs que um gene seria considerado polimórfico quando suas variantes alélicas apresentassem frequências entre 99% e 1%; esta definição contém alguma arbitrariedade porém é de grande valor prático.

No final da década de 20, Tshetverikov formulou claramente a doutrina básica daquela que mais tarde seria conhecida como teoria sintética da evolução. Ele sugeriu que a mutação seria a fonte de matéria prima para a seleção e que as populações na natureza absorveriam mutações como uma esponja se enche de água, conservando essa variação potencial na forma de heterozigotos. Com base nisso, a tarefa dos geneticistas de populações seria explicar como essa variabilidade seria mantida (SPIESS, 1989). Uma dúvida ecoa no tempo desde então, a variabilidade onipresente na natureza existiria por acaso ou por necessidade?

Os primeiros resultados obtidos com a técnica de eletroforese mostraram uma grande variabilidade. Dos 18 locos observados por LEWONTIN & HUBBY (1966) e HUBBY & LEWONTIN (1966), em cinco populações naturais de *Drosophila*

pseudoobscura, em média 30% eram polimórficos, e a heterozigidade média, 11,5%. Para a população humana estudada por HARRIS (1966), valores comparáveis, foram obtidos: 30% e 9,9% para proporção de locos polimórficos e heterozigidade média, respectivamente.

Com evidência acumulada da ocorrência universal deste extensivo polimorfismo protéico em populações naturais, as tentativas de explicação para o significado evolucionário deste, logo tornaram-se polarizadas. Alguns pesquisadores acreditam que a maioria da variação natural pode ser importante fisiologicamente e conseqüentemente estaria sobre controle seletivo, enquanto outros consideram-na como “ruído” evolucionário, sem efeito fenotípico, sendo deste modo seletivamente neutra.

A teoria selecionista argumenta que a manutenção dos polimorfismos em populações naturais seja conseqüência de alguma forma de seleção natural balanceadora e dependente de freqüência, além de diferenças na adaptação em diferentes épocas do ano, e pela existência de diferentes habitats dentro de uma mesma região (FORD 1975; CLARKE 1975; ROUGHGARDEN 1979; CLARKE e cols., 1988). Embora NEI (1988) questione a importância da seleção dependente de freqüência como mantenedora da variabilidade genética ao nível do DNA e proteínas, modelos têm mostrado que a seleção estabilizadora e dependente de freqüência, atuando sobre um caráter quantitativo, podem manter um certo número de locos em estado polimórfico e heterozigosidades elevadas nas populações (MITTON, 1978; CLARKE e cols.; 1988). Logo, a velocidade e a direção da evolução seriam predominantemente determinadas pela seleção, com a mutação

representando apenas um papel subsidiário. Devido a essa característica a teoria seletcionista é também chamada de teoria neo-darwiniana.

A chamada teoria neutralista foi formulada originalmente por KIMURA (1968), KING & JUKES (1969), e postula que a pressão de mutação teria um papel predominante, aliado à deriva genética, na evolução ao nível molecular. Sugere, deste modo, que a maioria da variação observada seja devida essencialmente a mutações cujas frequências nas populações são consequência da deriva e migração. Esta variação é fisiologicamente irrelevante; os alelos são adaptativamente equivalentes e sua variação aleatória. Assim a variação que permanece polimórfica consiste de alelos transientes, de efeito deletério muito leve ou nenhum efeito sobre o organismo (KIMURA & OHTA, 1971; LEWONTIN, 1985; KIMURA, 1991). Segundo LEWONTIN (1974), dependendo do enfoque dado, as teorias seletcionistas e neutralistas não seriam mutuamente exclusivas. É possível que toda a variação nas formas enzimáticas existentes em uma população seja neutra e que todas as diferenças entre espécies, acumuladas durante o processo evolucionário sejam adaptativas; como também é possível, que a variação na população seja mantida por seleção balanceadora, porém o processo de especiação que pode envolver populações inicialmente pequenas e isoladas possa levar à fixação ao acaso de variantes genéticas não adaptativas.

Apesar da técnica de eletroforese em gel ser de inquestionável valor, apresenta limitações, levando a uma subestimativa da variabilidade real existente nas populações. Inicialmente acreditava-se que somente mutações que levam a alterações na carga elétrica das proteínas podiam ser detectadas, isto é, somente aquelas substituições de aminoácidos

que alteram suficientemente o pI da proteína para que esta mova-se a uma diferença detectável no gel, ou seja, apresentem carga elétrica diferente. Como, dos 20 aminoácidos conhecidos, apenas cinco possuem carga elétrica, e os 15 restantes são neutros, apenas uma porcentagem de 25% dos casos de substituição seriam detectados. Todavia a migração diferencial das proteínas não se baseia somente na carga elétrica, mas também no peso molecular e na conformação das moléculas protéicas, provocando deste modo alterações na mobilidade eletroforética (SHAW, 1965). O primeiro estudo detalhado preocupado em elucidar o quanto de variação escondida existe em populações naturais foi conduzido por SING e cols. (1976). Através deste trabalho foi desenvolvida a técnica de eletroforese seqüencial (SAGE), no qual as classes eletroforéticas estabelecidas pela condição padrão, foram testadas em pHs, tampões e concentração de géis diferentes. Esta técnica foi testada para o sistema enzimático da Xantina desidrogenase (XDH) em *Drosophila pseudoobscura*; num total de 146 linhagens isogênicas, amostradas em 12 populações. Onde somente oito alelos haviam sido detectados com a técnica padrão, a nova técnica revelou 37 alelos. Resultados posteriores, baseados no uso desta técnica mostraram que pode ser detectado em torno de 86% a 93% de todas as substituições de aminoácidos em diferentes posições da cadeia polipeptídica (KOEHN, 1983).

Várias tentativas de discriminar entre as teorias “neutra” e “seletiva”, tem sido feitas, baseando-se nas frequências gênicas e genotípicas, número de alelos e medidas de heteroziguidade dentro e entre populações e espécies. Parece que qualquer padrão pode ser acomodado por uma ou outra teoria, se adequadas suposições forem feitas sobre: taxa de mutação, migração, tamanho populacional, valores seletivos e fatores históricos

(CLARKE, 1979). Em outras palavras, os dados não podem acomodar-se a nenhuma teoria de maneira satisfatória (LEWONTIN, 1974; SING e cols., 1976; CLARKE, 1979; LEWONTIN, 1985). Experimentalmente pode-se discriminar entre as duas teorias, pois a teoria da neutralidade é uma hipótese nula, implicando uma ausência de efeitos determinísticos e sistemáticos. Para Sewal Wright, a evolução tornar-se-ia um processo muito mais inteligível se baseada na seleção natural entre sistemas interagentes, do que em locos separadamente (WRIGHT, 1982). Pela primeira vez temos dados de qualidade e detalhe necessários para testar várias hipóteses acerca das forças operando sobre a variação (LEWONTIN, 1985).

Na mais extensa revisão publicada até o momento sobre estudos da variabilidade alozimática, envolvendo 1111 espécies com médias de 23 locos e 200 indivíduos por espécie examinada, incluindo desde bactérias, fungos, plantas vasculares e avasculares, muitos filos de invertebrados, especialmente insetos e moluscos e vertebrados dos peixes ao homem, (NEVO e cols., 1984) encontraram uma correlação com características ecológicas, demográficas e da história de vida dos organismos, concluindo que a estrutura genética e a diferenciação das populações e espécies em escala local, regional e global, sugerem que na natureza o polimorfismo e heterozigosidade são mantidos e explicados através da seleção natural em todas as suas variadas formas, em todos os estágios do ciclo de vida, através da interação com a deriva genética e mutação.

NEVO e cols. (1988) mostraram que o padrão alozimático encontrado em *Triticum dicoccoides* estava positivamente correlacionado com a disponibilidade de água no solo e com o tipo de solo, topografia e mudanças temporais onde este se desenvolvia.

Evidência considerável tem sido acumulada, desde então, sugerindo que uma quantidade substancial do polimorfismo protéico revelado pela eletroforese em populações naturais, mostra um padrão ecogeográfico.

Assim, para entender a realidade, a onipresença e o significado da variabilidade, deve-se incorporar nos experimentos fatores bióticos e abióticos, (e. g., patógenos, competidores, natureza do substrato e condições climáticas) que operam no mundo real (NEVO e cols., 1984).

Um exemplo de polimorfismo mendeliano que parece ser mantido pela heterogeneidade do ambiente é o padrão de coloração e bandejamento da concha no caracol *Cepaea nemoralis*. Muitos estudos tem indicado que esse polimorfismo é mantido pela predação diferencial dos indivíduos nos quais o padrão de coloração e bandejamento da concha não corresponde apropriadamente ao “background” do habitat. Particularmente neste caso, a variação morfológica é consistente com a variação enzimática (JOHNSON, 1976; HEDRICK e cols., 1976; HEDRICK, 1986). Em outros casos (TURNER e cols., 1979) essa concordância entre evolução morfológica e evolução molecular parece não haver, o que foi demonstrado para o padrão de coloração das asas e o polimorfismo enzimático em heliconíneos. Em *Heliconius erato* e *Heliconius melpomene*, genes que controlam o padrão de coloração das asas parecem ter evoluído de acordo com o modo “clássico”, i.e., apresentam-se monomórficos e homozigotos, dentro das raças; mostrando uma descontinuidade genética abrupta entre as raças. Este padrão sugere uma substituição gênica rápida, postulado pelo equilíbrio pontuado (TURNER, 1988), enquanto que as alozimas teriam evoluído de modo “balanceado”, i.e., apresentam elevado nível de

polimorfismo, baixo grau de diferença alozimática e ausência de descontinuidade genética entre as raças. Esta íntima associação da variabilidade, taxa de evolução e mutabilidade para enzimas indicam que estas estão divergindo gradual e continuamente. Este não é modo de evolução para os genes responsáveis pelo padrão de coloração das asas; estes, claramente não adaptam-se à associação geral de variabilidade e taxa de evolução, tendo divergido consideravelmente, mantendo-se, entretanto, homozigotos dentro das populações.

E quanto a outros polimorfismos, como o cromossômico por exemplo? A literatura sobre este assunto é muito vasta, e não é propósito deste trabalho fazer aqui uma revisão exaustiva sobre o mesmo. Apenas para exemplificar, desde muito cedo, foi mostrada a vantagem da manutenção dos polimorfismos de inversão em cromossomos de *Drosophila*. Heterozigotos para determinada inversão, apresentam algumas vezes maior viabilidade, fecundidade ou habilidade para acasalamento do que os indivíduos homozigotos; essa observação, aliada aos dados obtidos por eletroforese, têm conduzido a sugestão de que altos níveis de heterozigosidade e polimorfismo aumentam a homeostasia no desenvolvimento (DOBZHANSKY, 1948; MITTON, 1978; EANES, 1978). Estudos com *Drosophila willistoni* no Rio Grande do Sul, tem corroborado essas associações especialmente com as estações do ano, bem como com a heterogeneidade ambiental (VALENTE & ARAÚJO, 1985, 1986). Ainda em *Drosophila*, experimentos mostraram que o polimorfismo para inversões podem exibir flutuações sazonal e latitudinal. Assim, cada complexo de genes contido em uma ou mais inversões conferiria adaptação à

condições locais e às diferentes épocas do ano (DOBZHANSKY & PAVLOVSKY, 1953; DOBZHANSKY, 1974).

1.4.1 O polimorfismo enzimático em populações naturais

Os primeiros estudos da variabilidade genética, realizados antes da década de 1960, em populações naturais, lidavam em sua maioria com caracteres morfológicos, por exemplo, bandeamento de conchas em caracóis, padrões de asas em lepidópteros e mutações recessivas raras em mosca das frutas (LEWONTIN, 1991). Esses estudos em nada esclareceram o nosso entendimento sobre a variação existente a nível gênico, uma vez que a relação entre fenótipo e genes não é fácil de ser estabelecida. Embora tenham proporcionado modelos individuais para o estudo da evolução em ação, não ficava claro quão geral era o quadro da variação genética que eles representavam. Uma aproximação mais satisfatória foi possível graças ao uso da técnica de eletroforese.

A teoria darwiniana de evolução através da seleção natural nos diz que dentro dos limites impostos pelas mudanças ambientais a adaptação tenderá a aumentar; este aumento na adaptação é causado pela reprodução diferencial de determinados fenótipos em uma população. O aumento do valor adaptativo decorre também do grau de variabilidade presente nas populações (COOK, 1991). Esta tendência foi expressa por FISHER (1958) como o “teorema fundamental da seleção natural”.

Enzimas diferindo em sua mobilidade eletroforética, como resultado de diferentes alelos de um gene são chamadas alozimas. O polimorfismo para estes alelos é

extremamente espalhado, sendo encontrado virtualmente em todas as populações já estudadas (HARTL & CLARK, 1989).

A partir da observação das frequências encontradas para cada variante alélica pode-se estimar parâmetros como heterozigosidade média por loco por indivíduo, proporção de locos polimórficos e número médio de alelos por loco (H, P e A, respectivamente), além disso, pode-se descrever a estrutura genética das populações.

Não raro observa-se uma deficiência de heterozigotos que pode ser devido ao endocruzamento ou pelo efeito da subdivisão. Atenção deve ser dada a esta, pelo simples fato de que pode ocorrer virtualmente em amostras de todas as populações naturais, provocando o que é chamado de efeito Wahlund (HARTL & CLARK, 1989). Não podemos, entretanto, esquecer o papel do ambiente, que flutuando temporalmente pode erodir a variação, especialmente aqueles representados por alelos em baixas frequências (GRANT & PRICE, 1981). Não se pode deixar de mencionar aqui, a possibilidade de que muitos trabalhos da literatura contenham erros de interpretação quanto à deficiência de alguns genótipos, simplesmente devido às limitações algébricas e epistemológicas contidas nos testes de equilíbrio (SCHAAP, 1980; VALENZUELA, 1985; 1993).

1.4.2 O polimorfismo enzimático em populações de borboletas

O polimorfismo enzimático em lepidópteros, tem sido pouco estudado relativamente a outros organismos (revisões em LIMA 1979; SILVA, 1989; HAAG, 1992). Entretanto, os dados gerados por tais estudos são de grande valor para o entendimento da evolução destes organismos. Com relação a α -GPDH (α -glicerofosfato

desidrogenase), uma enzima importante no vôo dos insetos, sendo necessária para produção ininterrupta de ATP, o qual é usado na contração dos músculos, encontrou-se que, em *Colias spp*, existe um notável “cline” nas frequências dos alelos deste loco. Num transecto, compreendendo diferentes altitudes, foi observado que o polimorfismo e a frequência de heterozigotos era maior em altitudes elevadas do que em médias e baixas altitudes (JOHNSON, 1976c). Este gradiente observado está diretamente relacionado com a temperatura, uma vez que nos ambientes montanhosos a temperatura média do ar é muito variável, enquanto que em médias e baixas altitudes a variação é menor. Foi sugerido que uma forte seleção estaria atuando sobre este loco, ou sobre outro proximamente ligado. BURNS & JOHNSON (1971) encontraram um rico polimorfismo em esterase (EST) em várias populações locais da borboleta *Hemiargus isola* (Lycaenidae); uma esterase dimérica, apresentou grande variabilidade nas populações analisadas, no Texas. A variação encontrada é controlada por alelos múltiplos, esta alta variabilidade foi atribuída a uma vantagem dos heterozigotos associado a uma “heterogeneidade ambiental não detectada”. Os autores sugerem também que a heterogeneidade ambiental, conjuntamente com certo nível de migração entre as populações seja responsável pela manutenção dessa situação e pela homogeneidade entre as populações.

Em *Parnassius mnemosyne* (Papilionidae), uma espécie de borboleta ameaçada de extinção na França, foi detectado através da técnica de eletroforese horizontal em gel, um baixo valor para a heterozigosidade média (entre 4% e 18%) e uma baixa proporção de locos polimórficos (30%) (DESCIMON & NAPOLITANO, 1993). Em *Heliconius*

erato, análise eletroforética para o sistema das esterases, realizada com indivíduos da natureza, revelou muitos locos, dois deles foram analisados com profundidade, *Est-E* e *Est-H*, estando o primeiro controlado por quatro alelos com frequências entre 0,12 e 0,36, e o segundo loco com três alelos cujas frequências ficaram entre 0,25 e 0,42. Embora não tenha sido observado desvio significativo com relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, encontrou-se um pequeno excesso de homozigotos, que sugeriu-se ser devido ao efeito Wahlund e ao endocruzamento (LIMA & ARAÚJO, 1982).

Em outro estudo conduzido na mesma espécie foram analisados cinco populações em diferentes locais no estado do Rio Grande do Sul, para verificação da estrutura genética e do polimorfismo enzimático. Três sistemas enzimáticos foram analisados fosfoglicomutase (PGM), leucina aminopeptidase (LAP) e malato desidrogenase (MDH). As cinco localidades apresentaram um significativo componente devido ao isolamento. O componente devido ao endocruzamento, F_{IS} foi igual a 0,2153, o que não difere da estimativa obtida por Di MARE & ARAÚJO, (1986) que ficou em 0,20 utilizando uma outra metodologia. O valor do componente F_{ST} foi igual a 0,0798, o que sugere que o fluxo gênico entre as populações seja reduzido, permitindo a diferenciação genética. A proporção de locos polimórficos (P) revelado foi igual a 75%, enquanto que a heterozigosidade média por loco por indivíduo ficou em 22-29% (SILVA 1989; SILVA & ARAÚJO, 1994).

O que temos então a partir de tudo isto, para as borboletas? Parece haver uma concordância de que algumas associações indicam um significado adaptativo para a variabilidade, podendo ser argüido que o polimorfismo enzimático pode constituir-se

numa “estratégia” adaptativa, tendo um efeito tamponante sobre o desenvolvimento, aumentando a homeostasia, atuando de forma a minimizar a redução no “fitness”, legada pela heterogeneidade do ambiente.

Embora possamos vislumbrar em linhas gerais e com algum detalhe o modo de evolução para algumas espécies, o significado de alguns polimorfismos existentes em populações naturais de lepidópteros, permanece ainda obscuro e devido a isto um muito maior número de dúvidas emerge de todo esse quadro.

1.5 Da morfometria ou da variação do tamanho e seu significado

Muitas das características de grande interesse para os evolucionistas incluindo os aspectos morfológicos, como o tamanho por exemplo, variam de maneira contínua. Tem sido freqüentemente mostrado que estas características quantitativas resultam de efeitos combinados de alelos de alguns a muitos locos genéticos (FALCONER, 1989; KIRKPATRICK, 1982). Assim, um fenótipo individual é a soma dos efeitos devido ao genótipo e dos efeitos devido ao ambiente.

Biólogos, particularmente fisiologistas, estão à tempo a par de que o tamanho dos organismos está associado com características da história de vida destes (GOULD, 1966; HESPENHEIDE, 1973; SWEET, 1980; BARBAULT, 1988). De fato, o tamanho do corpo e de estruturas relacionadas à captura do alimento e escape dos predadores, importantes na adaptação dos organismos ao ambiente, não são variáveis meramente descritivas. Um ponto chave, de concordância geral, tem sido o papel representado pelo tamanho do corpo ou de estruturas, na competição de animais que coexistem, levando-nos

à sugestão de que, presumivelmente animais de diferentes tamanhos, utilizam recursos tróficos de tamanhos diferentes, desta maneira reduzindo a competição e permitindo a coexistência (SIMBERLOF & BOECKLEN, 1981; DALY, 1985; BLACKBURN e cols., 1993). Para insetos, o tamanho do abdômen na eclosão, é esperado ter importantes e profundos efeitos sobre o valor adaptativo particularmente naqueles lepidópteros limitados em sua ingestão de nutrientes na fase adulta (BOGGS, 1981; WICKMAN & KARLSSON, 1989). Além disso, como foi salientado por GILBERT (1984a) é considerado axiomático que, para a maioria dos artrópodos, o aumento do tamanho e/ou do peso resulta em uma fecundidade aumentada. Em outras palavras, a quantidade total de nitrogênio do corpo está fortemente correlacionada com o peso da pupa e este, com o tamanho das asas. Todavia esta relação pode não ser tão linear quanto parece, particularmente para os lepidópteros, onde o peso em algumas espécies, embora um bom indicador do número de ovos contidos em uma fêmea individual, pode diferir significativamente do número de ovos realmente depositados (LEATHER, 1988). Entretanto, um organismo não é uma coleção de objetos discretos (as “características”), mas entidades integradas atuando em conjunto (GOULD & LEWONTIN, 1979). Este aspecto traz informações adicionais para o entendimento das relações entre variabilidade morfológica e evolução, porém a sintonia fina de uma população às condições ambientais requer algum grau de independência entre as partes do corpo (LEWONTIN, 1978). Isto requer uma análise estatística da variação fenotípica (incluindo variâncias e correlações) e do valor adaptativo como uma função de todo o fenótipo (BARTON & TURELLI, 1989).

Morfometria é a descrição quantitativa, análise e interpretação da forma, da variação da forma e do tamanho em biologia, talvez melhor caracterizada como o estudo do tamanho e suas conseqüências (GOULD, 1966; SWEET, 1980; DALY, 1985). Medidas da diversidade morfológica são de profundo interesse em estudos genéticos e ecológicos (ROHLF, 1990); além disso, quando associadas a outras variáveis permite-nos entender as causas da variação em maior detalhe do que o estudo de uma ou outra separadamente (SINGH & LONG, 1992).

O tamanho de uma estrutura, tal como o comprimento da asa, por exemplo, é esperado ser maior em espécies de tamanho grande do que nas de tamanho pequeno. A questão é saber se o tamanho varia como uma proporção constante do tamanho do corpo ou com alguma outra característica, ou varia desproporcionalmente. Em outras palavras, pode-se perguntar se a forma permanece constante ou muda. Quando a razão entre duas características permanecer a mesma através da amplitude absoluta da variação do tamanho, a inclinação da reta que representa essa relação, em uma escala logarítmica é 1,0; referimo-nos a isto como isometria. Quando a inclinação diferir de 1,0 devido a mudança sistemática nas proporções, a relação é definida como alométrica. De um modo geral o estudo recai sobre a alometria intrapopulacional, algumas vezes referida como alometria estática, pois esta descreve as relações entre características dos indivíduos, geralmente adultos, dentro de uma população (GOULD, 1966; GRANT, 1986, 1991).

Caracteres morfológicos são interessantes pois são determinados por uma fração mais ou menos extensa do genoma, sendo tradicionalmente assumido como a soma dos efeitos de muitos locos, onde há aditividade, dominância, epistasia e pleiotropia,

produzindo uma distribuição gaussiana de frequências na população (BARTON & TURELLI, 1989). Além disso, esses caracteres mostram uma rápida resposta às condições ecológicas possibilitando assim estudos menos demorados (FORD, 1975).

Transcrevo aqui, *in extenso*, a visão apresentada por DARWIN sobre o tamanho e seu significado:

“With insects of all kinds the males are commonly smaller than the females; and this difference can often be detected even in the larval state. So considerable is the difference between the male and female cocoons of the silkworm (*Bombyx mori*), that in France they are separated by a particular mode of weighing. In the lower classes of the animal kingdom, the greater size of the females seems generally to depend on their developing an enormous number of ova; and this may to a certain extent hold good with insects. But Dr. Wallace has suggested a much more probable explanation. He finds, after carefully attending to the development of the caterpillars of *Bombix cynthia* and *yamamai*, and especially to that of some dwarfed caterpillars reared from a second brood on unnatural food, “that in proportion as the individual moth is finer, so is the time required for its metamorphosis longer; and for this reason the female, which is the larger and heavier insect, from having to carry her numerous eggs, will be preceded by the male, which is smaller and has less to mature”. Now as most insects are short-lived, and as they are exposed to many dangers, it would manifestly be advantageous to the female to be impregnated as soon as possible. This end would be gained by the males being first matured in large numbers ready for the advent of the females; and this again would naturally follow, as Mr. A. R. Wallace has remarked, through natural selection; for the smaller males would be first matured, and thus would procreate a large number of offspring which would inherit the reduced size of their male parents, whilst the larger males from being mature later would leave fewer offspring. There are, however, exceptions to the rule of male insects being smaller than the females: and some of these exceptions are intelligible. Size and strength would be an advantage to the males, which fight for the possession of the females.” (DARWIN, 1871, p. 405)

Note que no sentido original de Darwin, *seleção natural*, para maximização do sucesso reprodutivo cai (por definição) totalmente sob a rubrica da *seleção sexual*

(ELDREDGE, 1993). Esta é, para Darwin, “a vantagem que certos indivíduos têm sobre outros indivíduos do mesmo sexo e espécie, em relação exclusiva à reprodução”.

Uma interessante explicação, baseada no registro fóssil, foi sugerida por Cope, paleontólogo francês, segundo a qual haveria uma tendência para o aumento do tamanho dentro de uma linhagem ao longo da evolução. Entre as vantagens apontadas como explicação para essa tendência estão: uma melhor capacidade de capturar a presa ou escapar de predadores, grande sucesso reprodutivo, inteligência aumentada (com o aumento no tamanho cerebral), melhor capacidade de resistência, tamanho expandido da amplitude de alimentos aceitáveis, decréscimo na mortalidade anual, longevidade individual expandida e aumento na retenção de calor por unidade de volume (STANLEY, 1973). Devido a inúmeras exceções serem conhecidas, o conceito como “lei” tem sido rejeitado.

