



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Felipe Bastos Rocha

PIGMENTAÇÃO EM *DROSOPHILA MEDIOPUNCTATA*: PLASTICIDADE
FENOTÍPICA E HERDABILIDADE.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
FELIPE BASTOS ROCHA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular na área de
Genética Animal e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko

Campinas
2007

UNIDADE BE
 Nº CHAMADA: T/UNICAMP
R582p
 V. _____ Ed. _____
 TOMBO 72537
 PROC 16-145-06
 C ☐ ☒ ☐
 PREÇO 11,00
 DATA 10-5/07
 BIB-ID 411483

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

R582p

Rocha, Felipe Bastos

Pigmentação em *Drosophila mediopunctata*: plasticidade fenotípica e herdabilidade / Felipe Bastos Rocha. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Louis Bernard Klaczko.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fenótipo. 2. Adaptação (Biologia). 3. Norma de reação. 4. Inversão cromossômica. 5. Polimerfismo cromossômico. I. Klaczko, Louis Bernard. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Pigmentation in *Drosophila mediopunctata*: phenotypic plasticity and heritability.

Palavras-chave em inglês: Phenotype; Adaptation (Biology); Reaction norm; Chromosome inversions; Chromosome polymorphism.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Louis Bernard Klaczko, Vera Nisaka Solferini, Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky.

Data da defesa: 13/02/2007.

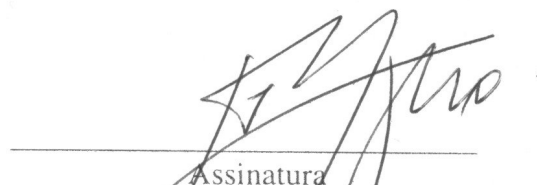
Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

CRÔMOSSOMOS - POLIMORFISMO

Campinas, 13 de fevereiro de 2007.

Banca Examinadora

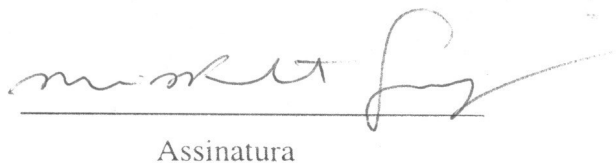
Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko (Orientador)
(Titular)


Assinatura

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini
(Titular)


Assinatura

Profa. Dra. Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky
(Titular)


Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin
(Suplente)

Assinatura

Profa. Dra. Maura Helena Manfrin
(Suplente)

Assinatura

Aos meus pais, Helenice e Rocha.

Agradecimentos.

A meus pais, por terem me ensinado a olhar além e trabalhar, sempre. Pelo apoio constante, de todas as formas. Pela confiança, em todos os momentos, pela firmeza precisa e ternura constante, que só pais têm.

Aos amigos de laboratório, Horácio, Marcos, Mituse, Cacá, Roberto, Luciane, Luciana, Hermes, Laura e Gália, pela companhia, cafés, papos na cozinha e ajuda sempre que me perdia.

À Luciane, por ter me explicado tantas vezes como lidar com essas mosquinhas, com toda a paciência do mundo.

Ao Horácio, pela amizade e ótima companhia, resmungona e bem-humorada ao mesmo tempo.

Aos técnicos do laboratório, Seu Laércio, Wilma e Claudete, por terem tornado possível este trabalho.

A Marcão, Mitsue e Hermes, pelas ajudas nas coletas, e ótimas companhias.

À Salete, pelo sempre ótimo café, prontidão e paciência para aturar as encomendas de última hora e muitas conversas na cozinha.

Ao Hermes, pela preciosa ajuda com a operação do gradiente térmico e realização do experimento de norma de reação.

À Taimê, por ter nos abrigado tantas vezes, pelo carinho e cuidado.

A Flávia e Andrés, pelo abrigo e amizade valiosíssimos.

Ao Prof. Louis Bernard Klaczko, grande mestre e amigo, pela paciência e sabedoria. Por ter proporcionado, com toda sua tranquilidade, a formação intelectual, profissional e científica que busquei em Campinas.