→ Características morfológicas têm sido estudadas especialmente em *Heliconiini* (*Heliconius erato* e *H. melpomene*), (TURNER e cols., 1979, TURNER, 1988), Ithomiinae, Heliconiinae (STRAUSS, 1990) e Papilionidade (YOUNG, 1972; VÄISÄNEM e cols., 1991; DESCIMON & NAPOLITANO, 1993; WEST, 1994), quanto ao padrão de coloração das asas sob o ponto de vista taxonômico, ecológico, genético e evolutivo em ambos os níveis, de populações e espécies. O interesse aqui no uso de medidas morfológicas está relacionado a estimativas da quantidade e do padrão da variação em sucessivas gerações ou épocas do ano. Embora seja um dos mais importantes atributos dos organismos, o tamanho tem surpreendentemente recebido pouca atenção em biologia. Mesmo quando é discutido, há algumas vezes uma apologia por considerá-lo um assunto

que é principalmente tratado pela literatura popular. Entretanto a literatura popular está certa em seu cru entendimento, o tamanho de um organismo afeta ele próprio e sua interação com outros, na comunidade, em muitas e importantes maneiras (BROWN & MAURER, 1986). Pode-se ainda dizer que o tamanho e a forma, devido a sua importância, tem atraído atenção, e tem sido esporadicamente tratados em estudos eruditos, no mínimo desde Galileu (GOULD, 1966).

Comparações feitas entre heliconíneos e itomíneos, grupos de relacionamento filogenético muito próximo, revelou, com base em 21 medidas morfométricas, que as relações alométricas são particularmente importantes, devido às variações no tamanho contribuírem com mais de 90% da variação morfológica total da asa (STRAUSS, 1990). Este autor sugere que um grande heliconíneo e um grande itomíneo são morfologicamente mais similares entre si do que entre heliconíneos e itomíneos pequenos, i.e., estes grupos são muitos mais diferenciados no tamanho pequeno e convergem a uma forma comum em tamanhos maiores. Entretanto, além de analisar 1 a 3 indivíduos por espécie, negligenciando desta forma a variabilidade populacional, foi desconsiderada também a variação geográfica e temporal além do dimorfismo sexual. KLACZKO & BITNER-MATE (1990), ajustaram uma elipse à asa de *Drosophila*, enquanto que MARKOW & RICKER (1992), relataram que, na natureza, o sucesso do macho na cópula, parece estar relacionado com o tamanho, sendo que machos maiores obtiveram maior sucesso, quando comparados com machos menores. Além disso, em muitas espécies de animais, machos e fêmeas alcançam diferentes tamanhos de corpo quando adultos. Os processos subjacentes a tais diferenças sexuais são sem dúvida complexos e podem envolver a interação entre

influências genéticas adaptativas e não adaptativas de um lado e variáveis ambientais de outro (SHINE, 1990).

Em inúmeros estudos de genética e ecologia de insetos, tem sido mostrado que o tamanho das asas tem importante papel como caráter adaptativo. Em *Colias philodice*, verificou-se que a frequência de cópula está associada ao tamanho do macho. A fêmea desta borboleta estaria “escolhendo” entre os machos, aqueles de tamanho maior, uma vez que foi verificado que aquelas copulam preferencialmente com machos grandes (MARSHAL, 1982). Em trabalho recente, DEINERT e cols., (1994) observaram uma situação aparentemente contraditória. Em *Heliconius hewitsoni* ocorre “pupal mating”, isto é, cópula momentos antes da eclosão da fêmea; os autores verificaram que os machos que pousam nas pupas são os de maior tamanho de asa e maior tamanho corporal. Todavia aqueles que efetuam a cópula são em média menores do que os que não copulam. A explicação encontrada para os achados baseia-se na correlação entre os caracteres analisados (comprimento de asa e do corpo) e na hipótese de que um deles seja o alvo da seleção, enquanto o outro caráter sofreria um efeito indireto.

← Planeta
Terra
(Leo Grasso)
D. 1991 BCR

STANLEY (1973) sugeriu, invocando a regra de Cope, que a mudança no tamanho aperfeiçoaria a adaptação, sempre que o nicho permanece estável; em outras ocasiões o nicho original é alterado, levando a alterações marcantes no tamanho dos organismos. Todavia as dimensões ótimas, em qualquer um dos casos, serão alcançadas através de alterações no tamanho dos organismos.

Em espécies de grilos, *Anabrus simplex* e *Metabalus spp.* o tamanho das fêmeas é de suma importância. Nestas espécies, as fêmeas competem pelo acesso aos machos,

uma vez que estes investem pesadamente na prole sob a forma de proteínas; algumas fêmeas são bem sucedidas na obtenção de parceiro para cópula e conseqüentemente do espermatóforo. Estas fêmeas tendem a ser maiores que os machos, já que estes discriminam as maiores e mais pesadas e rejeitam as mais leves e menores. A preferência por fêmeas maiores e mais pesadas representaria a preferência por fêmeas mais fecundas (THORNHILL & GWYNNE, 1986). O aumento do tamanho médio representaria uma vantagem na competição por melhores recursos para alimentação, maior e melhor território; *propter hoc*, a seleção sexual direcionaria o polimorfismo das populações.

Entre os passeriformes, encontramos o “*red-winged blackbird*”, *Agelaius phoeniceus*, relacionado ao “garibaldi”, *Agelaius ruficapillus* nativo no estado do Rio Grande do Sul. Naquela espécie, os machos são 20% maiores nas dimensões lineares e 50% mais pesados do que as fêmeas. As fêmeas estariam escolhendo os machos maiores, uma vez que estes adquirem e defendem maiores e melhores territórios; além disso auxiliam no cuidado e alimentação da ninhada. Deste modo a seleção sexual atuaria fortemente sobre esta espécie, levando a um acentuado dimorfismo sexual nas características sexuais secundárias (SEARCY & YASUKAWA, 1983). Novamente aqui, vemos que o tamanho representa um papel importante na adaptação medida pelo sucesso reprodutivo, i.e., número de descendentes, sendo este uma função linear do tamanho do harém mantido pelo macho.

Voltando aos insetos, verificou-se em um estudo com mamangavas (*Bombus spp.*), que a variável tamanho da asa, foi a característica morfológica mais importante na explicação da variação no tempo de vôo destes organismos. O tempo de vôo está

positivamente relacionado com o tamanho da asa, de forma que mamangavas menores voam mais rápido em distâncias pequenas do que as maiores, entretanto mamangavas maiores voam distâncias mais longas. Além disso, o comprimento da glossa (língua), o tamanho do corpo e o comprimento linear da asa, apresentam influência marcante sobre o comportamento alimentar, de modo que mamangavas que se alimentam em uma determinada espécie de flor são morfologicamente mais semelhantes entre si (HARDER, 1985).

Em *Heliconius erato phyllis*, um caráter quantitativo analisado foi o número de pontos vermelhos, os “red raylets”, que ocorrem na face ventral das asas posteriores (PANSERA & ARAÚJO, 1983). Essa característica não difere entre os sexos, porém há evidências de que diferenças encontradas, quando se segue a população ao longo das estações, estejam associados à temperatura, pois o número médio de “red raylets” foi mais baixo nos meses frios do ano do que naqueles onde a temperatura foi mais elevada. Isto estaria indicando a ação do ambiente (no caso a temperatura) sobre a distribuição dos pontos vermelhos. OLIVEIRA & ARAÚJO (1992) mostraram que as diferenças no número médio de “red raylets” foram estatisticamente significantes entre as estações, com os menores valores médios ocorrendo na primavera e os maiores no verão e outono. Deste modo estaria ocorrendo sobre este caráter morfológico, uma variação cíclica, provavelmente atribuível à seleção.

Tendências fenotípicas podem estar associadas à alguma combinação de variáveis ambientais (BRYANT & TURNER, 1978), e devido ser esta variância produzida pelo ambiente apenas uma parte da variação fenotípica, seria aconselhável avaliar o quanto

determinado caráter quantitativo é influenciado pelo genoma através da estimativa da herdabilidade do mesmo (BRYANT, 1977; BALDWIN & BRYANT, 1978; BRYANT, 1981).

Fêmeas de *Grillus firmus*, como também de *G. integer* e *G. bimaculatus*, espécies de grilos da areia, copulam preferencialmente com machos grandes. Uma explicação para este fato seria a de que, machos de tamanho grande apresentam maiores testículos, relativo ao tamanho do corpo (7,5% do tamanho deste), o que sugere que os machos estão destinando uma significativa quantidade de energia para produção de espermatozoides e fluidos seminais. Além disso, estes machos estariam em vantagem em interações agonísticas com outros machos, (ROFF & FAIRBAIRN, 1993). Entretanto para se afirmar o aspecto adaptativo de um caráter, é necessário compreender como ele funciona e sua história natural, i.e., em que está baseado sua existência. Embora não possamos examinar diretamente os eventos ocorridos no passado, podemos verificar como um determinado caráter facilita ou limita a capacidade dos organismos em utilizar o meio ambiente e como o mesmo evolui em resposta à seleção (HAMILTON, 1958; GOULD, 1990; LOSOS, 1990).

Tem sido demonstrado, para insetos em geral, que quanto maior a asa menor a frequência de batimentos (DANFORTH, 1989). Em *Lucilia sericata*, verificou-se que o consumo de oxigênio no início do vôo é da ordem de 3000 μ l/min/g de peso, o que fornece uma relação de 50 a 100 vezes maior do que o consumo no estado de repouso.

Lepidópteros apresentam músculos de vôo do tipo sincrônico clássico, onde a excitação está acoplada à contração (músculos de morfologia afibrilar) apresentando taxas

relativamente lentas de batimentos (5 a 30/s) podendo voar geralmente algumas horas com enormes taxas respiratórias sem desenvolver débito significativo de oxigênio (REES, 1977). Deste modo, asas mais longas confeririam resistência ao inseto, permitindo uma maior duração e um percurso mais longo de vôo. Assim, o vôo é um importante aspecto no estabelecimento das populações, colonização, procura por parceiro para cópula, e conseqüentemente sobre o valor adaptativo dos indivíduos.

1.6 Objetivos

Este estudo teve como objetivo geral o acompanhamento do padrão da variação, tanto a nível molecular quanto morfológico, nas diferentes estações do ano, para tentar entender o papel do ambiente sobre as freqüências genótípicas e gênicas e sobre a variabilidade morfológica, em uma população natural de *Dryas iulia*.

Certos de que a compreensão dos efeitos observados podem lançar alguma luz sobre suas causas e informar sobre que fatores evolutivos estão atuando em populações naturais de *Dryas iulia*, foram definidos os seguintes objetivos:

- Analisar, quanto ao polimorfismo enzimático a população de Águas Belas, em gerações sucessivas, com ênfase na análise do equilíbrio genético para dois ou mais locos.
- Avaliar os efeitos da redução do tamanho populacional sobre a variabilidade genética e morfológica.
- Identificar as causas possíveis para a manutenção da variabilidade tanto genética quanto morfológica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Características gerais da área estudada

A população de *Dryas iulia*, estudada neste trabalho, localiza-se na Estação Experimental da Secretaria de Agricultura do Estado, em Águas Belas, município de Viamão, distante aproximadamente 20 km de Porto Alegre-RS.

Originariamente os critérios para escolha deste local, foram a detecção, em trabalhos anteriores, por HAAG (1992); HAAG, ARAÚJO & ZAHA (1993), de uma situação altamente sugestiva de associação não aleatória entre dois locos enzimáticos (esterase e leucina aminopeptidase) nesta população, além das medidas lineares realizadas nas asas anteriores mostrarem que os indivíduos dessa população são em média maiores quando comparados com os de outras.

A área caracteriza-se por apresentar uma cobertura residual de mata nativa, climácica, com forte predominância de elementos da Mata Atlântica. Esta vegetação, particularmente nesta região é caracterizada por "ilhas de vegetação", os capões, e por extensas áreas compostas por gramíneas e vegetação rasteira, que separam um capão do

outro. Esse capão apresenta o interior muito úmido, com uma camada de folhas em decomposição (litter, serrapilha) medianamente espessa. Além disso, é composto por árvores de muitas famílias, entre elas Mircinaceae, Leguminosae, Myrtaceae, são as mais freqüentes. Já a mata de eucalipto, estruturalmente, apresenta dois estratos vegetativos: o estrato de ervas rasteiras, e arbustos lenhosos até 2,5 metros de altura (tarumã e cocão) e árvores (eucalipto) em torno de 10 a 15 metros de altura.

A área é heterogênea, com características importantes como, por exemplo, a diversidade de espécies vegetais e de insetos, além disso apresenta um corpo d'água (açude), com uma área aproximada de 5 ha.

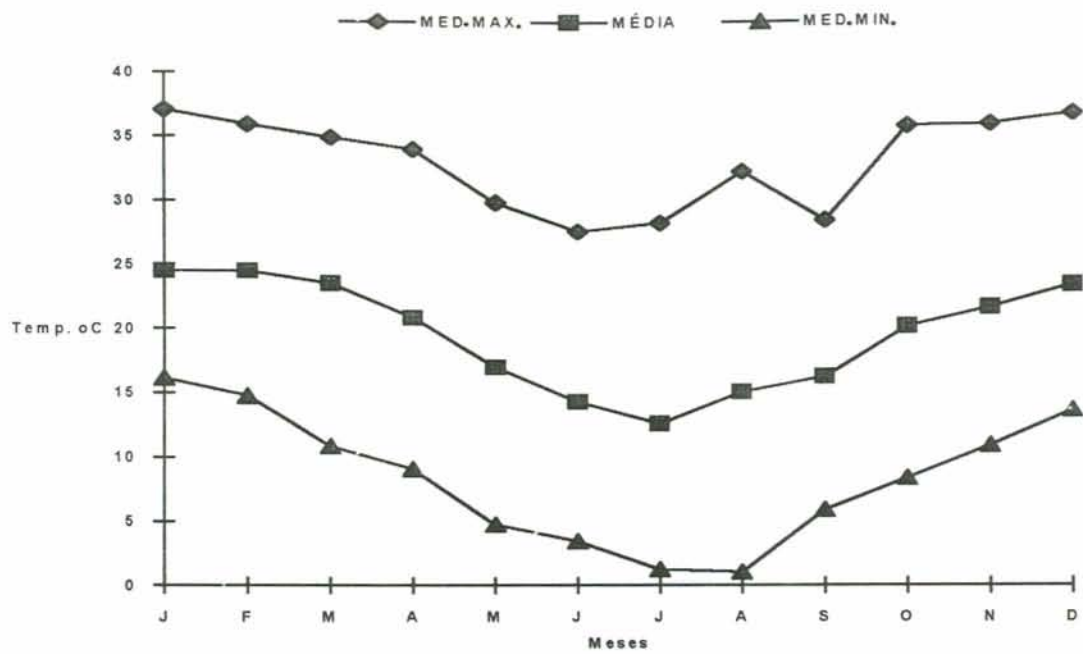
A espécie, *Dryas iulia*, distribui-se mais ou menos homogeneamente nesta área, e em dias muito quentes é mais freqüentemente encontrada no interior da mata iniciando suas atividades entre sete e oito horas da manhã, especialmente no verão; nos dias frios a atividade desses insetos é retardada, iniciando-se por volta das onze horas da manhã.

O clima da área estudada é sub-tropical úmido. Dados do 8º Distrito de Meteorologia do Estado, mostraram que a precipitação pluviométrica é sempre superior a 1300 mm anuais, e os dias chuvosos variam de 100 a 126 por ano, sendo que a precipitação pluviométrica média dos últimos quatro anos (1990-1993) ficou em torno de 1454,25 mm, e a temperatura média 19,5°C. Os primeiros dias frios são notados no final de maio e os últimos no final de setembro. A temperatura pode ser tão alta quanto 38-40°C, enquanto a temperatura mínima observada foi de -1°C. Nevoeiros são freqüentes, ocorrendo em torno de 20 dias por ano.

A sazonalidade toma a forma de quatro estações bem definidas, primavera (setembro-dezembro), verão (dezembro-março), outono (março-junho) e inverno (junho-setembro). Sazonalidade na temperatura e precipitação pluviométrica é mostrada na Figura 2.1.

Uma outra população de *Dryas iulia*, localizada no Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH), no Campus do Vale, UFRGS, distando aproximadamente 10 km de Porto Alegre, foi escolhida devido a semelhança com ABE nos aspectos fitossociológico e climático, para controle demográfico. Nesta população tentou-se acompanhar as flutuações no número de indivíduos, através de observações realizadas semanalmente. Desta forma no IPH, há um maior número de capturas do que em ABE. No IPH, como em Águas Belas as observações foram realizadas percorrendo-se a pé toda a área, no período compreendido entre as oito horas da manhã e três horas da tarde.

A)



B)

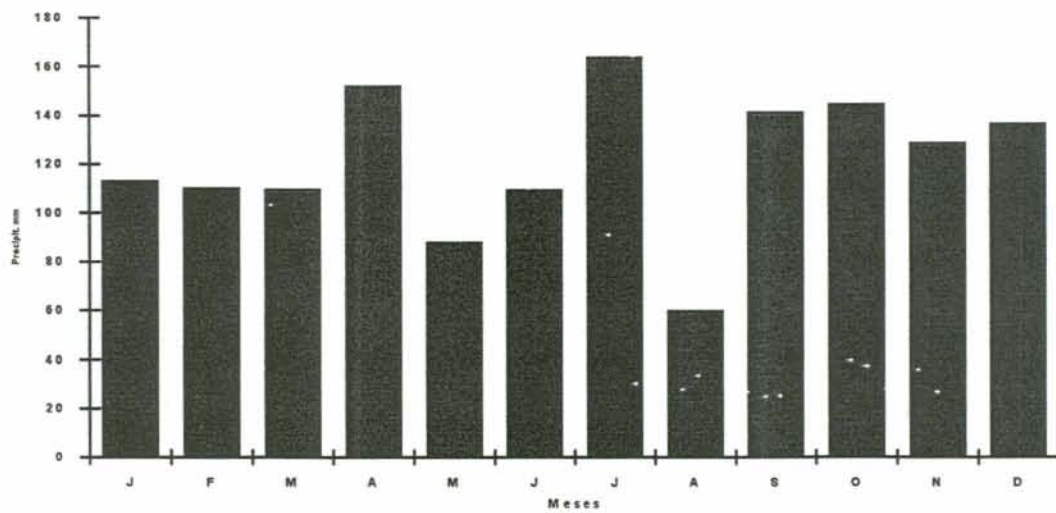


Figura 2.1: Sazonalidade na temperatura e precipitação pluviométrica em Águas Belas - RS. A) Temperaturas média das máximas, média e médias das mínimas, para o período de estudo. B) Precipitação pluviométrica média mensal.

2.2 Amostragens

2.2.1 Procedimentos de campo

Visitas periódicas foram feitas à população de Águas Belas com um intervalo médio de 45 dias, com o objetivo de coletar-se amostras de *Dryas iulia* para posterior análise. O número coletado variou com a abundância existente em cada época de coleta. O intervalo de 45 dias proporcionou obtenção de indivíduos de diferentes gerações, pois dados de criação desses organismos em insetário mostraram uma vida média em torno de 30 dias (GARCIAS, 1983).

Quatro foram as amostras coletadas, distribuídas nas seguintes estações: primeira amostra (maio de 1992, outono, N=45), segunda amostra (junho de 1992, inverno, N=66), terceira amostra (março de 1993, verão, N=79), quarta amostra (maio de 1993, outono, N=83). Os imagos foram capturados com rede entomológica convencional, acondicionados individualmente em envelopes de papel glicinado, os quais receberam uma etiqueta contendo a data, a identificação do sexo e o número do indivíduo, sendo essas informações fundamentais em todas as fases do trabalho.

Após a coleta e embalagem da amostra coletada, o transporte foi feito numa caixa de isopor para minimizar a variação da temperatura. O material ao chegar no laboratório foi então conservado à temperatura de -20° C, para análises posteriores.

Os ovos foram detectados sobre estruturas da planta hospedeira, localizados na vegetação associada a mesma, ou, ainda, pela observação e seguimento de fêmeas em ovoposição. Estes ovos foram então removidos, coletados e cuidadosamente acondicionados em potes de plástico, para futura criação e manutenção.

Com relação à população usada como controle demográfico, utilizou-se o método captura-marcação-recaptura sendo as observações realizadas semanalmente.

2.3 Criação e manutenção de *Dryas iulia*

Para esta atividade foi utilizado um viveiro de criação de borboletas (insetário) que constituía-se de uma área de 15 m² aproximadamente, com 2,5 m de altura, envolvido por tela (sombrite). Sua localização era em um terraço de um prédio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sujeito a todas as variações de temperatura e precipitação. Inúmeras plantas, mantidas em vasos, faziam parte do insetário, tornando-o bastante semelhante ao ambiente natural.

Os ovos coletados na natureza foram transferidos para o laboratório e individualizados em potes de plástico com 9,0 cm de diâmetro, 5,5 cm de altura, forrados com papel absorvente e umedecido com água destilada.

Após a eclosão, as larvas foram alimentadas *ad libitum* com folhas de *Passiflora suberosa*, até atingirem o estágio de pupa. Os cuidados com a higiene dos potes e a oferta de alimento foram feitos diariamente. Ao emergirem, os imagos tiveram seu sexo determinado. Todo esse procedimento foi feito em câmara de 25°C e luminosidade constante. Dos indivíduos nascidos, uma única fêmea foi escolhida e transferida para o insetário. Essa fêmea virgem foi colocada, para copular, com três machos trazidos da natureza.

Para a manutenção destes adultos no interior do insetário, diariamente foram colocados alimentadores artificiais (recipientes de cores vermelha e amarela) com uma

mistura de mel e água numa proporção de 1 : 3, além das seguintes plantas com flores: *Lantana camara* (camará), *Impatiens balsamina* (beijo-de-frade), *Stachytarpheta ssp.*(gervão).

Para a ovoposição, as plantas hospedeiras disponíveis no insetário foram: *Passiflora suberosa*, *P. misera* e *P. capsularis*. Os ovos foram recolhidos periodicamente, mantidos em desenvolvimento até a emergência dos imagos, estes foram congelados a -20°C, e submetidos à eletroforese, visando a obtenção de informações a respeito do controle genético dos sistemas enzimáticos.

2.4 Procedimentos no laboratório

2.4.1 Medindo asas

Asas anteriores, direita e esquerda, de cada adulto trazido da natureza, foram removidas, aderidas a uma folha de papel branca (31 cm x 23 cm) e receberam as mesmas informações constantes nos envelopes.

Dentro da área das asas, adotou-se três pontos de referência que formavam um triângulo cujos lados foram medidos e registrados, estimando-se também o perímetro das mesmas. Este procedimento foi adotado anteriormente por HAAG (1992). A localização dos pontos sobre as asas foram: ponto de origem das veias radiais R4 e R5, limite final da veia anal A2, e um ponto na articulação basal (ângulo proximal da célula discal (Figura 2.2). Todas as medidas foram feitas com o auxílio de uma régua de precisão milimétrica, pois o tamanho relativamente grande das asas anteriores tornava o erro cometido praticamente irrisório. Antes da análise os dados foram transformados para logaritmo

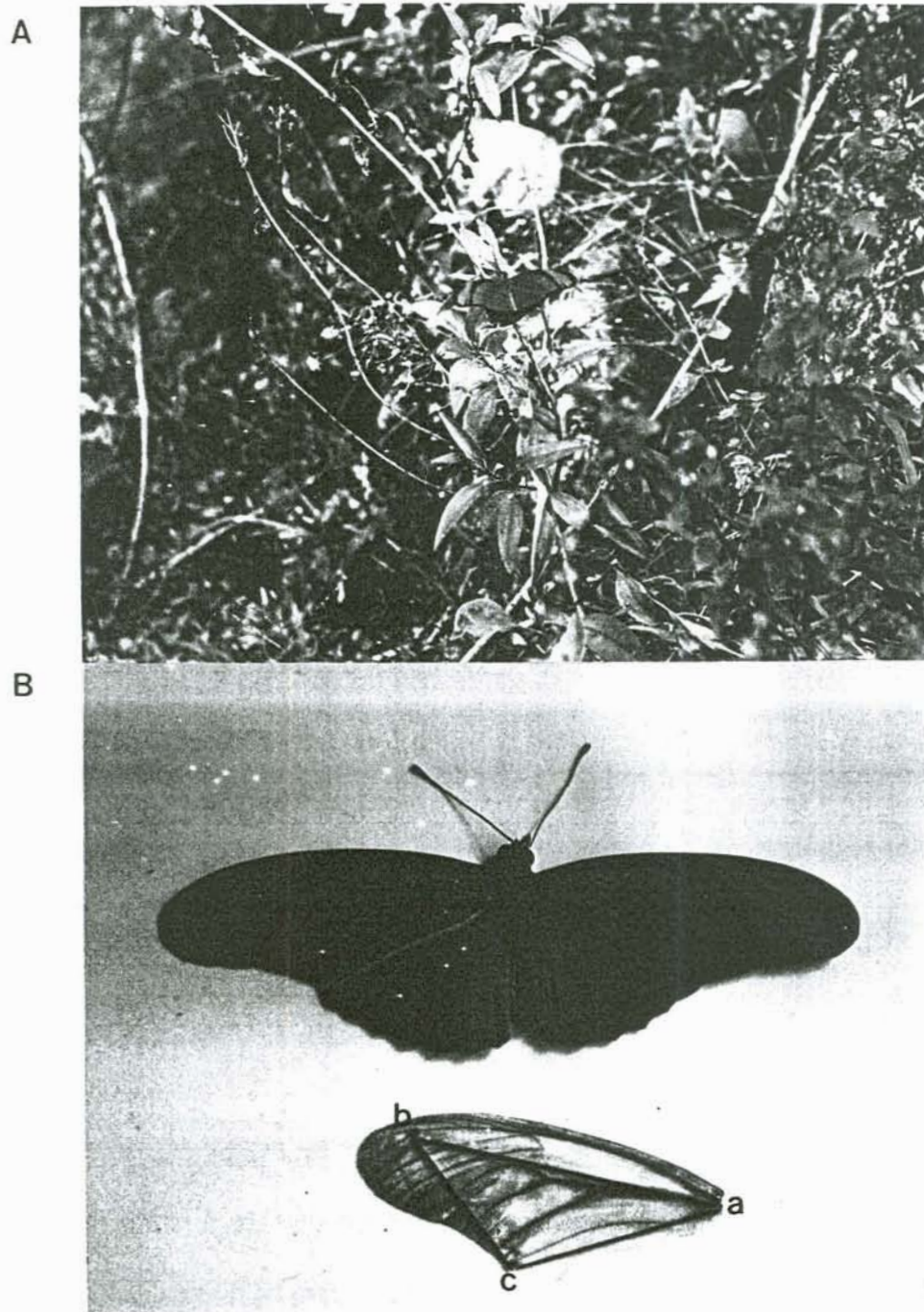


Figura 2.2. A) Indivíduo adulto de *Dryas iulia*, aquecendo-se ao sol pela manhã. B) Detalhe de um macho, mostrando abaixo, sobre a asa anterior direita, os pontos e o triângulo formado pelos mesmos. (ab = comprimento da asa; bc = margem externa; ac = margem interna).

natural, pois esta transformação é mais comumente aplicada a variáveis com distribuição contínua, para estabilizar a variância (THÖNI, 1967); este procedimento foi também utilizado por HAAG (1992).

2.4.2 Análise eletroforética

No presente estudo, foram analisados seis sistemas enzimáticos: esterase (EST), fosfoglicomutase (PGM), aspartato aminotransferase (AAT), malato desidrogenase (MDH), α -glicerofosfato desidrogenase (α -GPDH), e leucina aminopeptidase (LAP), nos indivíduos coletados diretamente da natureza e indivíduos criados no insetário.

Dos sistemas analisados, o da leucina aminopeptidase, mesmo tendo apresentado atividade enzimática, não foi incluído nas análises, porque no referido sistema as bandas mostraram-se difusas, não se podendo ter certeza do número de alelos ou locos existentes, deste modo não permitindo uma análise segura.

2.4.2.1 Homogeneização das amostras

No preparo da amostra, um homogeneizado bruto foi preparado a partir do esmagamento mecânico de abdômens individuais. Os abdômens foram preferidos pois em testes prévios forneceram um padrão claro e distinto para as diferentes bandas presentes em cada sistema enzimático. Isto foi feito em tubo de ensaio, com o auxílio de um bastão de vidro, acoplado a um mandril de furadeira, com um volume de 0,4 ml do tampão de homogeneização (Tris 0,1 M + EDTA 0,001 M) por amostra. O volume do tampão foi

escolhido em testes prévios, com o objetivo de se obter bandas suficientemente intensas e distintas. Para evitar desnaturação enzimática, i.e., para que as enzimas retivessem suas atividades biológicas, mesmo com o conteúdo celular não compartimentalizado, os tubos de ensaio foram mantidos em banho de gelo. Uma vez que a degradação das enzimas inicia-se logo que a membrana celular seja rompida, tentou-se economizar tempo entre a homogeneização e a aplicação das amostras no gel. Especial cuidado teve-se na manutenção das amostras adequadamente ordenadas e livre de contaminação das amostras vizinhas.

Após este procedimento, os homogeneizados foram então absorvidos em retângulos de papel Whatman 3MM de 4 mm por 1 mm.

2.4.2.2 Preparo dos géis e aplicação das amostras

A análise dos cinco sistemas enzimáticos (excluindo LAP que não foi analisada) foi feita através de eletroforese horizontal em gel. As condições de migração foram específicas para cada sistema enzimático, sendo que o meio suporte e os tampões de migração que forneceram as melhores resoluções das bandas isoenzimáticas, foram estabelecidos em testes prévios. Para os sistemas EST, PGM e α -GPDH utilizou-se gel de poliacrilamida, preparado com 100 ml de tampão. Nesse caso, ao tampão escolhido para cada sistema (ver adiante) adicionou-se acrilamida e bisacrilamida nas proporções de 7,6g : 0,4g (concentração de 8%) para EST; 4,75g : 0,25g (concentração de 5%) para PGM; 5,7g : 0,3g (concentração de 6%) para α -GPDH.

Também foram acrescentadas a todas estas soluções 0,06 ml de TEMED, como catalizador da polimerização, feita com 0,6 ml de persulfato de amônio (AP) 10 %. Essa mistura foi rapidamente colocada em canaleta e coberta com uma placa de vidro untada com graxa de silicone.

A polimerização da mistura de bisacrilamida e acrilamida leva de 15 a 20 minutos. Precauções foram tomadas durante a manipulação, como uso de luvas, uma vez que no estado não polimerizado a poliacrilamida é altamente neurotóxica.

Os géis foram preparados com vinte e quatro horas de antecedência em caso de migração diurna. Para sistemas enzimáticos que necessitavam de dezoito horas de migração, esta foi noturna, e os géis foram preparados na tarde anterior. Uma vez prontos, os géis foram acondicionados a 4° C até a aplicação dos homogeneizados.

Para os sistemas AAT e MDH, o gel utilizado foi de amido numa concentração de 11%. Este foi preparado usando-se 8,8 g de amido hidrolizado, adicionado a 80 ml do tampão do gel, específico para cada sistema (ver adiante). O volume de tampão acima citado, foi usado para suspender o amido em solução. Esta suspensão amido-tampão foi constantemente agitada e aquecida até ferver, e a ebulição foi mantida por alguns momentos. Essa mistura foi então degaseificada em uma bomba de vácuo, por aproximadamente 1 minuto, para remover as bolhas de ar. O amido cozido foi então rapidamente colocado na canaleta, coberto com uma placa de vidro untada com nujol e permitido esfriar a temperatura ambiente, e após, mantido na câmara fria (4° C) até o uso.

Tanto os géis de poliacrilamida como os de amido foram feitos em canaletas de vidro com dimensões de: 15,0 cm x 17,0 cm com uma espessura de 2,0 mm, possibilitando que 17 amostras pudessem ser colocadas em um único gel.

Os tampões dos géis são responsáveis pela constância do pH (efeito tamponante), determinam a carga líquida da molécula protéica e, de acordo com o tipo e concentração dos sais que os constituem, determinam a condutividade do sistema. Todavia é o conjunto de tampões utilizados no gel e nas cubas, aliado à diferença de potencial empregado, que promovem o fluxo de íons dentro da matriz porosa do gel através do qual migrarão as proteínas do homogeneizado. São listados a seguir, os tampões das cubas e dos géis utilizados para cada sistema analisado neste trabalho:

•EST

Tampão descontínuo

Tampão das cubas:

Ácido bórico 0,3 M

NaOH 0,05 M

pH 8,0

Tampão do gel:

Tris 0,076 M

Ácido cítrico 0,005 M

pH 8,6

• **α -GPDH**

Tampão das cubas:

Citrato de sódio 0,4 M, pH 8,0

Tampão do gel:

Histidina 0,005 M pH 8,0

• **PGM ***

Tampão das cubas:

Tris 0,1 M

EDTA 0,01 M

Ácido maléico anidro 0,08 M

Cloreto de magnésio hexaidratado 0,01 M

pH 7,2

Tampão do gel:

Uma diluição de 1:15 da solução do tampão das cubas foi usada na preparação do gel.

• **MDH ***

Tampão das cubas:

NaH₂PO₄ 0,245 M

Ácido cítrico 0,15 M

pH 5,9

Tampão do gel: foi usado uma diluição de 1:40 da solução do tampão das cubas.

• AAT

Tampão C

Tampão das cubas:

Cátodo:

Ácido cítrico 0,156 N

Tris 83,19 g/l

Ânodo:

Ácido Cítrico 0,1249 N

Tris 66,48 g/l

Tampão do gel:

Ácido Cítrico 0,00799 N

Tris 8,96 g/l

(*) Os tampões de migração utilizados no presente trabalho para os sistemas PGM e MDH são aqueles rotineiramente utilizados em nossos laboratórios nos trabalhos de Genética Ecológica.

As amostras foram alinhadas e aplicadas em fendas ("slots") abertas com auxílio de um pente de aço inoxidável com dentes de 4,0 mm de largura a 1,5 cm da borda do gel para todas os sistemas enzimáticos analisados, exceto para MDH, que foi aplicada a 5,0 cm. As pontes catódicas e anódicas, foram mantidas a uma distância de 12 cm uma da outra. Usou-se como controle o padrão de bandas observado na espécie *Drosophila willistoni*, linhagem São Pedro-15.

Os géis foram então submetidos a uma intensidade de campo de 10V/cm, em corrente contínua, até que a linha de frente mostrada pela banda de bromofenol, atingisse 9,0 cm para os sistemas: EST, α -GPDH e AAT. No caso de PGM e MDH, foi utilizada uma intensidade de campo de 3V/cm por 18 horas. Ao serem submetidas à eletroforese, os géis foram mantidos a 4°C e cobertos com filme de plástico para prevenir a evaporação do tampão e a conseqüente desidratação do gel.

Depois de completada a eletroforese, os géis foram submetidos à coloração. Uma vez que as enzimas catalizam reações bioquímicas específicas, é possível visualizar a localização de uma enzima em particular no gel pelo fornecimento de apropriados substratos e cofatores, e de um reagente que se ligando ao produto da reação enzimática produza coloração. O produto colorido fica depositado no gel formando uma banda visível, onde uma determinada enzima foi eletroforeticamente localizada.

São listadas a seguir as soluções de coloração utilizadas para cada sistema:

• **EST**

50 ml	tampão fosfato 0,1 M pH 6,0
0,05 g	Fast Blue BB Salt
2 ml	α -naftilacetato (10%, diluído em água e acetona 1:1)
2 ml	β -naftilacetato (10%, diluído em água e acetona 1:1)

Antes da coloração, o gel era pré-incubado em 50 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0, a 37°C por 15 minutos, para baixar o pH. Quando da revelação, o gel mais a solução de coloração foram incubados a uma temperatura de 37°C por 60 minutos.

• **α -GPDH**

100 ml	Tris-HCl 0,05M pH 8,5
0,020g	NBT
0,025g	β -NAD
0,180g	EDTA
0,800g	α -glicerofosfato
0,005g	PMS

A incubação era feita no escuro, a 37°C por 50 a 60 minutos.

• **PGM (*)**

15 ml	tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0
0,055 g	glicose-1-fostato
5,0 μ l	glicose-6-fostato desidrogenase
0,004 g	MTT
0,004 g	PMS
0,003 g	NAD
15 ml	gel de bacto-agar 1,5%

A incubação foi feita no escuro a 37° C por 40 a 60 minutos.

• **MDH**

20 ml	Tris-HCl 0,1 M pH 8,6
0,28 g	ácido L-málico
0,5 ml	NADP

1,0 ml	MTT
1,0 ml	PMS
15 ml	gel de bacto-agar 1,5%

A incubação foi feita no escuro a 37° C por uma hora.

• **AAT (*)**

0,20 g	ácido L-aspartico
0,10 g	ácido α -cetoglutárico
0,15 g	Fast Blue BB Salt
100 ml	tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,12

(*) As soluções de coloração utilizadas no presente trabalho para os sistemas PGM e AAT são aquelas rotineiramente utilizadas em nossos laboratórios nos trabalhos de Genética Ecológica.

O gel de bacto-ágar utilizado na coloração de PGM e MDH foi fundido a 100°C em água destilada em banho-maria, e, após atingir uma temperatura moderada (sendo possível segurar o frasco com a mão) foi adicionado a solução de coloração. Logo após a adição do bacto-ágar, a solução era espalhada sobre o gel, e antes de solidificar cobria-se a camada com papel filtro. Após a incubação a 37° C por 40-60 minutos no escuro, retirava-se o papel com cuidado, de modo que o gel de bacto-ágar ficasse a ele aderido. As bandas então eram visualizadas no papel e não no gel, na ordem contrária à observada neste.

Depois de pronta a reação de coloração, os géis foram fixados. Para isso usou-se a solução de fixação composta de uma mistura de álcool metílico, água e ácido acético na proporção de 5 : 5 : 1, por vinte minutos. Posteriormente, todos os géis foram lavados

em água destilada, fotografados, analisados e guardados, envoltos em plástico, em câmara de 4°C.

Os géis foram analisados e zimogramas (esquemas) foram confeccionados em papel milimetrado, onde foi anotado a distância migrada pelas bandas em cada indivíduo, em relação ao ponto de aplicação. A migração relativa (MR) foi calculada para cada banda a partir da comparação com uma banda escolhida do controle. O controle genético das enzimas foi determinado pela comparação dos padrões dos diferentes indivíduos analisados bem como pela análise da descendência de uma fêmea. Foram consideradas bandas secundárias aquelas cuja presença, distância de migração e intensidade foram sempre relativas à ocorrência de outra isoenzima. Por convenção, considerou-se a banda mais intensa como sendo a principal.

2.5 Análise estatística

2.5.1 Exegese do tamanho

Para a medida das asas anteriores foram adotados três pontos de referência, conforme descrito no item 2.4.1. “Medindo asas” (Figura 2.2). Com esses pontos obteve-se 4 medidas tanto para a asa direita como para a asa esquerda. Os testes de correlação entre as medidas, bem como as análises da variância (ANOVA) relacionando-as a sexo e época da amostragem, foram feitos utilizando-se o pacote estatístico NCSS (Number Cruncher Statistical System) versão 5.0.

2.5.2 Do polimorfismo enzimático

A análise eletroforética foi executada utilizando-se os adultos provenientes das quatro coletas realizadas em Águas Belas. Para as quatro amostras foram analisados os cinco sistemas descritos previamente. A partir desta análises foram calculados o equilíbrio para locos individuais e dois locos além de parâmetros de variabilidade genética como: proporção de locos polimórficos (P), número médio de alelos por loco (A) e heterozigidade média por loco por indivíduos (H).

As frequências gênicas e genotípicas foram estimadas através da contagem direta para cada uma das quatro amostras. Foi utilizada a equação de BAILEY (1974), para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg, uma vez que os valores obtidos e esperados foram muito pequenos ou nulos, o que inviabiliza uma análise pelo χ^2 tradicional (nesta equação compara-se as heterozigosidades obtidas com as esperadas)

$$d = \frac{\frac{a}{n} - p}{\sqrt{\frac{p \cdot (1 - p)}{n}}} \quad (2.1)$$

onde **a** é o número de genótipos hetrozigotos obtidos, **n**, o número de indivíduos analisados e **p** é a heterozigidade esperada na amostra. Para comparar as amostas com relação às frequências genotípicas e número de alelos, foi aplicado o teste “ Λ ” (lambda) de SHIELDS & HEELER (1979), uma vez que os valores observados foram muito pequenos, resultando em uma tabela de contingência com valores esperados muito baixos, invalidando desta forma o uso do teste do χ^2 . Com relação à estatística F, esta foi originalmente empregada para análise da estruturação espacial de populações (WRIGHT,

1943). No presente estudo, foi aplicada, tratando-se as quatro amostras sucessivas no tempo, como quatro populações no espaço. Utilizou-se no presentes trabalho, uma modificação proposta por WEIR & COCKERHAM (1984) do modelo original onde são realizadas análises da variância dos alelos em consideração, onde:

$$F_{st} = \frac{\sum l. \sum u. alu}{\sum l. \sum u(alu + blu + clu)} \quad (2.2)$$

$$F_{it} = 1 - \frac{\sum c}{\sum (a) + (b) + (c)} \quad (2.3)$$

$$F_{is} = 1 - \frac{\sum c}{\sum (b) + \sum (c)} \quad (2.4)$$

os parâmetros **a**, **b** e **c** são componentes observados da variância das frequências alélicas relativo às subpopulações, indivíduos das subpopulações e gametas dos indivíduos, repectivamente. Os componentes a, b e c recebem **l** e **u**, indicando: l locos e u alelos. A significância de F_{ST} , F_{IT} e F_{IS} , foi testada por:

$$\chi^2 = N (F_{IS})^2$$

conforme LI & HORVITZ (1953) e

$$\chi^2 = 2N F_{ST} (k-1)$$

conforme WORKMAN & NISWANDER (1970), onde N é o número total de observações e k é o número de alelos. Os graus de liberdade utilizados em ambos os testes equivaleram a:

$Gf = (k-1)(s-1)$, para s populações.

3. RESULTADOS

3.1 Razão sexual na natureza

Quatro amostragens foram realizadas em Águas Belas (ABE) em 1992 e 1993, enquanto na população do IPH acompanhou-se a população durante esse mesmo período, conforme descrito no item 2.2. “Amostragens”.

Na Tabela 3.1 encontram-se, comparativamente, os números de indivíduos capturados em ABE e número de indivíduos capturados, marcados e liberados para o IPH, com relação ao sexo nos respectivos períodos de captura e observação.

Tabela 3.1: Números de indivíduos capturados por sexo, em ABE e IPH, com relação ao período e ano de captura.

local	ABE				IPH			
	1992		1993		1992		1993	
Ano	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Amostras								
Machos	33	52	63	58	53	42	29	36
Fêmeas	12	14	16	26	14	5	4	7
Total	45	66	79	83	67	47	33	43
Mês	mai	jun	mar	mai	mai	jun	mar	mai
χ^2	9,80	21,88	27,96	13,12	27,70	29,13	18,94	19,56
P <	0,01	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

Observando esta tabela nota-se que em todas as amostras coletadas, no IPH e ABE, o número de fêmeas capturadas foi sempre inferior estatisticamente ao número de machos. A proporção sexual variou no IPH, entre 4:1 e 8:1, enquanto que em ABE, ficou

entre 4:1 e 2:1, ($p < 0,001$). Isso se deveu, talvez, não a um desvio na proporção sexual primária, mas a um dimorfismo comportamental entre os sexos. No campo, empiricamente se observa que os machos se deslocam mais ativamente na área, explorando-a para sua alimentação e reprodução, enquanto as fêmeas voam mais freqüentemente em meio a vegetação em busca das plantas para oviposição.

Na população do IPH seguiu-se a flutuação no número de indivíduos no intervalo de tempo de 1992 e 1993, através do método de captura-marcação-recaptura, sendo as observações realizadas semanalmente, as quais foram reunidas em quatro amostras como em ABE.

3.2 Abundância e extinções: características demográficas e flutuações populacionais

As temperaturas baixas do inverno fazem com que as populações de *Dryas iulia* se extingam. Logo que a temperatura começa a subir e as plantas hospedeiras a se desenvolverem, as populações iniciam seu restabelecimento, provavelmente por indivíduos migrantes de outras populações de locais mais protegidos.

Sem dúvida, mesmo apresentando uma alta tolerância ao calor e à baixa umidade no verão, *Dryas iulia* sofre com as temperaturas baixas do inverno. Na Figura 3.1, pode-se ver claramente as flutuações no número de indivíduos ao longo do tempo, no IPH, bem como as flutuações na proporção sexual em cada semana de captura, note que o número de machos foi sempre superior ao número de fêmeas, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Essa mesma população extinguiu-se no início do inverno,

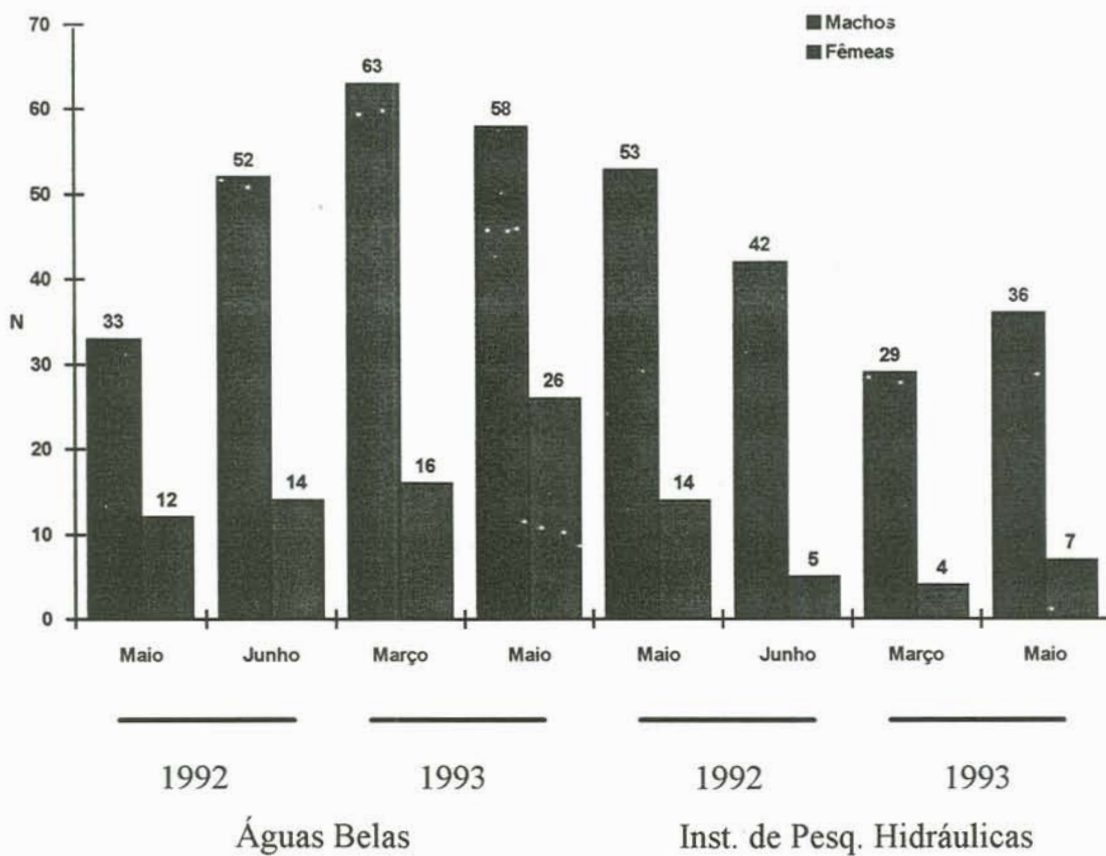


Figura 3.1: Variação no número de machos e fêmeas capturados para Águas Belas e Instituto de Pesquisas Hidráulicas no período de estudo. O número de machos foi sempre maior do que o número de fêmeas ($p < 0,001$).

permanecendo ausente nas amostragens até o mês de novembro e aumentando gradativamente até atingir o pico máximo, o que ocorreu no outono (abril, maio). *D. iulia* sofre contrações e expansões periódicas em suas populações. As populações estudadas, tanto no IPH como em ABE, extinguíram-se no período de julho a outubro, reaparecendo no mês de novembro e permanecendo em baixos números nos meses de dezembro a fevereiro, restabelecendo-se então até atingir seu maior tamanho (abril-maio). O declínio no número de indivíduos inicia com os primeiros dias frios que chegam no final do outono.

Embora as populações não sejam estáticas, como sugerem os números do censo da tabela 3.1, estamos certos de que estes são uma boa estimativa da dinâmica destas populações e refletem a abundância (nos períodos favoráveis) e a raridade nas épocas desfavoráveis (extinções), como mostram trabalhos anteriores (GARCÍAS, 1983; HAAG, 1988).

Na tabela 3.2, aparecem os dados relativos a distribuição das recapturas por sexo, com relação à população do IPH. Como se pode notar, as recapturas foram pouco frequentes, em ambos os sexos (11,8% e 13,8%, respectivamente machos e fêmeas). Quarenta e três machos foram recapturados pelo menos uma vez, enquanto que somente 7 fêmeas foram recapturadas uma vez.

Tabela 3.2: Distribuição das recapturas, por sexo, no IPH, no período de maio e junho de 1992.

RECAPTURAS	MACHOS		FÊMEAS		TOTAL
	n	%	n	%	
0	319	88,12	87	92,55	406
1	37	10,22	7	7,45	44
2	6	1,66	-	-	6
TOTAL	362		94		456

Do total de 362 machos capturados 319 (88,12%) não foram recapturados, enquanto que das 94 fêmeas, 87 (92,55%) também não o foram. Neste mesmo período a longevidade máxima observada foi para um macho com uma sobrevivência de 37 dias, e uma fêmea com 14 dias.

3.3 Padrões na variação morfológica

Entre as quatro medidas tomadas das asas, e descritas no item 2.4.1. “Medindo asas”, foi escolhido o comprimento das asas direita e esquerda e o perímetro, para a realização da análise morfológica. Uma vez que existe um alto grau de simetria entre as medidas das asas direita e esquerda, evidenciada pela correlação significativa, (Tabela 3.3) ($p < 0,001$), optou-se por utilizar apenas os dados relativos a asa direita de cada indivíduo.