À Maína, cuja presença constante e doce permeia tudo, inclusive este trabalho, e por ter tido sempre paciência, calma e firmeza quando precisou, me trazendo até aqui. Por tudo.

A Fapesp, ao CNPq, ao FAEP-Unicamp pelo apoio financeiro que permitiram a realização desta tese.

Resumo.

Drosophila mediopunctata é uma espécie pertencente ao grupo *tripunctata*, que tem como traço marcante um padrão de pigmentação abdominal, sob a forma de três pintas na região mediana dos últimos tergitos. Nesta espécie, este padrão é variável, havendo indivíduos com quatro fenótipos, que vão de zero a três pintas. Já se observou que esta variação tem determinação genética, com marcada influência do cromossomo II, e alta plasticidade fenotípica em resposta à temperatura de desenvolvimento. Neste trabalho, buscou-se caracterizar parte destas duas fontes de variação.

Por um lado, foram estudadas as normas de reação da pigmentação a um gradiente térmico, investigando-se classes fenotípicas contrastantes. Devido ao desenho experimental, que buscou separar os efeitos desta variável de um possível papel das inversões do cromossomo II, foi possível evidenciar um forte efeito das classes fenotípicas utilizadas sobre a resposta das estirpes ao gradiente térmico, independente do cariótipo. Foram descritos, por polinômios, dois tipos de norma de reação relacionados ao fenótipo, ambos com forma de parábola, mas diferindo em relação ao coeficiente de curvatura. O grupo de estirpes de pigmentação clara apresentou uma curva côncava e o grupo escuro uma curva convexa. A norma de reação da taxa de desenvolvimento de ovo a adulto foi caracterizada a partir do mesmo procedimento. Entretanto, apesar dos efeitos significativos do cariótipo e da classe fenotípica, a homogeneidade das normas de reação descritas por regressões lineares não possibilitou uma interpretação clara destes efeitos. A plasticidade do caráter também foi investigada quanto ao período de desenvolvimento termo-sensível. Assim, foi possível determinar a porção final da fase de pupa como o período no qual ocorre a influência da temperatura sobre o fenótipo de pintas do adulto.

Por outro lado, em relação à determinação genética do caráter, foram obtidas estimativas de herdabilidade para o número de pintas abdominais, em condições quase naturais. Visando estabelecer um parâmetro de comparação com outros trabalhos, foi estimada a herdabilidade do tamanho do tórax a partir do mesmo material. Os resultados deste experimento, apresentaram grande contraste entre os dois traços: as estimativas foram baixas ou não significativas para o tamanho do tórax e, em geral, altas e significativas para o número de pintas.

Abstract.

Drosophila mediopunctata belongs to the *tripunctata* species group, which has a typical abdomen pigmentation pattern, consisting of three dark spots in the last tergites. In this species, this pattern is variable, with the phenotypes ranging from zero to three spots. It has been noted that this variation has genetical determination, with strong influence from the second chromosome, and high phenotypic plasticity in response to the developmental temperature. In this work, we attempted to describe part of these two variation sources.

On one side, the pigmentation reaction norm to a thermal gradient was studied, by investigating the influence of contrasting phenotypical classes. Given the experimental design, which was planned to separate the effects of this variable from a possible influence of the second chromosome inversions, it was possible to detect a strong effect of the phenotypical classes on the lineages response to the thermal gradient, independent of the karyotype. Two types of reaction norms, related to the phenotype, were detected and described by polynomial adjustment. Both had a parabolic shape, but with different curvature coefficients. The light pigmentation lineage group showed a concave curve, and the dark group had a convex curve. The reaction norm of development rate from egg to adult was described according to the same procedure. However, despite the significant effects of the karyotype and phenotypical classes, the homogeneity of reaction norms, described by linear regression, hindered a clear interpretation of these effects. The character plasticity was also investigated in respect to the developmental thermosensitive period. Thus, it was possible to determine that the period in which the temperature influence on the adult phenotype occurs is the last portion of the pupal phase .