Tabela 3.3: Correlação entre as medidas tomadas das asas direita e esquerda dos indivíduos coletados em Águas Belas. Acima da diagonal encontram-se os valores da correlação para as fêmeas e abaixo da mesma, para os machos.

	ACd	BCd	ABe	ACe	BCe	ABd
ACd	-	0,8679	0,9168	0,9698	0,8177	0,9374
BCd	0,7067	-	0,8923	0,8662	0,9339	0,8978
ABe	0,8044	0,8530	-	0,9321	0,8877	0,9829
ACe	0,8224	0,7779	0,9471	-	0,8051	0,9273
BCe	0,7015	0,9188	0,8605	0,7775	-	0,8815
ABd	0,8114	0,8587	0,8791	0,9319	0,8484	-

Através desta tabela podemos ver que o menor valor de r (coeficiente de correlação) encontrado foi de 0,7015, entre as medidas BC da asa esquerda e AC da asa direita e o maior valor encontrado foi de 0,9829 entre as medidas AB da asa esquerda e AB da asa direita; ambos estatisticamente significantes ao nível de $p < 0.001$ (em todas as correlações o tamanho amostral foi o mesmo).

Os pontos de referência dentro da área da asa adotados para a realização das medidas estão descritos na figura 2.2; (as letras **d** e **e** minúsculas referem-se à asa direita ou esquerda).

3.3.1 Comparando tamanhos no tempo

A tabela 3.4, mostra os resultados da análise da variância bifatorial, envolvendo o sexo e o período de amostragem, para o comprimento das asas (em particular como já referido, para a asa direita, uma vez que para a asa esquerda o resultado foi o mesmo).

Tabela 3.4: Análise da variância bifatorial (sexo e período de amostragem) em relação ao comprimento da asa direita (dados transformados para logaritmo natural).

FONTE	GL	SQ	QM	F	PROB
SEXO	1	0,08923	0,08923	38,19	<0,0001
PERÍODO	3	0,42656	0,14218	60,86	<0,0001
INTERAÇÃO	3	0,01490	0,00497	2,11	>0,0996

comprimento
do segmento
direita (d)
inserção da
asa no max
nóto até a
ramificação
das veias R₁

O que deve ser salientado nessa tabela é que existe diferença estatisticamente significativa entre os sexos ($p < 0,0001$); entre os períodos a diferença também foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Todavia não se detectou interação entre sexo e período ($p > 0,0992$). Na seqüência, realizou-se uma análise da variância unifatorial, para cada sexo separadamente, desta vez levando em conta apenas o período de coleta; os resultados simplificados encontram-se na tabela 3.5.

Tabela 3.5: Sumário da análise da variância unifatorial da distribuição das medidas de comprimento das asas, por sexo, agrupadas segundo o período de coleta.

SEXO	FONTE	GL	SQ	QM	F	PROB
MACHOS	PERÍODO	3	0,39127	0,13042	54,05	<0,0001
FÊMEAS	PERÍODO	3	0,17637	0,05879	28,12	<0,0001

Fica claro, portanto, que o período tem grande influência sobre o tamanho das asas dos indivíduos de ambos os sexos, ($p < 0,0001$). Foi aplicado o teste de Duncan, onde as médias das amostras são agrupadas segundo sua semelhança, para discriminar quais as médias diferiam estatisticamente, encontrando-se que, para os machos, as amostras I e IV não são diferentes do ponto de vista estatístico, ($p < 0,05$), porém diferem das demais amostras com as quais foram comparadas, conforme o esquema a seguir:

♂	Amostras	II	I	IV	III
		Jun/92	Mai/92	Mai/93	Mar/93
	Médias	3,18	3,34	3,38	3,58

$$\begin{array}{r}
 3,18 \\
 3,34 \\
 3,38 \\
 3,58 \\
 \hline
 13,48 \\
 \bar{x} = 3,37
 \end{array}$$

Foi possível detectar-se uma tendência à diminuição da média a medida que o inverno vai chegando, tomando-se a média de março de 1993 como representativa do final do verão e a de junho de 1992 como a do início do inverno.

Para as fêmeas, as amostras I e II, e I e IV não diferem estatisticamente entre si com relação aos seus valores médios, entretanto diferem significativamente da amostra III. A mesma tendência ao decréscimo, do verão para o inverno, detectada nos machos, ocorreu também aqui, como mostra o esquema abaixo:

♀	Amostras	II	I	IV	III	$\bar{x} = 3,22$
		Jun/92	Mai/92	Mai/93	Mar/93	
	Médias	3,05	3,14	3,19	3,52	

As médias, limites superiores e inferiores, desvio padrão e o coeficiente de variação, bem como o tamanho (n) de cada amostra, para o comprimento das asas, para machos e fêmeas, nos quatro períodos de coleta são listados na tabela 3.6, na unidade original em que foram medidos, em centímetros.

Tabela 3.6: Média, limite superior (LS) e inferior (LI), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) estimados para o comprimento da asa direita de machos e fêmeas nas respectivas amostras.

SEXO	AMOSTRA	n	LI	LS	MÉDIA	DP	CV
MACHOS	I	33	2,95	3,65	3,34	0,146	0,044
	II	54	2,75	3,55	3,18	0,158	0,049
	III	63	3,30	3,95	3,58	0,159	0,044
	IV	56	2,50	3,70	3,38	0,174	0,051
FÊMEAS	I	12	2,90	3,40	3,14	0,151	0,048
	II	12	2,90	3,25	3,05	0,135	0,044
	III	16	3,25	3,70	3,52	0,116	0,033
	IV	26	2,25	3,45	3,19	0,255	0,080

Observando as médias nas diferentes amostras, constatamos que os sexos diferem entre si, com relação ao comprimento das asas, com os machos apresentando os maiores valores médios. Conforme podemos notar nesta tabela, o período em que se realizou a amostra influenciou o tamanho das asas; todavia essa influência ocorreu de maneira semelhante nos dois sexos, o que indica que não há interação entre a variável sexo e o período.

Através do mesmo tipo de análise da variância bifatorial, desta vez envolvendo o perímetro das asas e o sexo dos indivíduos, (Tabela 3.7), foi possível confirmar que as diferenças encontradas entre os sexos, quanto ao comprimento de suas asas, são verificadas também para a estimativa da área da asa, o perímetro.

Tabela 3.7: Análise da variância bifatorial da distribuição das medidas do perímetro das asas, agrupadas segundo o sexo, período de coleta e a interação entre estes.

FONTE	GL	SQ	QM	F	PROB
SEXO	1	0,09029	0,09029	29,12	<0,0001
PERÍODO	3	0,45914	0,15304	49,37	<0,0001
INTERAÇÃO	3	0,02201	0,00734	2,37	>0,0713

O que deve ser salientado na Tabela 3.7, é a diferença detectada entre os sexos, que foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). O outro fator analisado, a época na qual coletou-se as amostras, também teve relação significativa com a média do caráter em questão, sendo possível distinguir as estações do ano de cada amostra, através da média obtida para o perímetro das asas. Essas diferenças podem estar refletindo variações devidas a componentes ambientais tais como a temperatura e umidade do ar e abundância e a qualidade da planta hospedeira, favorecendo o desenvolvimento de adultos mais ou menos vigorosos. Entretanto, não se detectou qualquer influência diferencial (interação) do período sobre os sexos. Na seqüência, realizou-se uma análise da variância unifatorial, para cada sexo separadamente, levando em conta agora, apenas o período da coleta; os resultados, sumarizados, encontram-se na tabela 3.8.

Tabela 3.8: Sumário da análise da variância unifatorial da distribuição das medidas do perímetro da asa direita agrupadas segundo o período de coleta.

SEXO	FONTE	GL	SQ	QM	F	PROB
MACHOS	PERÍODO	3	0,39043	0,1301	46,60	<0,0001
FÊMEAS	PERÍODO	3	0,20372	0,0679	16,49	<0,0001

Observando esta tabela, fica claro que o período tem forte influência sobre o perímetro das asas de ambos os sexos. Para discriminar quais as médias eram diferentes, foi aplicado o teste de Duncan, encontrando-se que, para os machos, não há diferença estatística entre as médias das amostras I e IV, porém, estas diferem das demais com as quais foram comparadas, ($p < 0,05$), conforme o esquema abaixo:

Amostras	II	I	IV	III
	Jun/92	Mai/92	Mai/93	Mar/92
Médias	7,01	7,39	7,44	7,88

Para o perímetro, também foi possível detectar uma tendência à diminuição da média, de acordo com a queda na temperatura, i.e., a medida que a população vai chegando ao inverno, de maneira semelhante ao que ocorreu com o comprimento das asas. Quanto às fêmeas, as médias das amostras I e IV não são diferentes do ponto de vista estatístico, ($p > 0,05$), porém diferem das médias das demais amostras, conforme o esquema abaixo:

Amostras	II	IV	I	III
	Jun/92	Mai/93	Mai/92	Mar/93
Médias	6,66	6,98	7,00	7,80

A mesma tendência ao decréscimo, do verão para o inverno, detectada nos machos quanto ao comprimento e ao perímetro das asas, ocorreu também nas fêmeas.

Com o perímetro estimado a partir das medidas tomadas de cada asa, obteve-se um padrão semelhante ao apresentado pelo comprimento. O perímetro é um estimador da área

da asa e como acontece com as medidas lineares, o perímetro da asa direita está fortemente correlacionado com o da asa esquerda, para ambos os sexos, a correlação foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). As médias, limites inferiores e superiores, desvio padrão, coeficiente de variação, bem como o tamanho (n) de cada amostra, para o perímetro da asa direita, para machos e fêmeas, nos quatro períodos de coleta, são listados na tabela 3.9, na unidade original de medida (cm).

Tabela 3.9: Média, limite inferior (LI), limite superior (LS), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), estimados para o perímetro das asas de machos e fêmeas nas respectivas amostras.

SEXO	AMOSTRA	n	Li	Ls	MÉDIA	DP	CV
MACHOS	I	33	6,45	7,80	7,393	0,066	0,0089
	II	53	6,00	7,70	7,014	0,052	0,0074
	III	62	7,00	8,65	7,890	0,048	0,0061
	IV	55	5,45	8,15	7,440	0,051	0,0068
FÊMEAS	I	12	6,45	7,75	7,016	0,127	0,0181
	II	12	6,05	7,20	6,679	0,127	0,0189
	III	16	7,40	8,20	7,806	0,110	0,0141
	IV	24	5,16	7,75	7,048	0,090	0,0127

Através dessa tabela podemos mostrar que os machos são em média, maiores do que as fêmeas, também com relação ao perímetro de suas asas. Aqui, as fêmeas apresentaram uma maior variação em seu tamanho, o que podemos constatar pelo desvio padrão para essa característica.

3.4 Sobre o polimorfismo, freqüências gênicas e genotípicas

Testes prévios foram feitos para a escolha da parte mais adequada do corpo da borboleta para as análises isoenzimáticas. Como pode ser visto na Figura 3.2, que apresenta os padrões isoenzimáticos de tórax e abdômen de borboletas para três sistemas enzimáticos (MDH, AAT e α -GPDH), o tórax apresenta uma série de bandas secundárias, enquanto, no abdômen, observa-se zonas de atividade enzimática bastante claras e definidas. Devido a estes resultados, como já referido em 2.4.2.1 “Homogeneização das amostras”, realizou-se todas as análises eletroforéticas com abdômens.

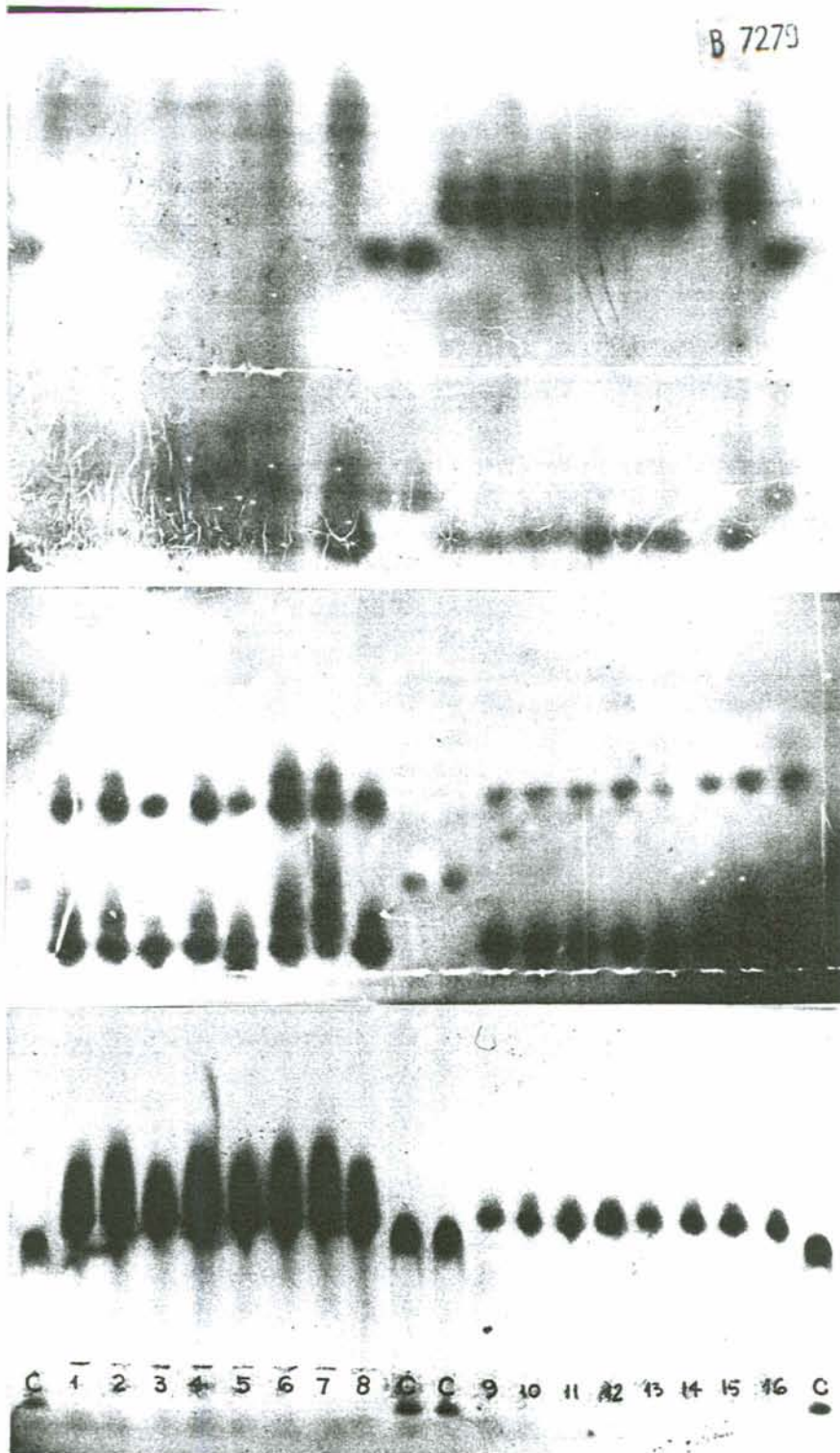


Figura 3.2: Padrões eletroforéticos obtidos empregando tórax e abdômens de indivíduos adultos de *Dryas iulia*. Nas fotos são mostrados géis dos sistemas MDH, AAT e α -GPDH, respectivamente. C: controle (*Drosophila willistoni*, linhagem São Pedro 15). 1 a 8 tórax, 9 a 16 abdômens, note a presença de bandas secundárias quando foi usado tórax.

Entre os nove locos estudados, apenas três (*α-Gpdh1*, *Mdh2* e *Pgm1*), mostraram-se monomórficos, sendo os demais polimórficos. Entre os cinco sistemas enzimáticos analisados, somente α -GPDH apresentou um único loco, os demais exibiram atividade determinada por dois ou mais locos.

O sistema das esterases apresentou um grande número de locos, incluindo genes responsáveis pela síntese de enzimas com atividade sobre α -naftil acetato, caracterizadas pela formação de bandas de coloração cinza-escuro, e aqueles que determinam enzimas com atividade sobre o β -naftil acetato e que formam bandas de cor vermelho-escuro. Dentre os locos que apresentavam atividade β -esterásica, dois foram escolhidos para a análise, devido ao fato de apresentarem bandas bastante intensas e encontrarem-se presentes em todos os indivíduos analisados. *Est1*, responsável pela síntese de isoenzimas de forte intensidade, foi previamente estudado por HAAG (1992), enquanto que *Est2*, embora com bandas não tão intensas, foi detectado em todos os indivíduos analisados. Além disso, com relação aos locos responsáveis pela síntese de enzimas com atividade sobre α -naftil acetato, alguns indivíduos apresentaram bandas intensamente coradas, geralmente anódicas, próximas ao ponto de aplicação; esse padrão coincidiu com indivíduos que foram congelados logo ao emergirem da pupa, o que pode estar indicando a existência de processos regulatórios ontogenéticos. Na Figura 3.3 é apresentado um gel, mostrando padrões de esterases de indivíduos da população de ABE, e o eletroferograma esquemático representando os fenótipos isoenzimáticos nos locos estudados. O número de alelos detectados para o loco *Est1* foi três, sendo que os alelos *Est1*¹ e *Est1*³ são raros. No loco *Est2* foram detectados quatro alelos, sendo mais comum

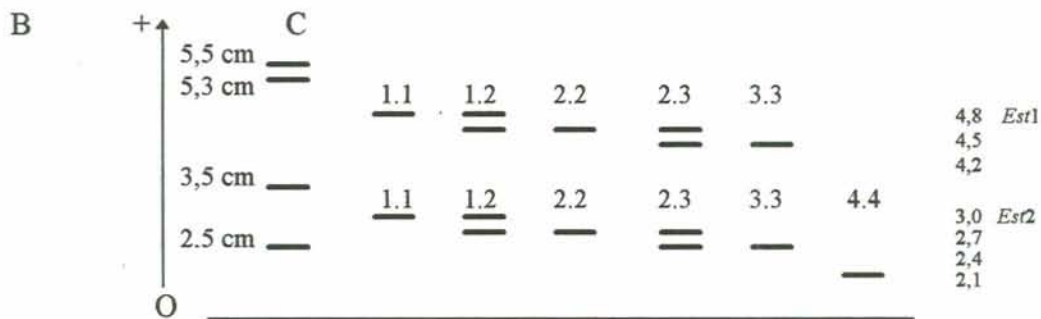
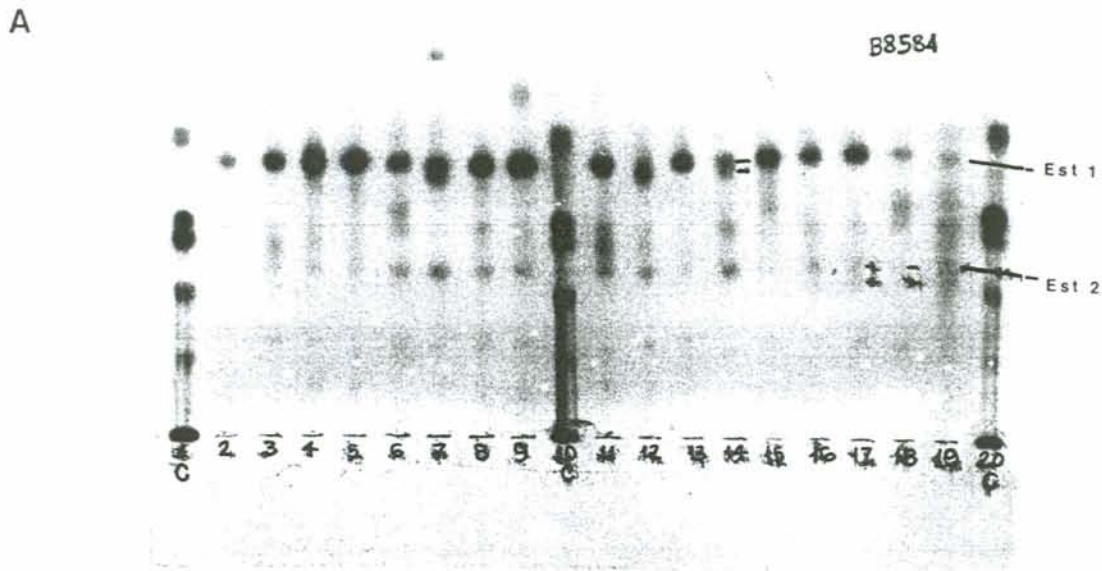


Figura 3.3: (A) Padrões eletroforéticos do sistema das esterases, com a indicação dos dois locos analisados e os respectivos alelos à direita do gel. Para o loco *Est1* observa-se nas aplicações 7, 12 e 14, indivíduos heterozigotos *Est1*^{2.3}; e indivíduos homozigotos para o genótipo *Est1*^{2.2} nas demais aplicações. Para o loco *Est2*, indivíduos das aplicações 17 e 18 apresentam genótipo *Est2*^{2.3}, demais *Est2*^{2.2}. Controles (C) *Drosophila willistoni* linhagem São Pedro 15. (B) Representação esquemática dos fenótipos obtidos neste sistema para os dois locos, à esquerda encontra-se o padrão e a mobilidade relativa das bandas do controle em cm e à direita a dos alelomorfos de *Est1* e *Est2*, analisados em *D. iulia*.

o alelo *Est2*², os demais aparecendo em baixa frequência. A presença de duas bandas nos heterozigotos dos locos de EST sugere que as enzimas codificadas pelos mesmos sejam moléculas monoméricas. Na tabela 3.10 são apresentados os genótipos encontrados para *Est1* e *Est2* bem como o número de indivíduos para cada genótipo e as respectivas frequências gênicas, para cada amostra realizada em ABE.

Tabela 3.10. Número de indivíduos para cada genótipo e frequências gênicas para *Est1* e *Est2* nas respectivas amostras.

loco	AMOSTRA	GENÓTIPO							ALELO				N
		1.1	1.2	1.3	2.2	2.3	2.4	3.3	1	2	3	4	
<i>Est1</i>	I	-	-	-	39	2	-	1	-	0,95	0,05	-	42
	II	1	-	-	61	4	-	-	0,02	0,95	0,03	-	66
	III	-	2	-	71	4	-	2	0,01	0,94	0,05	-	79
	IV	1	-	-	75	7	-	-	0,01	0,95	0,04	-	83
<i>Est2</i>	I	-	-	-	41	2	-	-	-	0,98	0,02	-	43
	II	1	4	1	39	5	1	2	0,07	0,83	0,09	0,01	53
	III	-	-	1	68	2	-	-	0,01	0,97	0,02	-	71
	IV	1	7	-	63	11	-	-	0,05	0,88	0,07	-	82

No sistema enzimático da α -glicerofosfato desidrogenase (α -GPDH), foi detectado somente um loco e este mostrou-se monomórfico nas quatro amostras. A aloenzima produzida apresenta duas bandas secundárias de migração mais anódica e intensidade decrescente em direção ao pólo positivo (Figura 3.4).

O sistema enzimático das malato desidrogenases-NAD⁺ dependente apresentou duas zonas de atividade enzimática, uma com migração anódica determinada pelo loco *Mdh1* e outro de migração catódica determinada pelo loco *Mdh2*. Para o loco *Mdh1* foram detectados três alelos enquanto que para o loco *Mdh2*, somente dois alelos

(Figura 3.5). As aloenzimas do loco *Mdh1* apresentaram duas ou três isoenzimas secundárias de migração mais rápida e intensidade decrescente em direção ao ânodo. Os heterozigotos apresentaram três bandas principais, sugerindo que as enzimas tanto de *Mdh1* quanto de *Mdh2* sejam moléculas diméricas. Na Tabela 3.11 são apresentados o número de indivíduos detectados para cada genótipo, a frequência gênica, bem como o total de indivíduos analisados por amostra, para o sistema da malato desidrogenase-NAD⁺, (MDH-NAD⁺).

Tabela 3.11: Número de indivíduos para cada genótipo e frequências gênicas para *Mdh1* e *Mdh2*, nas respectivas amostras.

Loco	AMOSTRA	GENÓTIPO				ALELO			N
		1.1	1.2	2.2	2.3	1	2	3	
<i>Mdh1</i>	I	-	5	40	-	0,06	0,94	-	45
	II	-	1	65	-	0,01	0,99	-	66
	III	-	9	62	6	0,06	0,90	0,04	77
	IV	-	2	78	1	0,01	0,98	0,01	81
<i>Mdh2</i>	I	-	-	29	-	-	1,00	-	29
	II	1	-	65	-	0,01	0,99	-	66
	III	-	-	77	-	-	1,00	-	77
	IV	-	-	81	-	-	1,00	-	81

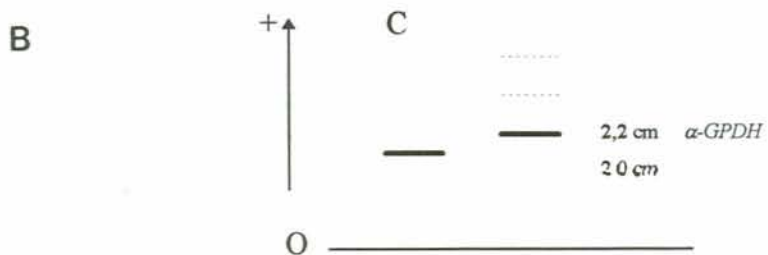
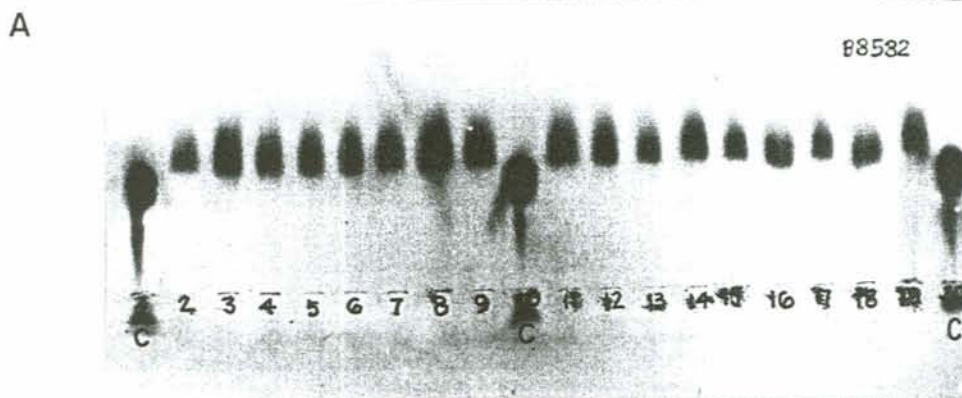


Figura 3.4: Padrão eletroforético do sistema α -glicerofosfato desidrogenase (α -GPDH).
 (A) Aplicações 1, 10 e 20 controles (*Drosophila willistoni*), demais indivíduos homozigotos para o único alelo detectado α -Gpdh^{1.1}. (B) Representação esquemática do único fenótipo encontrado para este loco e sua mobilidade relativa; a esquerda da figura encontra-se o padrão do controle (C).

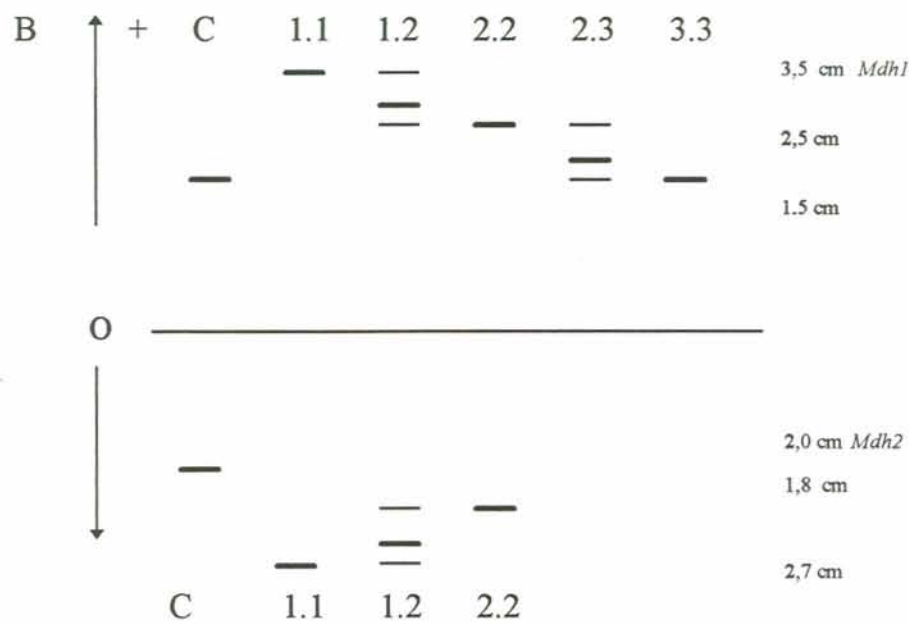
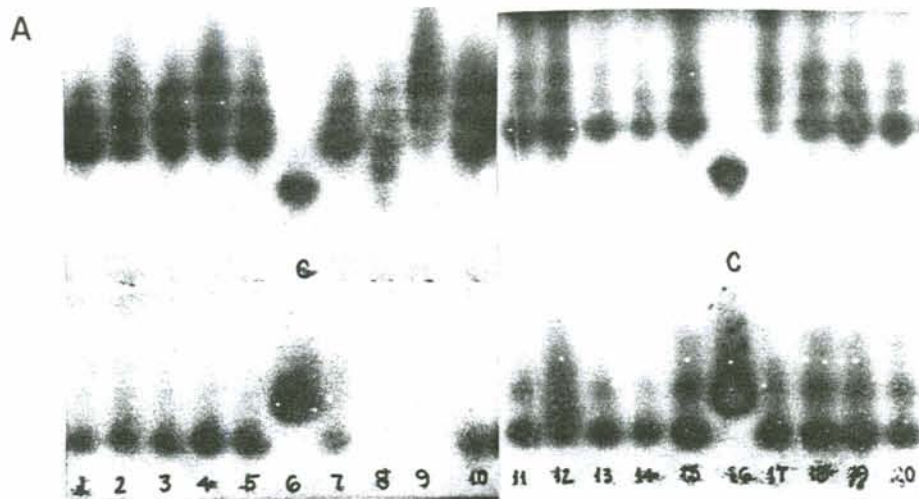


Figura 3.5. (A) Padrões eletroforéticos para o sistema enzimático das malato desidrogenases (MDH-NAD⁺), com indicação dos locos e alelos a direita do gel. C: controles; quanto ao loco *Mdh1*: indivíduos das aplicações 1, 2, 5, 7, 10 a 15, 18 a 20 genótipo *Mdh1*^{2.2}, indivíduos 3, 4, 9, 17 genótipo *Mdh1*^{1.2} e indivíduo da aplicação 8, genótipo *Mdh1*^{2.3}. Relativo ao loco *Mdh2*: posição 12, genótipo *Mdh2*^{1.2}; demais indivíduos correspondem ao genótipo *Mdh2*^{2.2}. (B) Representação esquemática dos fenótipos obtidos para os dois locos deste sistema. À esquerda encontra-se o padrão e a mobilidade relativa das bandas do controle (C) e a direita a dos alelos de *Mdh1* e *Mdh2* de *D. iulia*.

No sistema enzimático das fosfoglicomutases (PGM), Figura 3.6, também foram detectados dois locos. O loco *Pgm1* apresentou dois alelos, embora o alelo *Pgm1*² tenha sido encontrado fixado em três das quatro amostras analisadas (amostras I, III e IV). O loco *Pgm2* foi polimórfico, tendo-se detectado a presença de quatro alelos, dois dos quais apareceram em frequências relativamente altas, enquanto os demais, foram raros. Os heterozigotos para *Pgm2* apresentaram um padrão de duas bandas sugerindo uma enzima monomérica. Na tabela 3.12, são apresentados os genótipos encontrados para *Pgm1* e *Pgm2*, a frequência gênica e o número de indivíduos para cada amostra. Pode-se notar que o alelo de *Pgm1*², apareceu somente em uma única amostra numa frequência muito baixa, caracterizando-se como um loco monomórfico.

Tabela 3.12: Número de indivíduos para cada genótipo de *Pgm1* e *Pgm2* e frequências gênicas, nas respectivas amostras.

Loco	AMOSTRA	GENÓTIPO					ALELO				N
		1.1	1.2	1.4	2.2	3.3	1	2	3	4	
<i>Pgm1</i>	I	17	-	-	-	-	1,00	-	-	-	17
	II	44	-	-	1	-	0,99	0,01	-	-	45
	III	43	-	-	-	-	1,00	-	-	-	43
	IV	66	-	-	-	-	1,00	-	-	-	66
<i>Pgm2</i>	I	13	9	2	10	1	0,53	0,41	0,03	0,03	35
	II	17	8	2	19	1	0,47	0,49	0,02	0,02	47
	III	19	17	-	8	-	0,62	0,38	-	-	44
	IV	15	38	-	13	-	0,52	0,48	-	-	66

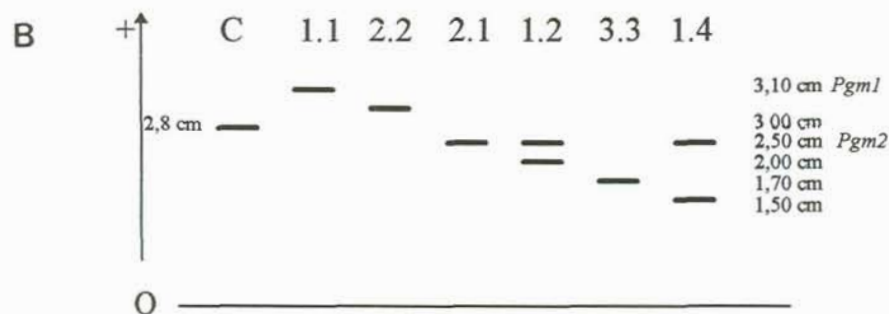
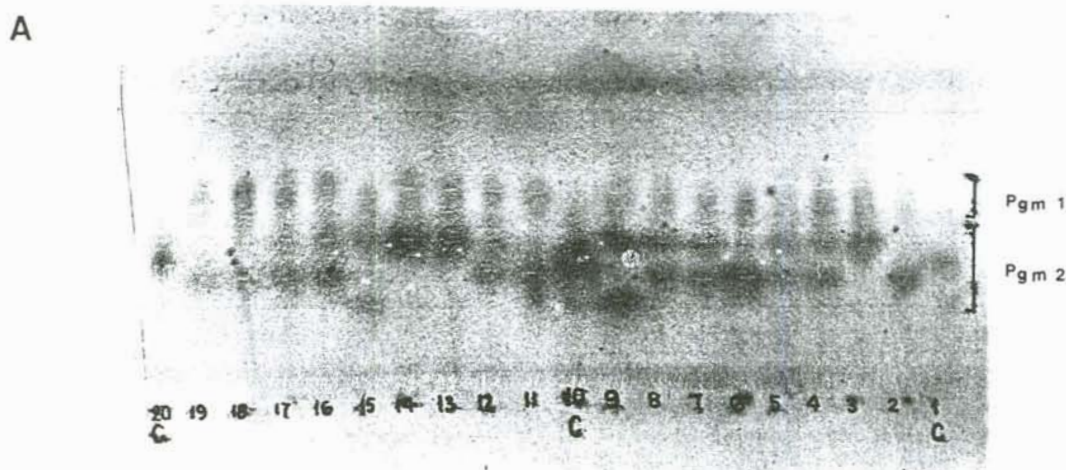


Figura 3.6. Padrão eletroforético obtido para o sistema das fosfoglicomutase (PGM). (A) posições 1, 10 e 20 controles; quanto ao loco *Pgm1*; posições: todos indivíduos correspondem ao genótipo *Pgm1*^{1.1}. Com relação à *Pgm2*: posições 2, 3, 15, e 19 correspondem ao genótipo *Pgm2*^{2.2}; posições 7, 8, e 18, genótipo *Pgm1*^{1.1}; posições 4, 5, 13, 14, 16 e 17 genótipo *Pgm2*^{1.2}; posições 6 e 12 correspondem ao genótipo *Pgm2*^{1.4}. (B) Representação esquemática dos fenótipos obtidos neste sistema para os dois locos; à esquerda encontra-se o padrão do controle (C) e sua mobilidade relativa; à direita os alelomorfos de *Pgm1* e *Pgm2* e suas mobilidades relativas, detectadas em *D. iulia*.

No sistema da aspartato aminotransferase (AAT) também chamado de glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), (Figura 3.7), foi encontrada atividade de dois locos, ambos polimórficos. O loco *Aat1* apresentou três alelos, com o alelo *Aat1*² sendo o mais freqüente, enquanto que o loco *Aat2* apresentou um maior número de alelos (cinco no total), o mais comum foi o alelo *Aat2*⁴. Os demais alelos de *Aat2* apareceram em baixa freqüência (Tabela 3.13). Os heterozigotos de ambos locos formam um padrão de três bandas, sugerindo estruturas diméricas para estas moléculas.

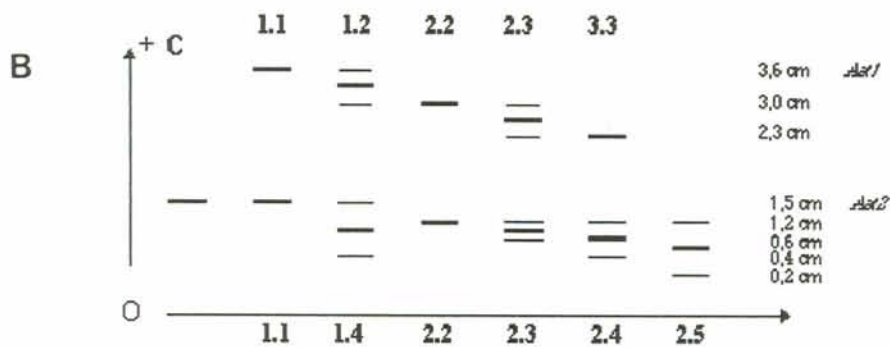
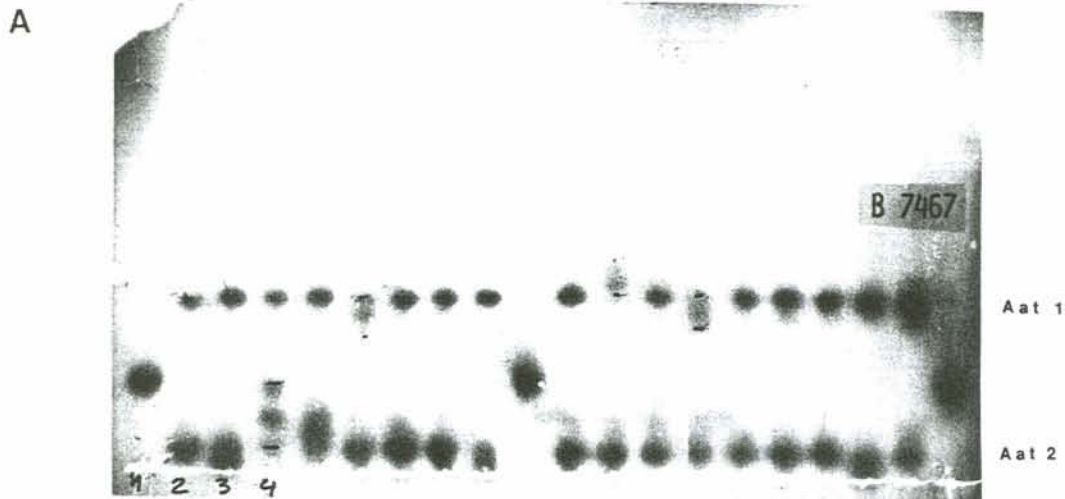


Figura 3.7. Padrão eletroforético obtido para o sistema da aspartato aminotransferase (AAT). (A) Posições 1, 10 e 20 controles, com relação ao loco $Aat1$; posições 6 e 14 correspondem ao genótipo $Aat1^{2,3}$, posição 12 genótipo $Aat1^{1,2}$, demais indivíduos correspondem ao genótipo $Aat1^{2,2}$, com relação ao loco $Aat2$: posição 4 corresponde ao genótipo $Aat2^{1,4}$; posição 5 genótipo $Aat2^{2,4}$, posições 3, 9 e 18, genótipo $Aat1^{4,5}$. (B) Representação esquemática dos fenótipos obtidos neste sistema; à esquerda encontra-se o padrão do controle (C) e sua mobilidade relativa, à direita a dos alelomorfos dos dois locos para AAT analisados em *D. julia*.

Tabela 3.13: Número de indivíduos para cada genótipo e freqüências gênicas para cada amostra, para os locos *Aat1* e *Aat2*.

loco	AMOSTRA	GENÓTIPO										ALELO					N
		1.1	1.2	1.4	2.2	2.3	2.4	2.5	4.4	4.5	5.5	1	2	3	4	5	
<i>Aat1</i>	I	-	2	-	34	2	-	-	-	-	-	0,026	0,947	0,026	-	-	38
	II	-	-	-	65	-	-	-	-	-	-	-	1,00	-	-	-	65
	III	-	2	-	75	2	-	-	-	-	-	0,013	0,974	0,013	-	-	79
	IV	-	-	-	82	1	-	-	-	-	-	-	0,99	0,01	-	-	83
<i>Aat2</i>	I	-	-	2	-	-	2	-	29	5	-	0,03	0,03	-	0,88	0,06	38
	II	-	-	8	1	-	2	-	53	2	-	0,06	0,03	-	0,89	0,02	66
	III	1	-	7	-	1	4	1	62	1	2	0,06	0,04	0,01	0,85	0,04	79
	IV	-	-	9	-	-	4	-	69	1	-	0,05	0,02	-	0,92	0,01	83

Para comparar as amostras com relação as frequências dos genótipos, aplicou-se o teste Λ (lambda) (SHIELDS & HEELER, 1979) devido aos valores esperados e observados terem sido muito baixos, invalidando assim a aplicação do teste do χ^2 de Pearson. Através deste teste pode-se mostrar que, no caso de *Mdh1*, *Pgm2*, *Aat1* e *Est2*, as amostras são diferentes, i.e., são heterogêneas quanto às frequências de determinados genótipos. Quando as amostras são combinadas em antes e depois do inverno apenas *Est2* mostrou-se diferente. No caso de *Mdh2*, *Pgm1*, *Aat2*, *Est1* e α -*Gpdh1* não houve diferenças significativas, quando as quatro amostras são tratadas como uma única, nem quando estas são separadas em: antes e depois do inverno, sendo por isso consideradas homogêneas.

Na tabela 3.14 são mostrados os valores de Λ estimados para todos os locos, agrupando-se as quatro amostras, e separando-as em antes e depois do inverno, quando a população desapareceu. Quando o teste é feito levando-se em conta o número de alelos, observa-se o mesmo padrão apresentado quando o teste é feito com a frequência dos genótipos.

Tabela 3.14. Valores de lambda calculado para todos os locos, agrupando-se as quatro amostras, e separando-as em antes e depois do inverno.

Loco	Amostra	Genótipos													Λ													
		1.1	1.2	1.3	1.4	2.2	2.3	2.4	2.5	3.3	4.4	4.5	5.5	1		2		3										
														Λ_e	Λ_T	Λ_e	Λ_T	Λ_e	Λ_T									
<i>Mdh1</i>	I	-	5	-	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43,77	22,457**	4,361	3,841*	9,1816	9,210**
	II	-	1	-	-	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	III	-	9	-	-	62	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	IV	-	2	-	-	78	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Mdh2</i>	I	-	-	-	-	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS	NS	NS	NS		
	II	1	-	-	-	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	III	-	-	-	-	77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	IV	-	-	-	-	81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Pgm1</i>	I	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS	NS	NS	NS		
	II	44	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	III	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	IV	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Pgm2</i>	I	13	9	-	2	10	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27,450	23,209**	NS	NS		
	II	17	8	-	2	19	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	III	19	17	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	IV	15	38	-	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Aat1</i>	I	-	2	-	-	34	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,268	7,115*	NS	NS		
	II	-	-	-	-	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	III	-	2	-	-	75	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	IV	-	-	-	-	82	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Aat2</i>	I	-	-	-	2	-	-	2	-	-	29	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS	NS	NS	NS		
	II	-	-	-	8	1	-	2	-	-	53	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	III	1	-	-	7	-	1	4	1	-	62	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	IV	-	-	-	9	-	-	4	-	-	69	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Est1</i>	I	-	-	-	-	39	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS	NS	NS	NS		
	II	1	-	-	-	61	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	III	-	2	-	-	71	4	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	IV	1	-	-	-	75	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Est2</i>	I	-	-	-	-	41	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19,729	13,815***	NS	12,868	9,210**	
	II	1	4	1	-	39	5	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	III	-	-	1	-	68	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	IV	1	7	-	-	63	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>α-Gpdh</i>	I	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS	NS	NS	NS		
	II	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	III	79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	IV	83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						

Λ = Calculado levando em conta: 1. as quatro amostras; 2. as amostras antes do inverno (1992); e 3. as amostras depois do inverno (1993), *: 0,05; **: 0,01; ***: 0,001.

3.4.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg para um e dois locos

Devido ao fato de os valores observados e esperados para as frequências genóticas terem sido muito baixos, o que inviabilizou a aplicação do teste de χ^2 , comparou-se a frequência de heterozigotos observados com a esperada através da equação de BAILEY (1974), sendo possível deste modo detectar o desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para as frequências genóticas. Na Tabela 3.15 são mostrados os valores dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg calculados para os sistemas investigados para *Dryas iulia*, em todas as amostras.

Pgm2 foi o único loco no qual o valor do desvio foi significativo; na amostra I esse valor foi igual a -2,796 ($p < 0,01$) e na amostra II equivaleu a -4,472 ($p < 0,001$), expressando uma carência de genótipos heterozigotos nestas duas amostras. Na amostra III, embora o valor continue indicando uma falta de heterozigotos, este não foi estatisticamente significativo, enquanto que na amostra IV o valor expressa um leve excesso de heterozigotos. Os demais locos analisados, exceto os locos *Mdh1* na amostra III, *Aat2* e *Est2* nas amostras II e IV mostraram uma carência de heterozigotos, todavia os valores não são estatisticamente significantes.

Tabela 3.15: Valores das heterozigosidades por loco por indivíduo H_o (obtida), H_e (esperada) em panmixia e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, calculado para todos os locos estudados.

Loco	Amostras	H_o	H_e	d	Significância
<i>Mdh1</i>	I	0,11	0,113	-0,042	NS
	II	0,015	0,02	-0,290	NS
	III	0,195	0,18	0,226	NS
	IV	0,027	0,04	-0,111	NS
<i>Mdh2</i>	I	0,00	0,00	0,00	NS
	II	0,00	0,02	-1,155	NS
	III	0,00	0,00	0,00	NS
	IV	0,00	0,00	0,00	NS
<i>Pgm1</i>	I	0,00	0,00	0,00	NS
	II	0,00	0,02	-0,953	NS
	III	0,00	0,00	0,00	NS
	IV	0,00	0,00	0,00	NS
<i>Pgm2</i>	I	0,314	0,549	-2,796	**
	II	0,213	0,538	-4,472	***
	III	0,386	0,471	-1,127	NS
	IV	0,576	0,500	1,300	NS
<i>Aat1</i>	I	0,11	0,115	-0,193	NS
	II	0,00	0,00	0,000	NS
	III	0,051	0,051	0,000	NS
	IV	0,010	0,020	-0,650	NS
<i>Aat2</i>	I	0,236	0,220	0,25	NS
	II	0,182	0,203	-0,424	NS
	III	0,180	0,270	-1,812	NS
	IV	0,170	0,150	0,494	NS
<i>Est1</i>	I	0,05	0,095	-1,047	NS
	II	0,06	0,096	-0,980	NS
	III	0,076	0,114	-1,063	NS
	IV	0,084	0,096	-0,371	NS
<i>Est2</i>	I	0,05	0,039	0,247	NS
	II	0,207	0,298	-10448	NS
	III	0,04	0,059	-0,588	NS
	IV	0,219	0,218	0,022	NS
<i>α-Gpdh1</i>	I	0,00	0,00	0,00	NS
	II	0,00	0,00	0,00	NS
	III	0,00	0,00	0,00	NS
	IV	0,00	0,00	0,00	NS

** : 0,01 *** : 0,001

3.4.2 Medidas da variabilidade genética

A variabilidade genética intrapopulacional foi estimada por três diferentes medidas: A: número médio de alelos por loco, P: proporção de locos polimórficos, e H_o : heterozigidade média por loco por indivíduo.

Na Tabela 3.16 encontram-se o número de alelos por loco por amostra para a população local de *D. iulia* de ABE, o número efetivo de alelos, bem como a média e o desvio padrão para este parâmetro. Biologicamente, o número efetivo de alelos, (A_e) é o número de alelos que é responsável pela heterozigidade observada na população.

Tabela 3.16: Número de alelos por loco, (A) número efetivo de alelos, (A_e) estimativa da média e variância do número de alelos por loco, para as quatro amostras da população de *D. iulia* de ABE.

Locos	Amostras								Média A	Variância A
	I		II		III		IV			
	A	A_e	A	A_e	A	A_e	A	A_e		
<i>Mdh1</i>	2	1,1	2	1,0	3	1,2	3	1,0	2,5	0,58
<i>Mdh2</i>	1	1,0	2	1,0	1	1,0	1	1,0	1,25	0,50
<i>Pgm1</i>	1	1,0	2	1,0	1	1,0	1	1,0	1,25	0,50
<i>Pgm2</i>	4	2,2	4	2,2	2	1,9	2	2,0	3,00	1,15
<i>Aat1</i>	3	1,1	1	1,0	3	1,1	2	1,0	2,25	0,96
<i>Aat2</i>	4	1,3	4	1,2	5	1,4	4	1,2	4,25	0,50
<i>Est1</i>	2	1,1	3	1,1	3	1,1	3	1,1	2,75	0,50
<i>Est2</i>	2	1,0	4	1,4	3	1,1	3	1,3	3,00	0,82
<i>α-Gpdh</i>	1	1,0	1	1,0	1	1,0	1	1,0	1,00	0,00
Total	20		23		22		20		2,36	
Média de A	2,22		2,56		2,44		2,22		2,36	
Variância de A	1,20		1,24		1,33		1,09		1,05	

O número médio de alelos por loco foi 2,36, o que significa que há cerca de dois alelos por loco em *D. iulia*, por amostra. A amostra que apresentou maior número médio de alelos por loco foi a amostra II, com 2,56. O loco que apresentou o maior número de

alelos foi o *Aat2*, com uma média de 4,25 para as quatro amostras; enquanto que o loco com menor número de alelos foi o de α -glicerofosfato desidrogenase com apenas um alelo nas quatro amostras.