On another side, relative to the character genetic determination, heritability estimates for the number of abdominal spots were obtained, in nearly natural conditions. Aiming to establish a comparison parameter with other studies, the heritability of thorax length was estimated based on the same material. The results of this experiment reveal a great contrast between these trait estimates: for the thorax they were low or non-significant, and, in general, for the abdominal spot number, they were high and significant.

Índice

	Páginas
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
I. Introdução	1
Evolução fenotípica	1
Pigmentação em <i>Drosophila</i>	1
<i>Drosophila mediopunctata</i>	3
Plasticidade fenotípica	6
Taxa de desenvolvimento e plasticidade	8
Determinação genética	9
Tamanho corporal em <i>Drosophila</i>	10
Objetivos	11
II. Material e Métodos	12
II.1. Plasticidade Fenotípica	12
II.1.1. Norma de Reação	12
Estirpes	12
Colocação dos indivíduos no gradiente	13
Gradiente Térmico	14
Obtenção dos dados	14
Análise dos dados	14
II.1.2. Experimento de Transferência de temperaturas	15
Estirpes	15
Tratamento experimental	15
Análise dos dados	16
II.2. Herdabilidade	16
II.2.1. Coletas para estimativas de herdabilidade	16
II.2.2. Estimativas de herdabilidade	17
II.2.2.a. Primeiro conjunto de estimativas	17
Cruzamentos	17
Tratamentos	17
Obtenção dos dados	18
Número de pintas	18

Tamanho do tórax	18
Análise estatística e métodos de estimativa	18
II.2.2.b. Segundo conjunto de estimativas	19
Material	19
Tratamento	19
Análise dos dados e estimativa de herdabilidade	19
III. Resultados	20
III.1. Plasticidade Fenotípica	20
III.1.1. Norma de Reação	20
III.1.1.a. Número de pintas abdominais	20
III.1.1.b. Taxa de desenvolvimento	26
III.1.2. Experimento de Transferência de temperaturas	33
III.2. Herdabilidade	35
III.2.1. Primeiro conjunto de estimativas	35
III.2.1.a. Tamanho do tórax	35
III.2.1.b. Número de pintas	36
III.2.2. Segundo conjunto de estimativas	37
IV. Discussão.	38
IV.1. Plasticidade fenotípica	38
IV.1.1. Experimento de Norma de Reação	38
IV.1.1.a. Número de pintas abdominais	38
Efeito da temperatura	38
Cariótipo e classe fenotípica	39
Forma da norma de reação	39
Genes, fenótipo e plasticidade	40
Plasticidade e variabilidade genética	41
IV.1.2. Tempo e taxa de desenvolvimento	43
IV.1.2. Experimento de Transferência de Temperaturas	44
IV.2. Estimativas de herdabilidade no campo	45
IV.2.1. Tamanho do tórax	45
IV.1.2. Número de pintas	46
Perspectivas	47
V. Bibliografia	50

I. Introdução.

Evolução fenotípica.

A partir da observação dos fenótipos surgem as primeiras perguntas da biologia evolutiva. Da visão de diferentes formas de seres vivos surge o impulso de entender as origens e causas da variação fenotípica. Para estudar tais causas e origens, é necessário, portanto, caracterizar tal variação, dando um primeiro passo na investigação dos seus mecanismos geradores e mantenedores.

A variação fenotípica pode ser analisada em várias escalas, sendo a abordagem inicialmente mais acessível a da escala morfológica (Oxford & Gillespie, 1998; True, 2003). No nível morfológico de variação, os padrões de coloração constituem um conjunto de características dos mais variados entre os animais. Em insetos, há uma grande variedade de padrões de coloração, havendo diferenças entre espécies, dentro de espécies e dentro de populações (Joron, 2002). As funções relacionadas à pigmentação neste grupo também são variadas, sendo alguns exemplos conhecidos o mimetismo, a coloração críptica, o aposematismo, proteção contra raios UV e termorregulação (Joron, 2002; Wittkopp *et al.*, 2003).