Através da análise da variância pode-se constatar que as diferenças obtidas quanto ao número médio de alelos por loco entre as quatro amostras são estatisticamente significantes ao nível de 1%. Apesar das amostras I e IV não serem diferentes estatisticamente, elas diferem das amostras II e III, que por sua vez não são diferentes entre si, como pode ser visto pelos resultados do teste de Duncan ao nível de 5%, conforme o esquema abaixo:

Amostras	1	4	2	3
	Mai/92	Mai/93	Jun/92	Mar/93
Médias	2,22	2,22	2,56	2,44

A proporção de locos polimórficos estimada para a população de *D. iulia* de ABE variou entre 55 e 66%, com uma média de 63,1%. A amostra que apresentou o menor valor para este parâmetro foi a amostra II (inverno) n qual esse valor equivaleu a 55%, as demais amostras apresentaram valores de P iguais a 66,0% (Tabela 3.17).

Tabela 3.17. Heterozigosidade média por loco por indivíduo e proporção de locos polimórficos para os locos analisados nas quatro amostras para *D. iulia* em ABE.

Ams	<i>Mdh1</i>	<i>Mdh2</i>	<i>Pgm1</i>	<i>Pgm2</i>	<i>Aat1</i>	<i>Aat2</i>	<i>Est1</i>	<i>Est2</i>	α <i>Gpdh</i>	H _o	P
I	0,11	0,00	0,00	0,31	0,11	0,24	0,05	0,05	0,00	0,097	0,66
II	0,015	0,00	0,00	0,213	0,00	0,182	0,06	0,21	0,00	0,076	0,55
III	0,195	0,00	0,00	0,39	0,05	0,177	0,07	0,04	0,00	0,103	0,66
IV	0,037	0,00	0,00	0,576	0,012	0,169	0,08	0,22	0,00	0,122	0,66

O valor de H_o entre os diferentes locos analisados variou de 0,00 nos locos de *Mdh2*, *Pgm1* e α -*Gpdh* para todas as amostras e em *Aat1* na amostra II a 57,6% em *Pgm2* na amostra IV (Tabela 3.17). A ausência de polimorfismo em *Mdh2*, *Pgm1* e α -*Gpdh* pode ser devida à função desempenhada por essas enzimas, não suportando modificações em sua estrutura. O grau de heterozigosidade média observada por loco por indivíduo foi igual a 9,7% na amostra I, 7,6% na amostra II, 10,3% na amostra III e 12,2 % na amostra IV, sendo estes valores bastante baixos, dependendo da época do ano. Quando analisamos este parâmetro, podemos notar que nos locos *Mdh1*, *Aat1* e *Pgm2* ocorre uma diminuição na heterozigosidade observada à medida que o inverno se aproxima, i.e., à medida que a temperatura cai.

3.4.3 Estatística F

Ainda que a estatística F tenha sido originalmente apresentada para a análise da estruturação espacial das populações, resolveu-se aplicá-la no caso presente, pois as quatro amostras tomadas no tempo podem ser tratadas como quatro amostras de locais diferentes. A Tabela 3.18 apresenta os dados relativos a esta análise. Como se pode ver, para o componente F_{IS} , apenas os locos *Pgm2* e *Est2* foram significantes ($p < 0,05$); levando-se em conta todos os locos, o F_{IS} não é significativamente diferente de zero. Já para o componente F_{ST} todos os valores calculados foram negativos e baixos (não significantes), sugerindo que as quatro amostras podem ser tratadas como uma única, o que biologicamente corresponde à realidade.

Tabela 3.18: Valores de F_{ST} , F_{IS} e F_{IT} para as quatro amostras de *Dryas iulia* em ABE.

Locos	F_{IS}	χ^2	F_{ST}	χ^2	F_{IT}	GL
<i>Mdh1</i>	-0,0068	0,0126	-0,0068	+	-0,0137	6
<i>Mdh2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pgm1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pgm2</i>	-0,2355*	15,1406	-0,0037	+	0,5649	6
<i>Aat1</i>	-0,0323	0,2848	0,0017	+	0,0340	5
<i>Aat2</i>	-0,1169	3,7303	-0,0456	+	0,0766	7
<i>Est1</i>	-0,0770	1,6186	-0,0075	+	0,0703	5
<i>Est2</i>	-0,2470*	16,6555	-0,0079	+	0,2410	6

(*) $P < 0,05$; (+) Valores negativos; (-) Loco monomórfico.

4. DISCUSSÃO

A variação encontrada no tamanho das asas anteriores para a população local de *Dryas iulia* de Águas Belas, para ambos os sexos, sugere uma influência marcante das condições climáticas sobre este caráter (Tabela 3.5). Na realidade o efeito primário da mudança climática pode ter sido sobre a qualidade das plantas hospedeiras (SING, 1972; GILBERT & SINGER 1975). Como se sabe a variação sazonal tem efeitos consideráveis sobre a fisiologia vegetal (TAIS & ZEIGER, 1991). Sabe-se também que as plantas variam seu conteúdo de água ao longo do dia e sazonalmente, dependendo da temperatura e insolação (HANSON & HITZ, 1982). Embora as evidências sejam ainda pouco extensas, já existem dados bastante convincentes de que, dependendo da qualidade da luz e do fotoperíodo, plantas herbáceas e plântulas aumentam o tamanho do pecíolo, o peso seco do caule, reduzem a área foliar e a quantidade de ramificações e ainda apresentam notável redução na quantidade de clorofila (SMITH, 1982). Entre as variáveis climáticas, a temperatura é uma das principais, e governa tanto a distribuição como a adaptação dos vegetais. O espectro e o conteúdo das proteínas pelas plantas é freqüentemente alterado a temperaturas próximas ou abaixo daquela limite para o desenvolvimento. Outrossim tem sido observado que com a queda da temperatura o nível de ATP disponível nos tecidos vegetais baixa; e em *Passiflora edulis* foi observado um acúmulo de alanina com o resfriamento. Isto sugere que produtos finais da via glicolítica são acumulados nas folhas a baixas temperaturas. Além disso tem sido relatado que com a queda da temperatura ocorre perda de íons em algumas espécies de *Passiflora* (GRAHAM &

PATTERSON,1982).Durante as condições climáticas de inverno, quando a temperatura é baixa, o céu nublado e há elevada umidade no ar, o desenvolvimento dos insetos torna-se mais lento. Nestas condições, o requerimento de itens alimentares dos predadores, frequentemente aumenta, o que constitui-se em fator adicional para a redução nas populações de presas (borboletas por exemplo). Deste modo, condições vigentes durante o inverno e mesmo logo após, podem influenciar as populações de borboletas, mantendo-as em baixos números (GILBERT & SINGER, 1975). Além da influência indireta exercida pelas condições climáticas adversas sobre as larvas, há que considerar também a influência da parte da planta onde foram depositados os ovos. Em *Dryas iulia*, larvas alimentadas com folhas imaturas e brotos (meristemas) podem diferir marcadamente daquelas alimentadas com folhas maduras (velhas) (obs.pessoal; BENSON, 1978; THOMPSON & PELLMYR, 1991).No campo tem sido observado que *D. iulia* parece escolher para ovoposição, além das gavinhas secas, aquelas folhas maduras e mais velhas. Esta seleção feita pela fêmea, por uma parte de planta para ovoposição tem grandes e importantes conseqüências evolucionárias.

Aplicando-se o teste de Duncan, ao comprimento das asas, foram agrupadas as amostras com médias semelhantes, de forma que, para os machos obteve-se igualdade nas amostras de outono dos dois anos consecutivos (maio de 1992 e 1993), com médias no valor de 3,34 cm e 3,38 cm, respectivamente. Entretanto, estas mostraram-se significativamente diferentes da amostra de inverno, realizada em junho de 1992 com média igual a 3,18 cm e a do final do verão, em março de 1993 com média igual a 3,58 cm ($p < 0,05$). Para as fêmeas obteve-se uma tendência semelhante, porém as amostras I e II

de inverno e outono de 1992, com médias de 3,05 cm e 3,14 cm, respectivamente, não foram diferentes estatisticamente, o mesmo aconteceu com as amostras I e IV, ambas realizadas no outono, com médias de 3,14 cm e 3,19 cm, dos anos de 1992 e 1993 respectivamente. Além dos efeitos sazonais registrados acima e que são semelhantes nos dois sexos (não há interação) um aspecto fundamental a destacar é o fato de que os machos são sempre maiores do que as fêmeas, o que havia sido detectado por HAAG (1992) para ABE e outras localidades, o que parece indicar que o dimorfismo sexual nesta espécie mostra-se, de modo geral contrário a maioria de outros grupos de insetos (veja-se por exemplo a citação a Darwin na página 39 da Introdução)

Com relação ao perímetro das asas a tendência encontrada foi semelhante (Tabelas 3.7 e 3.8), indicando uma diminuição dos valores à medida que a temperatura cai e a população se aproxima do inverno. A existência dessas diferenças nas dimensões das asas revela que as amostras não são homogêneas quando tomadas no tempo (Tabelas 3.4, 3.5 e 3.6). A amostra do final do verão (março/1992) apresentou os maiores valores médios, enquanto que a amostra de inverno, apresentou os menores. Foi destacado por HAAG & ARAÚJO (1994) a dificuldade de se explicar as diferenças encontradas apenas em base das plantas hospedeiras usadas pelas larvas, uma vez que em todas as localidades amostradas por eles, com apenas uma exceção (Turvo), a principal fonte de alimento para os estágios imaturos foi *Passiflora suberosa*. Além disso essa espécie confere uma alta taxa de crescimento para *D. iulia* (PÉRICO & ARAÚJO, 1991). No caso da população de ABE, a única planta hospedeira usada por *D. iulia* é *P. suberosa*, a qual é muito

abundante no local. Desta forma uma possível fonte de variação fica controlada, permanecendo a variável “condições climáticas” como um conjunto heterogêneo.

A natureza efetiva dos agentes climatológicos pode ser apreciada pela análise da variância. Mesmo com poucas variáveis morfológicas pode-se reconhecer o padrão imposto pelas referidas condições sobre o fenótipo dos indivíduos da população. Do ponto de vista de uma “hermenêutica biológica” a mais óbvia conclusão obtida pela análise do tamanho, foi a de que o comprimento das asas de ambos os sexos, bem como possivelmente para outras variáveis não medidas, respondem prontamente à ação dos agentes climáticos e esta resposta é verificada mesmo em populações com sobreposição de gerações como é o caso de *D. iulia*. GRANT & GRANT (1993) salientaram que quando o clima muda entre estações ou anos, mudanças ecológicas nas populações são freqüentemente observadas. Convém salientar que a expressão fenotípica potencial de um dado genótipo em relação a todas as condições ambientais sob as quais uma espécie pode sobreviver, tem sido descrita como norma de reação (MAYR, 1977). Certas normas são bastante restritas, indicando a presença de um mecanismo genético-homeostático bem desenvolvido, enquanto outras podem ser amplas.

HAAG (1992) sugeriu quatro possibilidades para a manutenção das diferenças entre os locais, quando analisou indivíduos provenientes de seis pontos geográficos diferentes no Estado. Essas possibilidades são tomadas aqui para tentar entender as diferenças no tempo. Porém como argumentarei adiante, a diferença observada entre os locais pode ser devida a influência da época da coleta, e não uma adaptação imediata às

condições locais como bem salientaram GOULD & LEWONTIN (1979), ou seja, não devido a influência do local *per se*.

Com relação à primeira possibilidade, esta invoca a tradicional explicação baseada nos efeitos de extinção e recolonização postulados para os heliconíneos das regiões subtropicais. Flutuações nas condições dos ambientes podem tornar o habitat temporariamente inadequado para os organismos, assim populações como as de *D. iulia*, amplamente distribuídas, poderiam persistir através de um "equilíbrio" entre extinção local e recolonização. Todavia seria necessário, como salienta o referido trabalho, localizar os refúgios onde as populações se manteriam durante o inverno, e de onde os indivíduos se dispersariam colonizando outras áreas. Esta hipótese no entanto perde sua força tendo em vista o que foi constatado no presente trabalho: (1) a regularidade nas flutuações de tamanho e perímetro das asas conforme as estações do ano (Tabela 3.6 e 3.9) e (2) a regularidade nas frequências de alguns parâmetros gerais como P e H (Tabela 3.17). Além do mais, estudos conduzidos com amostras únicas no tempo, podem levar a conclusões enganosas por desconsiderar a variabilidade existente ao longo do tempo dentro das populações (VIA, 1990).

Na segunda e terceira possibilidades, que talvez sejam mais prováveis no presente caso, seria a de que o tamanho das asas de certos insetos esteja relacionado à estabilidade do habitat e a fatores climáticos (GREENWOOD, 1988), ao fotoperíodo (ZERA e cols., 1983) e à temperatura (TAYLOR, 1981; WOLDA, 1988). Foi verificado que em ambientes instáveis no tempo, como ocorre em florestas decíduas, *Ectopsocus briggisi* e *Gaphopsocus cruciatus* (Psocoptera) apresentaram formas aladas, enquanto em florestas

não caducifólias a predominância foi de formas braquípteras possivelmente devido à constância na disponibilidade de recursos alimentares. Observações sistemáticas realizadas em campo mostraram que ABE caracteriza-se por um ambiente instável no tempo, embora com uma regularidade anual. A instabilidade é decorrente da temperatura e das condições climáticas vigentes ao longo do ano. À medida que as estações vão se sucedendo a luminosidade (fotoperíodo) diminui com a aproximação do inverno e a temperatura cai para próximo de 4°C podendo ser até mais baixa, o que determina alterações nas condições fisiológicas das plantas hospedeiras (*Passiflora suberosa*, a mais abundante no local), e certamente nos estágios imaturos (larvais) de *D. iulia*. Tendências sazonais na performance de larvas podem acompanhar o padrão encontrado para o conteúdo de água e nitrogênio nos tecidos das plantas hospedeiras. Por exemplo a eficiência de assimilação (digestibilidade aproximada) para lepidópteros, em bétula na Finlândia, declinou de 60% no verão para 10-15% no outono-inverno; paralelo ao declínio no conteúdo de água de 72% para 57% e o conteúdo de nitrogênio diminuiu de 3% para menos que 1%, isto é, a melhor performance larval foi observada quando a planta apresentava os maiores conteúdos de água e nitrogênio (SCRIBER & FEENY, 1979; SCRIBER & SLANSKY, 1981). Em insetos holometábolos especificamente, mas também em outros organismos, alguns fatores ambientais são mais importantes em um estágio da história de vida do que em outro (ATCHLEY, 1970; GILBERT & SINGER, 1975).

A quarta possibilidade, a competição por recursos alimentares, seria o fator responsável pela diferença observada no tamanho das asas de machos e fêmeas. Embora com frequência se observe na natureza muitos indivíduos alimentando-se ao mesmo tempo

em uma planta de *Lantana camara*, esta interação parece estar longe de ser agonística, uma vez que em locais com densidade elevada dessa espécie, podem ser visto agrupamentos com cerca de cem indivíduos (GARCÍAS, 1983). Estes grupos (“panapaná”) também podem ser vistos em bancos de areia úmida, em riachos nas bordas de florestas, onde foram registrados mais de 60 indivíduos tomando água e sais ao sol. Em nenhum momento pareceu existir qualquer manifestação de hostilidade ou disputa pelo recurso alimentar. Entretanto ROSENBERG & ENQUIST (1991) mostraram que em borboleta territorial (*Limenitis weidemeyerii*), machos grandes alcançam maior sucesso na defesa e manutenção de áreas contendo sítios de oviposição. Nesta espécie, os indivíduos com maior tamanho de asas foram frequentemente vitoriosos. A diferença entre os locais, relativo ao tamanho das asas observados por HAAG & ARAÚJO, (1994) pode ser perfeitamente explicada se for levado em consideração a época na qual foi realizada a coleta ,i.e., a temperatura média de cada estação.

Resta-nos então tentar explicar não a diferença entre os locais que talvez não exista, mas a diferença encontrada entre os sexos, que por ser consistente em todos os seis locais estudados no referido trabalho pode ter uma base genética, o mesmo aconteceu em uma população amostrada em Santa Maria (obs. pessoal). Deste modo tem-se que postular ser esta diferença uma adaptação antiga no tempo, característica da espécie (Seleção sexual?).

Como bem salientou HAAG (1992) a dispersão parece ser uma estratégia importante no modo de vida de *D. iulia*, o que pode ser constatado pela simples observação de seus hábitos, e pelo monomorfismo verificado dentro da espécie quanto ao

padrão de coloração das asas através de toda sua distribuição geográfica. Amostras sistemáticas realizadas na natureza, revelaram um desvio na proporção sexual, favorecendo os machos, o que talvez seja devido ao comportamento das fêmeas que voam baixo escondidas entre a vegetação à procura de planta hospedeira, ficando deste modo, invisíveis aos predadores e aos coletores. Todavia esse dimorfismo comportamental não pode ser visto como consequência de uma poligamia exclusiva dos machos como desejou crer HAAG (1992). Tem sido sugerido baseado em evidências circunstanciais, que as fêmeas também sejam poligâmicas (obs. pessoal; GARCIAS, 1983; MOREIRA, comunicação pessoal).

Uma vez que os machos apresentam uma envergadura maior, devem ter uma maior capacidade de vôo. Deste modo voando distâncias maiores teriam seu valor adaptativo aumentado, o que os possibilitaria atuarem como agentes de dispersão de seus genes. Em *Drosophila melanogaster* ambos, vôo e produção de ovos, dependem da mesma reserva de energia e a dispersão reduz a fecundidade, tendo consequências óbvias para o “fitness” dos dispersantes (ROFF, 1986). Todavia, não se pode deixar de argumentar, que a dispersão é arriscada, no sentido de que pode aumentar o risco de predação.

Pode-se, com base em fatos conhecidos, apresentados a seguir e nos dados obtidos da morfometria, enumerar algumas hipóteses, tentando explicar o polimorfismo de tamanho de asas em *Dryas iulia*.

Talvez o maior tamanho das asas observado nos machos esteja relacionado não somente ao vôo de longas distâncias, mas também à duração do vôo dentro de seu “home-

range” a procura de recursos tróficos e principalmente de fêmeas para cópula. Inicialmente devemos supor que o sucesso reprodutivo dos machos seja proporcional a quantidade de tempo gasto na tentativa de reproduzir-se, i.e., a procura por fêmeas receptivas. Enquanto tenta reproduzir-se, um macho deve voar mais tempo, como elegantemente foi mostrado por HARDER (1985). O tamanho das asas em *Bombus spp.*, foi o caráter morfológico mais importante na explicação da variação no tempo de vôo, logo, machos devem apresentar um tamanho ^{de asa} que ^{os} possibilite gastar mais tempo na procura por fêmeas, percorrendo uma maior área, maximizando seu deslocamento. ^{é uma adaptação.} Conseqüentemente, ^{por outro lado,} embora machos menores gastem menos tempo alimentado-se, o número de vezes que o fazem aumenta e a distância percorrida em vôo diminui.

Como o sucesso reprodutivo é suposto ser proporcional ao tempo gasto por um macho tentando reproduzir-se, o peso ótimo para os machos, previsto pela hipótese acima é sempre menor do que o peso das fêmeas, o que realmente ocorre na natureza (peso médio das fêmeas: 0,18 mg $s^2 = 0,0021$, $n = 20$; peso médio dos machos 0,15 mg, $s^2 = 0,00047$, $n = 48$). Além do mais, em muitas espécies, machos podem reduzir sua assimilação de energia enquanto tentam reproduzir-se (REISS, 1989); desta forma machos grandes teriam vantagem sobre os menores, pois como acontece entre algumas espécies de mariposas os machos podem estar sendo selecionados pela maximização da distância que podem voar. Assim, possuir asa de maior comprimento é uma vantagem intrasexual, avaliada em termos de seu efeito na taxa de fertilização, supondo que o caráter tenha igual sobrevivência em termos de seleção natural (PARKER, 1970; REISS, 1989). Esta

hipótese pode ser uma explicação para o aparente paradoxo, de que os machos mesmo sendo em média maiores do que as fêmeas, pesam em média menos do que estas.

Reprodução e longevidade em lepidópteros são geralmente tidos como limitados pelas reservas de nitrogênio acumulado durante a alimentação da larva e estocadas nos corpos gordurosos (PIANKA e cols., 1977). O maior gasto com esforço reprodutivo nas fêmeas destes insetos é o investimento de nutrientes nos ovos; estes nutrientes são derivados em vários graus da alimentação da larva e do adulto. Entretanto, conforme foi elegantemente demonstrado por BOGGS & GILBERT (1979), fêmeas de *Danaus plexippus*, *Heliconius hecale* e *H. erato*, incorporam nutrientes provenientes do macho via espermatóforo. Estes nutrientes são secreções de glândulas sexuais acessórias e são constituídos por um complexo de proteínas, hidratos de carbono, diglicerídeos, triglicerídeos, esteróis e fosfolípidos (BOGGS, 1981; MARSHALL, 1982; THORNHILL & GWYNNE, 1986).

Estes achados sugerem que tais substâncias podem contribuir não somente para a vitelogênese, mas também para a manutenção somática da fêmea; desta forma, proteína é um fator limitante na produção de ovos pelos insetos. Em *Colias spp.* (THORNHILL & GWYNNE, 1986) e em fêmeas da mosca varejeira *Calliphora erythrocephala* (STRANGEWAY-DIXON, 1959), a ingestão aumentada de proteínas resultou em grande número de ovos depositados. Investindo esses compostos ricos em energia, os machos podem prover as fêmeas, permitindo a estas gastarem menos tempo ^{na procura} procurando por recursos alimentares, expondo-se menos à predação, maximizando deste modo o tempo de ovoposição.

Tal investimento deve, através da seleção sexual, afetar a evolução das diferenças entre os sexos, quanto ao comportamento, ecologia e assim por diante. MARSHALL (1982) demonstrou que em *Colias philodice*, onde os machos fazem significativo investimento, as fêmeas copulam preferencialmente com machos grandes. Fêmeas de *D. iulia* podem estar discriminando parceiros para cópula, de modo que machos grandes sejam favorecidos, pelo investimento potencial que estes representam. Com relação ao tamanho maior das asas pode-se citar também como exemplo *Drosophila melanogaster*, na qual os machos maiores obtêm mais facilmente acesso às fêmeas (PARTRIDGE e cols., 1987).

Outra possibilidade apropriadamente destacada por HAAG (1992), seria a de que o maior tamanho dos machos, aliado a sua coloração fortemente alaranjada e brilhante, os tornasse mais aposemáticos, atraindo para si a atenção e o aprendizado do predador, enquanto que as fêmeas, por apresentarem uma coloração mais opaca, aliado ao comportamento de voar em meio à vegetação, o que as torna relativamente ocultas, estariam menos expostas à predação. As fêmeas sofrem influências do efeito da grande cobertura vegetal, i.e., uma densa cobertura vegetal tende a reduzir a quantidade de luz (radiação solar), que alcança o solo, pela absorção e sombreamento das folhas. Além disso a temperatura neste ambiente é mais baixa do que em locais com luz solar direta (HOVANITZ, 1940), sugerindo que esses fatores concorram para que o pigmento das asas das fêmeas seja mais escuro e opaco, justamente para absorver a radiação solar, enquanto que os machos, mais claros e brilhantes, refletem mais luz. Além disso, as cores aposemáticas dominantes em borboletas impalatáveis, em particular, da região Neotropical

UM MAIOR TAMANHO NAS DIMENSÕES LINEARES, PODERIA SER INDICATIVO DE UM MAIOR ESPERMATÓFORO. SE ISTO OCORRE ESTÁ PREPARADO O CENÁRIO PARA O PROCESSO DE

112

SELEÇÃO SEXUAL. FORTE PREFERÊNCIA POR PARTE DA FÊMEA, SELECIONARA DIRETAMENTE PARA CARACTERÍSTICAS MAIS EXAGERADAS NOS MACHOS. O RESULTADO PODE SER UM "RUNAWAY PROCESS" (FISHER, 1930; KIRKPATRICK & BARTON, 1995¹; IWASA & POPIANKOWSKI 1995²).

1- NATURE, 377 (6548): 388

2- NATURE, 377 (6548): 420-22

são: laranja (e.g., fundo de cor laranja e detalhes em preto nos complexos miméticos laranja e tigre), vermelho e negro (manchas vermelhas em fundo de cor negra, nos gêneros: *Battus*, *Parides* e *Heliconius*) (PAPAGEORGIS, 1975; De VRIES, 1987; CHAI, 1988).

Asas mais longas capacitariam a seus portadores, melhores chances de escape à predação. Uma outra alternativa que pode ser invocada para explicar o dimorfismo sexual de comprimento das asas, seria a seleção sexual, *stricto sensu*, na qual as fêmeas estariam escolhendo, para cópula, machos com asas de maior tamanho. Existem alguns custos e benefícios diretos decorrentes desta escolha. Os benefícios podem incluir: segurança na fertilização e maior conteúdo nutricional do ejaculado (espermatóforo). Todavia os custos desta escolha incluem tempo, energia, risco à predação e competição com outras fêmeas (ROSENQVIST & BERGLUNG, 1992). Tem sido mostrado que em espécies onde ocorre cruzamento preferencial para o tamanho, a razão Pm/Pf (peso dos machos dividido pelo peso das fêmeas) é prevista ser muito próximo a unidade e exceder aquelas espécies onde o cruzamento é aleatório relativo ao tamanho (REISS, 1989). A relação Pm/Pf , encontrada para *D. iulia*, foi igual a 0,83. Em anfíbios, nas espécies onde ocorre cruzamento aleatório relativo ao tamanho o valor para esta relação foi igual a 0,28 para *Eleutherodactylus altamazonicus*, 0,71 para *Bufo americanus* e em insetos, 0,78 para *Chauliognathus pensilvanicus*. Entretanto, espécies que apresentam cruzamento preferencial para o tamanho, nem sempre mostrarão valores maiores de Pm/Pf do que aquelas nas quais o cruzamento é aleatório relativo ao tamanho. Como exemplo podemos citar a mosca *Scaptophaga stercoraria*, onde não há cruzamento preferencial para o

tamanho, a relação Pm/Pf , equivaleu a 1,29, mostrando que os machos são muito maiores do que as fêmeas (REISS, 1989). Novamente desconhecemos o que realmente ocorre com *D. iulia* na natureza; uma saída seria capturar casais em cópula, medir o tamanho das asas e pesar ambos e observar o que ocorre. Pode-se argumentar que a característica que está sob ação da seleção natural é a escolha das fêmeas. Esta escolha leva, entre os machos, ao desenvolvimento da seleção sexual. Esta consideração pode levar-nos a mudar o enfoque da questão sobre: quais são os machos mais “populares” e porque, para: por que e para qual característica as fêmeas estão direcionando sua escolha. Estudos experimentais seriam importantes neste caso, devido a poderem mostrar diretamente quais características dos machos são usadas pelas fêmeas na discriminação dos parceiros para cópula (KIRKPATRICK, 1987; REYNOLDS & GROSS, 1990).

Uma evidência indireta de seleção sexual vem das próprias medidas tomadas de ambos os sexos extraídos das quatro amostras. Pode-se notar que a variância na medida para o perímetro das asas dos machos (que é uma estimativa da área das mesmas) é menor que a variância encontrada nas medidas do perímetro das asas das fêmeas (tabela 3.9). Isso pode estar indicando que existe uma pressão na direção de uma menor variância na área das asas para os machos. É possível que as fêmeas estejam escolhendo machos com asas maiores e que exista um ótimo para esta variável. Além disso, BOGGS (1981) demonstrou para *D. iulia* que a medida que aumenta o tamanho corporal, aumenta significativamente também a proporção de reservas nitrogenadas destinadas à reprodução*. Em *Heliconius hewitsoni* onde ocorre “pupal mating”, há sugestão de que a seleção favoreça um maior tamanho de asas e um menor tamanho do corpo em machos (DEINERT e cols., 1994).

* AI ESTÁ UMA CORRELAÇÃO QUE TAMBÉM PODE EXISTIR ENTRE O TAMANHO DAS ASAS E O TAMANHO DO EPERMATÓFORO, UMA VEZ QUE ESTE CONTEM MUITO NITROGÊNIO NA FORMA DE PROTEÍNA E DNA (BASES NITROGENADAS).

Deste modo, possuir asas maiores, seria a prova de que possuem uma maior resistência ou autonomia e capacidade de vôo. Esta tendência na redução da variância foi constante nas quatro amostras deste trabalho e como salientou GOULD (1988), a redução na variância, intrinsecamente revela uma direção. Além disso, indivíduos de tamanho maiores são favorecidos pela seleção natural intraespecífica seja porque conseguem melhor acesso aos recursos alimentares ou por fugir à predação e como consequência deixam uma maior prole do que seus parentes menores (BROWN & MAURER, 1986). Havendo uma relação do comprimento das asas com a capacidade de vôo pode-se invocar que a seleção sexual seria a responsável por este fato. Com relação ao perímetro do triângulo inscrito na área da asa, pode-se perceber a mesma tendência. O perímetro é um estimador da área da asa, e como já foi visto, os machos são em média maiores do que as fêmeas (Tabela 3.9). Todavia mesmo sendo maiores apresentam menor variação quando comparados com as fêmeas (veja coluna do CV nesta mesma tabela). Podemos afirmar, que o coeficiente de variação está a grosso modo relacionado ao valor adaptativo, i.e., a variabilidade de uma característica morfológica está inversamente relacionada ao seu efeito sobre a sobrevivência e reprodução. Parece que ^{o VALOR DA} área da asa nos machos é mais importante para sua sobrevivência e reprodução do que para as fêmeas. Todavia a correlação inversa entre variabilidade e aptidão darwiniana não significa necessariamente que uma característica posicionada decrescente de variabilidade, esteja em uma posição de efeito crescente sobre o sucesso reprodutivo (SOULÉ, 1982).

A carga da asa (massa do corpo/ área da asa) é menor nos machos, uma vez que o peso destes é em média menor do que o peso das fêmeas. Este fato favorece a hipótese

de que machos maiores devem apresentar como consequência maior resistência e capacidade de vôo; e machos com maior área de asa teriam vantagem sobre os menores^{de}.

Como as três hipóteses lidam com a associação entre tamanho das asas e resistência, autonomia e capacidade de vôo, é possível que se esta associação for verdadeira estas formas de seleção estejam ocorrendo concomitantemente na natureza. Certamente quando ocorre um aumento de tamanho, este ocorre em resposta à pressão de seleção, resultando em uma ou mais vantagens (STANLEY, 1973).

Quando comparamos as frequências genóticas observadas nos dois momentos, antes e depois do inverno, i.e., antes e depois da severa redução da população, através da estatística Λ (lambda) (SHIELDS & HEELER, 1979), encontramos diferença significativa para os locos *Mdh1*, *Pgm2*, *Got1* e *Est2*, ($0,05 < p < 0,01$), o que significa que a população diferiu em suas frequências genóticas de um momento para outro, embora aquela estatística não teste equilíbrio genético e sim associação de duas ou mais categorias. Isso talvez deveu-se ao efeito das condições climáticas, aliado ao fluxo gênico entre populações vizinhas. Para os demais sistemas, as diferenças não foram estatisticamente significantes. A mesma tendência foi verificada para a distribuição das frequências alélicas, i.e., os mesmos locos que se mostraram significantes para as frequências genóticas aqui também o foram. Em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, apenas o loco *Pgm2*, mostrou-se fora do equilíbrio nas amostras I e II, embora na amostra IV tenha atingido quase o limite da significância (Tabela 3.15). Coincidentemente utilizando-se o procedimento proposto por WEIR (1990 p. 86), foi possível detectar que na amostra I cada heterozigoto individualmente não foi responsável

pelo desequilíbrio, embora o heterozigoto *Pgm1*^{1,2} tenha contribuído decisivamente para o desequilíbrio. Já na amostra II ambos os heterozigotos *Pgm1*^{1,2} e *Pgm1*^{1,4}, estavam significativamente desequilibrados. Embora o presente trabalho tenha sido conduzido de modo a descrever o comportamento da variabilidade genética ao longo do tempo, evitando-se assim algumas limitações referidas por SCHAAP (1980) não foi possível distinguir um efeito fortuíto de um efeito sistemático.

Analisou-se também, onde foi possível, equilíbrio para dois locos simultaneamente (*Est1* vs *Est2*; *Pgm1* vs *Pgm2* e *Aat1* vs *Aat2*); em nenhum destes casos a matriz gamética indicou qualquer desequilíbrio de ligação (naturalmente que por esta última expressão quer se designar associação entre locos). HAAG e cols., (1993) referem um desequilíbrio para o sistema enzimático das fosfoglicomutases e para a mesma população aqui estudada. Infelizmente comparando-se as mobilidades relativa das bandas não foi possível tratá-las como um mesmo loco, apesar de terem sido repetidas as mesmas condições de migração. O desequilíbrio de ligação relatado foi entre os locos de *βEst1* e *Lap1* ($p < 0,01$). Este desequilíbrio não pode ser corroborado neste trabalho devido ao fato da má resolução eletroforética por nós obtida utilizando as mesmas condições de migração e revelação utilizadas por aqueles autores. Inclusive análises de progênie de cruzamentos controlados não nos permitiram confirmar o controle genético das isoenzimas de LAP proposto por HAAG e cols., (1993). Assim, não pudemos confirmar o desequilíbrio de ligação encontrado anteriormente.

A enzima fosfoglicomutase catalisa a transferência de um grupo fosfato entre a posição 1 e 6 de uma molécula de glicose. Esta interconversão de glicose-1-fosfato e

glicose-6-fosfato pela fosfoglicomutase é importante passo na produção e gasto de reservas energéticas dos organismos. Observou-se por exemplo, que o tempo que uma borboleta pode voar continuamente é afetado pelo genótipo do loco *Pgm* (GOULSON, 1993), o que indica uma participação de forma vital na fisiologia do voo, por parte de PGM, tornando-a uma enzima suscetível à seleção.

A variabilidade genética ao nível de alozimas, estimada empregando-se os três parâmetros usuais, como descrito em 3.4.3 “Medidas da Variabilidade Genética” mostrou uma tendência semelhante àquela encontrada para o tamanho das asas. Valores mais elevados nas estações favoráveis, e menores nas estações desfavoráveis. A heterozigosidade média por loco por indivíduo, que é o parâmetro mais representativo da real variabilidade da população, oscilou entre 9,7% na primeira amostra (maio/1992, final de outono), 7,6% na segunda (junho/1992, início de inverno), 10,3% na terceira (março/1993, final do verão) e 12,2% na quarta amostra (maio/1993, final do outono). Estes valores observados, acompanham o aumento da população, em épocas favoráveis, uma vez que o maior valor observado para H ocorreu justamente na época do maior tamanho populacional. Em geral, os componentes do valor adaptativo tais como taxa de crescimento, eficiência fisiológica e fecundidade aumentam com a heterozigosidade individual (MITTON, 1993). Todavia não se pode afirmar que o decréscimo no número de indivíduos seja causado pelo decréscimo em H, uma vez que ambos N e H diminuíram com a queda da temperatura nos meses frios do ano.

A proporção de locos polimórficos que é um estimador grosseiro da variabilidade, (por não levar em consideração, nem o número de alelos presentes em cada

loco nem sua frequência) variou de 55% na segunda amostra a 66% nas demais. Na Tabela 3.17, são mostrados os parâmetros que medem a variabilidade genética populacional, discriminados por amostra e por sistema enzimático analisado. O número médio de alelos por loco, variou de 2,22 alelos na primeira e quarta amostra, 2,56 alelos na segunda, e 2,44 na terceira amostra. Este parâmetro representativo do polimorfismo potencial, uma vez que a frequência alélica mesmo baixa, poderá aumentar no futuro, podendo ser ainda indicativo do efeito do fundador na população. Por outro lado, pode-se verificar na mesma tabela, que o número efetivo de alelos foi menor, e em alguns casos muito menor, indicando que a heterozigosidade encontrada poderia ser explicada levando-se em conta um número menor de alelos com frequências similares. Reduções na heterozigosidade em muitos locos individuais têm sido observado, especialmente em eventos de reduções severas no número de indivíduos (LEBERG, 1992). Todavia, “bottlenecks”, apresentam efeitos muito maiores sobre a diversidade alélica do que sobre a heterozigosidade (NEI e cols., 1975; BRYANT, 1983; LEBERG, 1992), isto devido ao crescimento rápido, posterior ao “efeito gargalo de garrafa” na população, como ocorre em *D. iulia*. Essas indicações fornecidas pela análise de locos particulares sugerem que o polimorfismo detectado em *Pgm2*, em *D. iulia*, esteja sob ação da seleção do tipo balanceadora, no sentido de, em determinadas condições ambientais, aumentar a resistência e a capacidade de vôo, daqueles indivíduos portadores de uma combinação adequada de alelos, e conseqüentemente sua aptidão em dispersar; mantendo assim o polimorfismo neste loco.

Por outro lado, *Pgm2* foi o único loco no qual foi verificado uma carência de heterozigotos, estatisticamente significativa no nível de $p < 0,01$ e $p < 0,001$, na primeira e segunda amostra respectivamente. Além disso, neste sistema encontrou-se os mais altos valores de heterozigosidade (Tabela 3.15 e 3,17), contrariando a afirmação de GILESPIE & KOJIMA (1968), LEWONTIN (1973), de que enzimas envolvidas na produção de energia apresentam, em geral heterozigosidade mais baixa. Entretanto, observações mais detalhadas de populações naturais não corroboram essas primeiras afirmações.

Conseqüências bioquímicas, fisiológicas e ecológicas do polimorfismo nos locos das fosfoglicomutases, fosfoglicose isomerases e glicose-6-fosfato desidrogenases em *Colias philodice eriphyle* e *C. eurytheme*, tem revelado que heterozigotos apresentam a mais alta eficiência catalítica em baixas temperaturas. Este fato foi correlacionado com a vantagem do heterozigoto no período inicial do vôo, pela manhã (WATT, 1977; 1983; WATT e cols., 1983; 1985). Em geral, os genótipos heterozigotos para estes locos são mais cineticamente eficientes em uma ampla gama de temperaturas do que os homozigotos, apresentando também uma grande viabilidade. Além disso, estimativas diretas do sucesso reprodutivo têm apoiado a vantagem do genótipo heterozigoto. Naquelas espécies, a proporção de machos heterozigotos voando na natureza varia entre 40% e 56%, porém 67% a 85% das fêmeas copulam com machos heterozigotos (CARTER & WATT, 1988; MITTON, 1993).

PG1
G6PD

→ VER Talvez isto esteja ocorrendo também com *D. iulia*, pois o vôo é um componente crítico do valor adaptativo, uma vez que é importante na procura de recursos tróficos para

o adulto, procura de parceiro para cópula, escape à predação e procura de local para ovoposição.

Os valores de F_{ST} , encontrados por HAAG e cols., (1993), sugerem uma ausência de subdivisão, quando amostras espacialmente separadas foram comparadas. No caso presente, o equivalente da separação espacial é a separação no tempo; de modo análogo, os valores de F_{ST} não foram significativos (Tabela 3.18), mostrando que as quatro amostras apresentam uma continuidade. Quanto ao componente F_{IS} aqueles autores encontraram para o total das amostras, um valor numérico igual a 0,1322; no presente caso o valor numérico avaliado com base em seis locos (três vezes maior do que o número de locos usado por aqueles autores) equivaleu a 0,1192. Como se pode perceber os valores são muito próximos, ambos não significativos.

HAAG (1992), encontrou uma tendência de aumento do comprimento das asas, em relação ao aumento do coeficiente de endocruzamento, para progênies cujo f era diferente de zero ($f \neq 0$), o que sugere um paradoxal efeito benéfico do endocruzamento, que seria o de expor alelos detrimenais ou deletérios (recessivos letais), aumentando assim o poder da seleção natural para removê-los.

Entretanto, é sabido desde muito tempo, que a redução na heterozigosidade produzida pelo inbreeding em plantas e animais domesticados, é acompanhada por um aumento na variabilidade morfológica (MITTON, 1978; EANES, 1978), indicando que uma alta heterozigosidade individual aumenta a homeostase no desenvolvimento, resultando em uma aumentada canalização. Desta forma, indivíduos homozigotos são menos variáveis morfológicamente do que heterozigotos. Aparentemente, a seleção

natural, pela remoção de indivíduos morfologicamente extremos, favorece a heterozigosidade em muitos locos enzimáticos, não necessitando que alelos letais estejam ligados ao caráter “comprimento de asa”.

Alelos raros foram detectados nas quatro amostras, em quase todos os sistemas enzimáticos estudados em *D. iulia*, todavia, estes pouco contribuíram para os valores de heterozigosidade encontrados. Na realidade flutuações climáticas temporais podem efetivamente erodir a variação, porém, esta é contrabalançada, na natureza, pela mutação.

Quando analisamos os dados do teste Λ (lambda), onde são comparadas as frequências genóticas das quatro amostras, nota-se que no caso de *Mdh1*, o valor da diferença obtido é igual a 43,77 ($p < 0,001$), o que indica uma heterogeneidade quando são agrupadas as quatro amostras (Tabela 3.14). A diferença persiste quando agrupamos as duas amostras de 1992 ($\Lambda = 4,36$ $p < 0,05$), e as duas amostras de 1993 ($\Lambda = 9,18$ $p < 0,01$). Entretanto para *Pgm2*, o valor do teste foi igual a 24,45 ($p < 0,01$), porém não ocorreram diferenças nas amostras antes do inverno quando contrastadas com as amostras posteriores ao inverno. Em *Aat1* ocorreu o mesmo que para *Pgm2* ($\Lambda = 8,268$, $p < 0,05$), enquanto que em *Aat1* e *Est1* não houveram diferenças; já em *Est2* o valor do teste foi igual a 19,73, $p < 0,001$, entretanto, não foi verificada qualquer diferença nas amostras de 1992, esta somente ocorreu entre as amostras de 1993 cujo valor de $\Lambda = 12,87$ foi estatisticamente significativo ($p < 0,01$). Estes valores podem estar indicando uma perda casual de genótipos portadores de alelos raros, uma vez que estes encontram-se em baixa frequência, outra possibilidade seria a migração (entrada e saída) de indivíduos entre

populações vizinhas, o que confirma a idéia de que a dispersão é uma estratégia importante na história de vida de *D. iulia*.

Pode-se sintetizar os resultados da presente Dissertação afirmando que a população de ABE revelou uma forte possibilidade de seleção sexual intersexo com as fêmeas escolhendo machos cujo tamanho e área de asa está próximo a um valor ótimo.

Quando a comparação foi feita com os dados de HAAG & ARAÚJO (1994), para a mesma época do ano (maio) não houve diferenças. Por outro lado, os resultados quanto à morfologia analisados temporalmente, mostraram-se heterogêneos e neste particular assemelham-se aos achados para alguns sistemas enzimáticos como por exemplo *Pgm2* e *Est2*. Entretanto é difícil a análise conjunta destes dois tipos de informações na ausência de outros dados sobre variáveis ecológicas e genéticas. Como mostrou LEWONTIN (1984) a comparação estrita entre variáveis quantitativas (morfológicas) e variáveis qualitativas (frequências gênicas e genotípicas) não é recomendada, pois possuem pressuposições diferentes. Empiricamente, de um certo modo, isto foi mostrado por TURNER e cols., (1979).

5. BIBLIOGRAFIA

ARAÚJO, A.M. & VALENTE, V.L.S. (1981). Observações sobre alguns lepidópteros e drosophilídeos do Parque do Turvo, RS. **Ciência e Cultura**, **33** (11): 1485-1490.

/ ATCHLEY, W.R. (1970). A comparative study of the cause and significance of morphological variation in adults and pupae of culicoides: a factor analysis and multiple regression study. **Evolution**, **25**: 563-83.

BAILEY, N. **Statistical methods in biology**. 2ª ed. London, The English Universities Press, 1974.

/ BALDWIN, T.F. & BRYANT, E.H. (1981). Effect of size upon mating performance within geographic strains of the housefly, *Musca domestica* L. **Evolution**, **35** (6): 1134-41.

/ BARBAUALT, R. (1988). Body size, ecological constraints, and the evolution of the life-history strategies. Em: M.K.Hecht; B. Wallace & G.T. Prance (eds). **Evolutionary Biology**, **22**: 261-86.

BARRAI, I. (1971). Subdivision and embreeding. **The American Journal of Human Genetics**, **23** (1): 95-6.

BARTON, N.H. (1983). Multilocus clines. **Evolution**, **37** (3): 454-71.

BARTON, N.H. & TURELLI, M. (1989). Evolutionary quantitative genetics: how little do we know? **Annual Review of Genetics**, **23**: 337-70.

BEGON, M. & MORTINER, M. (1983). **Population Ecology. A unified study of Animals and Plants**. pp. 200. Blackwell Scientific Publications.

BEGON, M.J.; HARPER, L. & THOUSEND, C.R. (1987). **Ecology: individuals, populations, and communities**. Sinauer, Sunderland, Massachussets.

BENSON, W.W.; BROWN Jr, K.S.. & GILBERT, L.E. (1976). Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. **Evolution**, **29**: 659-80.

BIEZANKO, D. & LINK, D. (1972). Nomes populares dos lepidópteros do Rio Grande do Sul- nomes científicos atualizados. **Boletim Técnico D.F. nº 4**. Centro de Ciências Rurais. Santa Maria, UFSM.

BLACKBURN, T.M.; BROWN, V.K.; DOUBIE, B.M.; GREENWOOD, J.D.; LAWTON, J.H. & STORK, N.E. (1993). The relationship between abundance and body size in natural assemblages. **Journal of Animal Ecology**, **62**: 519-28.

BOGGS, C. (1981). Nutritional and life-history determinants of resource allocation in holometabolous insects. **The American Naturalist**, **117** (5): 629-709.

BOGGS, C. & GILBERT, L.E. (1979). Male contribution to egg production in butterflies: evidence for transfer of nutrients at mating. **Science**, **206**: 83-4.

BONNELL, M. & SELANDER, R.K. (1974). Elephant seals: genetic variation and near extinction. **Science**, **184**: 908-09.

BRANDÃO, J.S. (1991). **Mitologia Grega**. Vol. 1. 7ª edição. Vozes. 404 p.

BROWN Jr, K.S. (1981). The biology of *Heliconius* and related genera. **Annual Review of Entomology**, **26**: 427-56.

BROWN Jr, K.S. (1976). Geographical patterns of evolution in neotropical forest lepidoptera (Nymphalidae: Ithomiinae and Nymphalinae-Heliconiini). Em: H. Descimon (ed.) **Publication du Laboratoire de Zoologie de L'Ecole Normale Supérieure**, n. 9. **Biogeographie et Evolution en Amerique Tropicale**. 118-60.

X BROWN, J.H. & MAURER, B.A. (1986). Body size, ecological dominance and Cope's rule. **Nature**, **324**: 248-250.

BRUSSARD, P.F. & VAWTER, A.T. (1975). Population structure, gene flow and natural selection in population of *Euphydryas phaeton*. **Heredity**, **34** (3): 407-15.

/ BRYANT, E.H. & TURNER, C.R. (1978). Comparative morphometric adaptation of the housefly and the face fly in the United States. **Evolution**, **32** (4): 759-70.

/ BRYANT, E.H. (1976). Morphometric adaptation of the housefly, *Musca domestica* L., in the United States. **Evolution**, **31**: 580-96.

BRYANT, E.H. (1983). A comparison of electrophoretic and morphometric variability in the face fly, *Musca autumnalis*. **Evolution**, **38** (2): 455-58.

BURNS, J.M. & JOHNSON, F.M. (1971). Esterase polymorphism in the butterfly *Hemiargus isola*. Stability in a variable environment. **Proceedings of National Academy of Science USA**, **68**: 34-7.

CAIN, A.J. & CURREY, J.D. (1963). Area effects in *Cepaea*. **Philosophical Transactions of Royal Society of London B**, **246**: 1-81.

CHAI, P. (1988). Wing coloration of free-flying Neotropical butterflies as a signal learned by a specialized avian predator. **Biotropica**, **20** (1): 20-30.

CARTER & WATT W. B. (1988).

- CHAI, P. (1990). Relationships between visual characteristics of rainforest butterflies and responses specialized insectivorous bird. Em: WICKESTEN, M. (ed.). **Adaptive coloration in invertebrates: proceedings of symposium presented by American Society of Zoologists**, pp. 131-60. Graduate School of Arts and Sciences, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland.
- CHAKRABORTY, R. (1990). Quantitative traits in relation to population structure: why and how are they used and what do they imply? **Human Biology**, **62** (1): 147-62.
- CLARKE, B.C.; SHELTON, P.R. & MANI, G.S. (1988). Frequency-dependent selection, metrical characters and molecular evolution. **Philosophical Transactions of Royal Society of London B**, **319**: 631-640. ←
- CLARKE, B. (1975). Frequency-dependent and density-dependent natural selection. Em: SALZANO, F.M. (ed.) **The Role of Natural Selection in Human Evolution**. p. 187-200. North-Holland Publishing Company.
- CLARKE, B.C. (1979). The evolution of genetic diversity. **Proceedings of Royal Society of London B**, **205**: 453-74.
- COOK, L.M. (1991). **Genetic and ecological diversity. The sport of nature**. Chapman & Hall, London. pp. 192.
- DALY, H. V. (1985). Insect morphometrics. **Annual Review of Entomology** **30**: 415-38.
- DANFORTH, B.N. (1989). The evolution of hymenopteran wing: the importance of size. **The Journal of Zoology**, **218**: 247-76.
- DARWIN, C.R. (1871). **The descent of man and selection in relation to sex**. London, John Murray.
- DE VRIES, P.J. (1987). **The butterflies of Costa Rica and their natural history**. Princeton, Princeton Univ. Press.
- DEINERT, E.I.; LONGINO, J.T.; GILBERT, L.E. (1994). Mate competition in butterflies. **Nature**, **370**: 23-4.
- DESCIMON, H. & NAPOLITANO, M. (1993). Enzyme polymorphism, wing pattern variability, and geographical isolation in a endangered butterfly species. **Biological Conservation**, **66**: 117-23.
- DI MARE, R.A. & ARAÚJO, A.M. (1986). A first survey of inbreeding effect in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). **Revista Brasileira de Genética**, **9**: 11-20.
- DOBZHANSKY, T. (1948). Genetics of natural population. XVIII. Experiments on chromosomes of *D. pseudoobscura* from different geographical regions. **Genetics**, **33**: 588-602.