Pigmentação em *Drosophila*.

O gênero *Drosophila* contém cerca de 2000 espécies descritas (Powell, 1997), e constitui um grupo de insetos amplamente estudado, que contém alto grau de variação fenotípica, inclusive em relação à pigmentação corporal. A pigmentação em *Drosophila* apresenta variação em relação à parte do corpo pigmentada, à quantidade e aos padrões de pigmentação (Wittkopp *et al.*, 2003). Ela é constituída basicamente por um conjunto de pigmentos claros e escuros, cujas bases moleculares de produção e regulação estão sendo amplamente estudadas (Brisson *et al.*, 2004; Carbone *et al.*, 2005; Drapeau *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2006; Kopp *et al.*, 2000; True *et al.*, 2005; Wittkopp *et al.*, 2002a; Wittkopp *et al.*, 2002b; Wittkopp *et al.*, 2003a; Wittkopp *et al.*, 2003b;).

A pigmentação em *Drosophila* apresenta um padrão de relação com a temperatura cujas bases têm determinação tanto genética como ambiental, sendo que a proporção de influência destas duas causas pode variar de acordo com a espécie. Tal padrão pode ser observado em diferentes espécies, e consiste na ocorrência de animais mais escuros em ambientes mais frios e de animais mais claros em ambientes mais quentes.

Em algumas espécies, há exemplos claros de plasticidade fenotípica da pigmentação em resposta à temperatura, seguindo este padrão. Dentre elas, estão *D. melanogaster*, *D. simulans* e *D. kikkawai* (da Costa *et al.*, 2003 Gibert *et al.* 1999; Gibert *et al.* 2004, Pétavy *et al.* 2002). Nos dois primeiros casos, as espécies possuem pigmentação tanto no tórax, sob a forma de um tridente escuro, como no abdômen, e há dados do campo e de laboratório que indicam um aumento da pigmentação nestas duas regiões em temperaturas baixas. No segundo caso, de *D. kikkawai*, há registro de plasticidade no laboratório em relação à pigmentação abdominal.

Além disso, há evidências de variações genéticas que obedecem à mesma relação com a temperatura, como no caso de *D. melanogaster*. Nesta espécie, foi observada uma diferença entre populações da Índia e da França, estudadas por Gibert *et al.* (2004), em relação à pigmentação abdominal e do tórax, bem como clines latitudinais da pigmentação do tórax (Munjál *et al.* 1997), evidenciando o aumento da pigmentação em ambientes frios. Nesta mesma espécie, diferenças na expressão do gene *bric-a-brac* indicam que o dimorfismo sexual que esta apresenta pode ter sido fruto de seleção sexual (Kopp *et al.*, 2000, Kopp *et al.*, 2004). No subgrupo *Drosophila dunni*, a distribuição de padrões de pigmentação entre espécies ao longo das ilhas do Caribe, quando comparada à filogenia, revela evidências fortes de que este caráter passou por seleção natural durante a formação das espécies estudadas, havendo ainda evidências de ação de seleção sexual sobre o caráter (Brisson *et al.*, 2006; Hollocher *et al.*, 2000). Dentro deste subgrupo, foram estudados dois genes envolvidos na produção de pigmentos, e em ambos foram detectadas evidências de seleção natural recente no nível molecular (Wilder *et al.*, 2004).