- DOBZHANSKY, T. (1970). **Genetic of Evolutionary Process**. New York, Columbia Univ. Press.
- DUNLAP, PIANKA, H.; BOGGS, C. & GILBERT, L.E. (1977). Ovarian dynamics in Heliconiine Butterflies: Programed senescence versus eternal youth. **Science**, **197**: 487-90.
- EANES, W.F. (1978). Morphological variance and enzyme heterozigosity in the monarch butterfly. **Nature**, **276**: 263-64.
- EHRlich, P. (1983). Genetics and extinction of butterflies population. Em: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; McBRYDE, B. & THOMAS, W.L. (eds.). **Genetics and Conservation**. 639p. *MacBryde*
- ELDREDGE, N. (1993). History, function, and evolutionary biology. Em: MAX HECHT, M.; MACINTYRE, R.; CLEGG, M. (ed.). **Evolutionary Biology**. Plenum Press, New York. p.33-50
- ENDLER, J.A. & McLELLAN, T. (1988). The process of evolution: Toward a new synthesis. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **19**: 395-421.
- ENDLER, J.A. (1986). **Natural selection in the wild**. New Jersey, Princeton Univ. Press, Princeton. p.336.
- FALCONER, D.S. (1989). **Introduction to quantitative genetics**. 3^a ed. John Wiley & Sons. New York. 438p.
- FISHER, R.A. (1958). **The genetic theory of natural selection**. 2^a ed. Dover Publ. Inc.
- FORD, E.B. (1940b). Polymorphism and taxonomy. Em: J. S. HUXLEY (ed.). **The New Systematics**. Oxford, Claredon Press.
- FORD, E.B. (1975). **Ecological genetics**. 2^a ed. London, Chapman and Hall. 442p.
- FUTUYMA, D.J. (1992). **Biologia Evolutiva**. 2^a ed. Tradução Dr. Mário De Vivo. USP.631p.
- GARCIAS, G. de L. (1983). **Aspectos da biologia populacional de cinco espécies de heliconiíneos do anel mimético "laranja" (Lepidoptera: Nymphalidae)**. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Genética, UFRGS. Porto Alegre.
- GILBERT, L.E. (1991). Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: Pattern, process, and problems. Em: **Plant animal interaction: Evolutionary ecology in tropical and temperate regions**. PRICE, P; LEWINSOHN, T.; FERNANDES G.W; & BENSON, W.W. (eds.). John Wiley & Sons, Inc.

GILBERT, L.E & SINGER, M.C. (1975). BUTTERFLY ECOLOGY. ANNUAL REVIEW OF ECOLOGY AND SYSTEMATIC, 6:365-97127

GILBERT, N. (1984a). Control fecundity in *Pieris rapae*. I. The problem. **Journal of Animal Ecology**, **53**: 581-88.

GILESPIE, J.H. & KOJIMA, K. (1968). The degree of polymorphism in enzymes involved in energy production compared to that in non-specific in two *Drosophila ananasse* population. **Proceedings of National Academy of Science USA**, **61**: 582-85.

+ GOULD, S.J. (1966). Allometry and size in ontogeny and phylogeny. **Biological Review**, **41**: 587-640.

- GOULD, S.J. (1988). Trends as changes in variance: a new slant on progress and directionality in evolution. **Journal of Paleontology**, **62** (3): 319-29.

GOULSON, D. (1993). Allozyme variation in the butterfly, *Maniola jurtina* (Lepidoptera: Satyrinae) (L): evidence for selection. **Heredity**, **71**: 386-93.

GRANT, P.R. & PRICE, T.D. (1981). Population variation in continuously varying traits as ecological genetic problem. **The American Zoologist**, **21**: 795-811.

GRANT, P.R. (1991). Natural selection and Darwin's Finches. **Scientific American**, **265** (4): 82-7.

GRANT, P.R. (1986). **Ecology and evolution of Darwin's Finches**. Princeton, Princeton Univ. Press. 459 p.

T

GRANT, R.B. & GRANT, P.R. (1993). Evolution of Darwin's Finches caused by a rare climatic event. **Proceedings of Royal Society of London B**, **251**: 111-17.

GRANT, V. (1985). **The evolutionary process. A critical review of evolutionary theory**. New York, Columbia Univ. Press. 499 p.

GREENWOOD, S.R. (1988). Habitat stability and wing length in two species of arboreal psocoptera. **Oikos**, **52**: 235-38.

HAAG, K.L. & ARAÚJO, A.M. (1994). Inbreeding, genetic load and morphometric variation in natural populations of *Dryas iulia* (Lepidoptera, Nymphalidae). **Revista Brasileira de Genética**, **17** (1): 35-9.

HAAG, K.L.; ARAÚJO, A.M. & ZAHA, A. (1993). Genetic structure of natural populations of *Dryas iulia* (Lepidoptera: Nymphalidae). Revealed by enzyme polymorphism and mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP). **Biochemical Genetics**, **31** (9/10): 449-60.

HAMILTON, T.H. (1961). The adaptive significances of intraspecific trends of variation in wing length and body size among bird species. **Evolution**, **15**: 180-95.

HAAG, K.L. (1992). MASTER THESIS. 128 Estrutura Genética de Populações Naturais de *Dryas iulia* (Lepid. Nymph.) no Rio Grande do Sul. UFRGS.

- HANSON, A.D. & HITZ, W.D. (1982). Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. **Annual Review of Plant Physiology**, **33**: 163-203.
- HARDER, L.D. (1985). Morphology as a predictor of flower choice by bumble bees. **Ecology**, **66** (1): 198-210.
- HARTL, D.L. & CLARK, A.G. (1989). **Principles of population genetics**. Sinauer Associates, INC. Publishers Sunderland Massachusetts. 682 p.
- HARTL, D.L. (1991). New perspectives on the molecular evolution of genes and genomes. Em: WARREN, L. & KOPROWSKY, H. (eds.). **New Perspectives on Evolution**. John Wiley & Sons, Inc. 258p.
- HARVEY, P.H. & LAWTON, J.H. (1986). Patterns in three dimensions. **Nature**, **324**: 212.
- HEDRICK, P.; JAIN, S. & HOLDEN, L. (1978). Multilocus systems in evolution. MAX HECHT, W.C. STEERE & WALLACE (eds.). **Evolutionary Biology**, **V. 11**: 101-84.
- HEDRICK, P.H. (1986). Genetic polymorphism in heterogeneous environments: A decade later. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **17**: 535-66.
- HEDRICK, P.H.; GINEVAN, M.E. & EWING, E. (1976). Genetic polymorphism in heterogeneous environments. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **7**: 1-32.
- × HESPENHEIDE, H.A. (1973). Ecological inferences from morphological data. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **4**: 213-29.
- HOVANITZ, W. (1978/79). Parallel ecogenotypical color variation in butterflies. **Journal of Research on the Lepidoptera**, **17**: 26-55.
- ± HOWE, H.F. & WESTLEY, L.C. (1988). **Ecological relationship of plants and animals**. New York, Oxford Univ. Press.
- JOHNSON, G.B. (1974). Enzyme polymorphism and metabolism. **Science**, **184**: 28-37.
- JOHNSON, G.B. (1976a). Allozyme and area effects in *Cepaea nemoralis* on the western Berkshire Downs. **Heredity**, **36**: 105-21.
- JOHNSON, G.B. (1976c). Polymorphism and predictability at the α -glycerophosphate deshydrogenase locus in *Colias* butterflies: Gradients in allele frequency within single population. **Biochemical Genetics**, **14**: 403-26.
- JOHNSON, G.B. (1977). Genetic polymorphism and enzyme function. Em: AYALA, F.J. (ed.). **Molecular Evolution**. Sunderland, Sinauer Associates, Inc. 272p.

- KIMURA, M. & OHTA, T. (1971). Protein polymorphism as a phase or molecular evolution. *Nature*, **229**: 467-69.
- KIMURA, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, **217**: 624-26.
- KIMURA, M. (1989). The neutral theory of molecular evolution and the world view of the neutralists. *Genome*, **31**: 24-31.
- KIMURA, M. (1991). Some recent data supporting the neutral theory. In: KIMURA, M. & TAKAHATA, N. (ed.). **New aspects of the genetics of molecular evolution**. Tóquio, Japan Sci. Soc. Press. p. 3-14
- KING, J.L. & JUKES, T.H. (1969). Non-Darwinian evolution. *Science*, **164**: 788-98.
- KIRKPATRICK, M. (1982). Quantum evolution and punctuated equilibria in continuous genetic characteres. *The American Naturalist*, **119** (6): 833-48.
- KOEHL, M.A.R. (1989). Discussion: From individuals to populations. Em: ROUGHGARDEN, R.M.; MAY, J.; LEVIN, S.A. (eds.). **Perspectives in Ecological Theory**. Princeton, Princeton Univ. Press.
- KOEHN, R.; ZERA, A.J. & HALL, J.G. (1983). Enzyme polymorphism and natural selection. Em: NEI, M. & KOEHN, R.K. (ed.). **Evolution of Genes and Proteins**. Sunderland, Sinauer Associates Inc. p. 115-36.
- KREBS, C.J. (1985). **Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance**. New York, Harper and Row.
- LAWTON, J.H. (1988). More time means more variation. *Nature*, **334**: 563.
- LEATHER, S. R. (1988). Size, reproductive potential and fecundity in insects: Things aren't as simple as they seem. *Oikos*, **51** (3): 387-89.
- LEBERG, P.L. (1992). Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution*, **46**(2): 477-94.
- LEVINS, R. (1968). **Evolution in changing environments. Some theoretical explorations**. Princeton, Princeton Univ. Press.
- LEWONTIN, R.C. (1973). Population genetics. *Annual Review of Genetics*, **7**: 1-17.
- LEWONTIN, R.C. (1974). **The genetic basis of evolutionary change**. New York, Columbia Univ. Press.
- LEWONTIN, R.C. (1978). Adaptation. *Scientific American*, **239** (3): 156-69.
- LEWONTIN, R.C. (1984). Detecting population differences in quantitative characteres as opposed to gene frequencies. *The American Naturalist*, **123** (1): 115-24.

- LEWONTIN, R.C. (1985). Population genetics. **Annual Review of Genetics**, 19: 81-102.
- LEWONTIN, R.C. (1991). Twenty-five years ago in genetics: Electrophoresis in the development of evolutionary genetics: Milestone or Millstone? **Genetics**, 128: 657-62.
- LI, C.C. & HORVITZ, D.G. (1953). Some methods of estimating the inbreeding coefficient. **The American Journal of Human Genetics**, 5: 107-17.
- LIMA, F.A.M. & ARAÚJO, A.M. (1982). Studies on the genetics and ecology of *Heliconius erato* (Lepidoptera; Nymphalidae). II. Inheritance of esterases and genotype distribution in a natural population. **Revista Brasileira de Genética**, V (4): 679-86.
- LOSOS, J.B. (1990). The evolution of form and function: morphology and locomotor performance in West Indian *Anolis* lizards. **Evolution**, 44: 1189-1203.
- MABILDE, ADOLFO P. (1896). **Guia prática para os principiantes colleccionadores de insectos contendo a descrição fiel de perto de 1000 borboletas**. Typographia de Gundlach & Schuldt, Porto Alegre.
- MARKOW, T.A. & RICKER, J.P. (1992). Male size, developmental stability, and mating success in natural population of three *Drosophila* species. **Heredity**, 69: 122-27.
- MARSHALL, L.D. (1982). Male nutrient investment in the lepidoptera: What nutrients should males invest? **The American Naturalist**, 120: 273-79.
- MAYR, E. (1977). **Populações, espécies e evolução**. São Paulo, Ed. Nacional, USP.
- McCAULEY, D.E. (1989). Extinction, colonization, and population structure: a study of a milkweed beetle. **The American Naturalist**, 134 (3): 365-76.
- MENOTTI-RAYMOND, M. & O'BRIEN, S. (1993). Dating the genetic bottleneck of the African Cheetah. **Proceedings of National Academy of Science USA**, 90: 3172-176.
- MERREL, D.J. (1981). **Ecological genetics**. Mineapolis, University of Minnesota Press. New York.
- METTLER, L.E.; GREG, T.G. & SHAFFER, H.E. (1988). **Population genetics and evolution**. New Jersey.
- MITTON, J. (1993). Theory and data pertinent to the relationship between heterozygosity and fitness. Em: THORNHILL, N.W. (ed.). **The Natural History of Inbreeding and Outbreeding. Theoretical and Empirical Perspectives**. The University of Chicago Press. 575p.
- MITTON, J.B. (1978). Relationship between heterozigosity for enzyme loci and variation of morphological characters in natural populations. **Nature**, 273: 661-62.

- MONTE, O. (1934). **Borboletas que vivem em plantas cultivadas**. Secretaria da Agricultura do Estado de Minas Gerais. Oficinas Gráficas da Estatística, Belo Horizonte, 219p.
- MORTON, N.E. (1967). Genetic studies of Northeastern Brazil - summary and conclusions. **Ciência e Cultura**, **19** (1): 14-30.
- MOSS, R.; WATSON, A. & OLLASON, J. (1982). **Animal population dynamics**. Chapman and Hall. New York. 80p.
- NEI, M. (1988). Relative role of mutation and selection in maintenance of genetic variability. **Philosophical Transactions of Royal Society of London B**, **319**: 615-29.
- NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, **29**: 1-10.
- NEVO, E.; BEILES, A.; KRUGMAN, T. (1988). Natural selection of allozyme polymorphisms: a microgeographical differentiation by edaphic, topographical, and temporal factors in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*). **Theoretical Applied Genetics**, **76**: 737-52.
- NEVO, E. (1988). Genetic diversity in nature. Patterns and theory. **Evolutionary Biology**, **23**: 217-46.
- NEVO, E.; BAR-EL, C.; BEILES, A.; YOM-TOV, Y. (1982). Adaptive microgeographic differentiation of allozyme polymorphism in landsnails. **Genetica**, **59**: 61-7.
- NEVO, E.; BEILES, A.; BEN-SHLOMO, R. (1984). The evolutionary significance of genetic diversity: Ecological, demographic and life history correlates. Em: MANI, G.S. **Lecture Notes in Biomathematics**, Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity.
- NEVO, E. (1983). **Protein polymorphism: Adaptative and taxonomic significance**. Academic Press. p. 239-82.
- O'BRIEN, S.J.; ROELIK, M.E.; MARKER, L.; NEWMAN, A.; WINKIER, C.A.; MELTZER, D.; COLLY, L.; EVERMANN, J.F.; BUSH, M. & WILDT, D.E. (1985). Genetic basis of for species vulnerability in the cheetah. **Science**, **227**:1428-34.
- O'BRIEN, S.J.; WILDT, D.E.; GOLDMAN, D.; MERRIL, C.R. & BUSH, M. (1983). The cheetah is depauperate in genetic variation. **Science**, **221**: 459-62.
- OLIVEIRA, D.L. & ARAÚJO, A.M. (1992). Studies on the genetics and ecology of *Heliconius erato* (Lepidoptera; Nymphalidae). IV. Effective size and variability of the red raylets in natural populations. **Revista Brasileira de Genética**, **15** (4): 789-99.

- PANSERA, M.C. & ARAÚJO, A.M. (1983). Distribution and heritability of the red raylets in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). **Heredity**, **51** (3): 643-52.
- PAPAGEORGIS, C. (1975). Mimicry in Neotropical butterflies. **American Scientist**, **63** (5): 522-32.
- ✓ PARKER, G.A. (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. **Biological Review**, **45**: 525-67.
- PARTRIDGE, L.; HOFFMANN, A. & JOHNES, S. (1987b). Male size and mating success in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila pseudoobscura* under field conditions. **Animal Behavior**, **35**: 468-76.
- PÉRICO, E. & ARAÚJO, A.M. (1991). Suitability of host plants (Passifloraceae) and their acceptableness by *Heliconius erato* and *Dryas iulia* (Lepidoptera; Nymphalidae). **Evolución Biológica**, **5**: 59-74.
- PYLE, R.; BENTZEN, M. & OPLER, P. (1981). Insect conservation. **Annual Review of Entomology**, **26**: 233-57.
- REES, H.H. (1977) **Insect biochemistry**. Chapman and Hall London.
- × REISS, M.J. (1989). **The allometry of growth and reproduction**. Cambridge University Press. Cambridge.
- ✓ ROFF, D.A. & FAIRBAIRN, D.J. (1993). The evolution of alternate morphologies: Fitness and wing morphology in male sand crickets. **Evolution**, **47** (5): 1572-584.
- ✓ ROFF, D.A. (1986). The evolution of wing dimorphism in insects. **Evolution**, **40** (5): 1009-20.
- ✓ ROHLF, F.J. (1990). Morphometrics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **21**: 299-316.
- ✓ ROSENBER, R.H. & ENQUIST, M. (1991). Contest behavior in Weidmeier's admiral butterfly *Limenitis weidmeyerii* (Nymphalidae): The effect of size and residency. **Animal Behavior**, **42**: 805-11.
- ROSENQUIST, G. & BERGLUND, A. (1992). Is female sexual behavior a neglected topic? **Trends in Ecology and Evolution**, **7** (6): 174-76.
- ROUGHGARDEN, J. (1979). **Theory of population genetics and evolutionary ecology: An introduction**. Macmillan Publ. Co. New York. 634p.

- SELANDER, R.K. & WHITTAM, T.S. (1983). Protein polymorphism and the genetic structure of populations. Em: NEI, M. & KOEHN, R.K. (eds.). **Evolution of Genes and Proteins**. Sunderland, Sinauer Associates Inc.
- SCHAAP, T. (1980). The applicability of the Hardy-Weinberg principle in the study of populations. **Annals of Human Genetics**, **44**: 211-15.
- SCRIBER, J.M. & FEENY, P. (1979). Growth of herbivorous caterpillars in relation to feeding specialization and to growth form of their food plants. **Ecology**, **60**: 829-50.
- SCRIBER, J.M. & SLANSKY, F.Jr. (1981). The nutritional ecology of immature insects. **Annual Review of Entomology**, **26**: 183-211.
- SEARCY, W.A. & YASUKAWA, K. (1983). Sexual selection and red-winged blackbirds. **American Scientist**, **71**: 166-74.
- SHIELDS, W.S. & HEELER, R.M. (1979). Analysis of contingency tables with sparse values. **Journal of Marketing Research**, **XVI**: 382-86.
- SHINE, R. (1990). Proximate determinants of sexual differences in adult body size. **American Naturalist**, **135** (2): 278-83.
- SILVA, L.M. & ARAÚJO, A.M. (1994). The genetic structure of *Heliconius erato* populations (Lepidoptera; Nymphalidae). **Revista Brasileira de Genética**, **17** (1): 19-24.
- SING, R.S.; LEWONTIN, R.C.; & FELTON, A.A. (1976). Genetic heterogeneity within electrophoretic alleles of xantine dehydrogenase in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, **84**: 609-29.
- SINGH, R.S. & LONG, A.D. (1992). Geographic variation in *Drosophila*: From molecules to morphology and back. **Trends in Ecology and Evolution**, **7** (10): 340-45.
- SLATKIN, M. (1985). Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **16**: 393-430.
- SMITH, H. (1982). Light quality, photoperception and plant strategy. **Annual Review of Plant Physiology**, **33**: 481- 518.
- SOLOMON, M.E. (1980). **Dinâmica de populações**. Ed. Pedagógica Universitária. 78p.
- SOULÉ, M. (1982). Allomeric variation. 1. The theory and some consequences. **The American Naturalist**, **120** (6): 751-64.
- SPENCER, K.C. (1988). **Chemical mediation of coevolution**. California Academic Press. Inc. 609p.

- STANLEY, S.M. (1973). An explanation for Cope's rule. **Evolution**, **27** (1): 1-26.
- STEBBINS, G. & HARTL, D.L. (1988). Comparative evolution: Latent potentials for anagenetic advance. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, **85**: 5141-145.
- STRANGWAY-DIXON, J. (1959). Hormonal control of selective feeding in female *Calliphora erythrocephala* Meig. **Nature**, **184**: 2040-41.
- STRAUSS, R.S. (1990). Pattern of quantitative variation in lepidopteran wing morphology: the convergent groups Heliconiinae and Ithomiinae (Papilionoidea: Nymphalidae). **Evolution**, **44** (1): 86-103.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. (1991). **Plant Physiology**. California, The Benjamin/Cummings Publishing Comp. Inc. 565p.
- TAYLOR, F. (1981). Ecology and evolution of physiological time in insects. **The American Naturalist**, **117**: 1-23.
- TEMPLETON, A.R. (1982). Adaptation and the integration of evolutionary forces. Em: MILKMAN, R. (ed.). **Perspectives on evolution**. Sunderland, Sinauer Associates, Inc. Publishers. 231p.
- THOMPSON, J.N. & PELLMYR, O. (1991). Evolution of host preference in lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, **36**: 65-89.
- THÖNI, H. (1967). **Transformation of variables used in the analysis of experimental and observational data**. A review. Technical Report Number 7. Statistical Laboratory, Iowa State University.
- THORNHILL, R. & GWYNNE, D. (1986). The evolution of sexual differences in insects. **American Scientist**, **74**: 382-89.
- TURNER, J.R.G. (1988). The evolution of mimicry: A solution to the problem of punctuated equilibrium. **The American Naturalist**, **131**: 42-66.
- TURNER, J.R.G.; JOHNSON, M.S. & EANES, W.F. (1979). Contrasted modes of evolution in the same genome: Allozymes and adaptive chance in *Heliconius*. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, **76** (4): 1924-28.
- VÄISÄNEN, R.; HELIÖVAARA, K & SOMERNA, P. (1991). Morphological variation of *Parnassius mnemosyne* (Linnaeus) in easter Fenoscandia (Lepidoptera; Papilionidae). **Entomologica Scandinavica**, **22** (3): 353-63.

- VALENTE, V.L.S. & ARAÚJO, A.M. (1985). Observations of the chromosomal polymorphism of natural population of *Drosophila willistoni* and its association with the choice of feeding and breeding sites. **Revista Brasileira de Genética**, VIII (2): 271-84.
- VALENTE, V.L.S. & ARAÚJO, A.M. (1986). Chromosomal polymorphism, climatic factors and variation in population size of *Drosophila willistoni* in southern Brazil. **Heredity**, 57: 149-59.
- VALENZUELA, C.Y. (1985). Algebraic and epistemological restriction in studies on Hardy-Weinberg equilibrium. **The American Naturalist**, 125: 744-46.
- VALENZUELA, C.Y. (1993). Epistemic restriction in population Biology. **Evolucion Biológica**, 7: 81-103.
- VIA, S. (1990). Ecological genetics and host adaptation in herbivorous insects: the experimental study of evolution in natural and agricultural systems. **Annual Review of Entomology**, 35: 421-46.
- WATT, W.B. (1977). Adaptation at specific loci. I. Natural selection on phosphoglucose isomerase of *colias* butterflies: Biochemical and population aspects. **Genetics**, 87: 195-208.
- WATT, W.B. (1983). Adaptation at specific loci. II. Demographic and biochemical elements in the maintenance of the *Colias* PGI polymorphism. **Genetics**, 103: 691-724.
- WATT, W.B.; CARTER, P.A. & BLOWER, S.M. (1985). Adaptation at specific loci. IV. Differential mating success among glycolytic allozyme genotypes of *Colias* butterflies. **Genetics**, 109: 157-75.
- WATT, W.B.; CASSIN, R.C. & SWAN, M.S. (1983). Adaptation at specific loci. III. Field behavior and survivorship differences among *Colias* PGI genotypes are predictable from in vitro biochemistry. **Genetics**, 103: 725-39.
- WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. (1984). Estimating F statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, 38 (6): 1358-70.
- WEST, D. A. (1994). Unimodal batesian polymorphism in the neotropical swallowtail butterfly *Eurytides lysithous* (Hbr). **Biological Journal of Linnean Society**, 52: 197-224.
- WICKMAN, P. O. & KARLSSON, B. (1989). Abdomen size, body size and the reproductive effort of insects. **Oikos**, 56 (2): 209-14.
- WIENS, J.A. (1976). Population responses to patchy environments. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 7: 81-120.

- WOLDA, H. (1988). Insect seasonality: why? **Annual Review of Ecology and Systematics**, **19**: 1-18.
- WORKMAN, P.L. & NISWANDER, J.D. (1970). Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. **The American Journal of Human Genetics**, **22**: 24-29.
- WRIGHT, S. (1943). Isolation by distance. **Genetics**, **28**: 114-38.
- WRIGHT, S. (1982). The shifting balance theory and macroevolution. **Annual Review of Genetics**, **16**: 1-19.
- YABLOKOV, A.V. (1986). **Phenetics: Evolution, population, trait**. Columbia Univ. Press. New York, 171p.
- YOUNG, ALLEN, M. (1972). Mimetic associations in population of tropical butterflies. II. Mimetic interactions of *Battus polydamas* and *Battus bellus*. **Biotropica**, **4** (1): 17-27.
- ZERA, A.J.; INNES, D.J. & SAKS, M. (1983). Genetic and environmental determinants of wing polymorphism in the waterstrider *Limnoporus canaliculatus*. **Evolution**, **37** (3): 513-22.