Alguns mecanismos já foram cogitados como possíveis causas deste padrão, sendo que uma das hipóteses mais comumente levantadas é a do *thermal-budget*, segundo a qual a pigmentação escura poderia regular a temperatura corporal através da absorção de raios de luz. Tal hipótese foi proposta por Watt (1968), para borboletas do gênero *Colias*, que detectou um maior aquecimento das formas escuras de asa em relação às mais claras. Assim, animais mais escuros em ambientes mais frios teriam maior capacidade de absorver calor, enquanto animais mais claros em ambientes mais quentes evitariam o superaquecimento. Porém, poucas abordagens experimentais sobre esta hipótese foram realizadas em *Drosophila*. Por outro lado, dois trabalhos experimentais recentes levantaram questões interessantes sobre a função da pigmentação em duas espécies diferentes do gênero. Dombeck & Jaenike (2004), estudando *D. falleni*, constataram que animais sem a pigmentação típica desta espécie

são duas vezes mais susceptíveis a infecção por nematódeo na fase larval, em relação aos animais selvagens pigmentados. Com *D. polymorpha*, cujo polimorfismo de pigmentação foi primeiramente investigado por da Cunha (1949), Brisson *et al.* (2005) observaram que animais de linhagens com pigmentação abdominal mais escura tiveram maior resistência a um ambiente de dessecação, configurando uma possível explicação para a distribuição não-aleatória das formas do polimorfismo entre ambientes abertos e de matas fechadas (secos e úmidos, respectivamente). Assim, há diversas possibilidades de mecanismos ecológicos, fisiológicos e comportamentais a serem consideradas na investigação e elaboração de hipóteses de seleção sobre a pigmentação em populações naturais de *Drosophila*.

***Drosophila mediopunctata*.**

O grupo *tripunctata* é o segundo maior grupo neotropical de *Drosophila*, com 64 espécies descritas, cujo nome deriva do padrão característico de pigmentação abdominal, formado por três pintas escuras na região mediana dos últimos tergitos. *Drosophila mediopunctata* é uma espécie pertencente a este grupo e é abundante em áreas florestais, ocorrendo de El Salvador ao sul do Brasil. Esta espécie tem sido objeto de estudo sob vários aspectos (Klaczko, 2006), e alguns fatores relacionados à sua pigmentação já foram descritos. *D. mediopunctata* tem seis pares de cromossomos, sendo que alguns apresentam polimorfismo de inversões. Foi constatado que o mais polimórfico é o cromossomo II, que possui 17 inversões, que podem ser agrupadas em oito inversões distais e nove inversões proximais (Ananina *et al.*, 2002). Há duas inversões proximais comumente encontradas, designadas como *PA0* e *PC0*, que apresentam desequilíbrio de ligação com conjuntos diferentes de inversões distais: *PA0* está associada à inversão distal *DA*, enquanto *PC0* está associada às inversões distais *DS*, *DP* e *DV* (Peixoto & Klaczko, 1991).

Foi observado que as frequências das inversões do cromossomo II variam temporal e espacialmente em populações naturais desta espécie: a frequência de *PA0* aumenta nos meses mais frios, bem como em altitudes maiores (mais frias) e *PC0* está mais frequente em meses mais quentes e altitudes menores (mais quentes) (Ananina *et al.*, 2004). Há fortes evidências, portanto, de que a inversão *PA0* esteja mais adaptada a ambientes mais frios e *PC0* a ambientes mais quentes (Ananina *et al.*, 2004; Klaczko, 2006).

A pigmentação abdominal de *D. mediopunctata* é constituída por dois padrões: um formado por bandas escuras na região posterior dos primeiros tergitos e outro por um número variável de pintas na região mediana dos últimos tergitos. Assim, quatro fenótipos podem ser observados nesta espécie: indivíduos sem pintas; com uma pinta (no sexto tergito); duas pintas (no quinto e sexto tergitos) ou três pintas (no quarto, quinto e sexto tergitos). A pinta do quarto tergito pode ainda se fundir às bandas da margem posterior do mesmo, formando um fenótipo designado como 3D, que é analisado como tendo três pintas (Fig.I.1). Além disso, a variação deste caráter também ocorre no tamanho, forma e intensidade destas pintas, e há dimorfismo sexual, sendo que os machos possuem em geral mais pintas que as fêmeas (Frota-Pessoa, 1954). Por ocorrer de forma descontínua e ter formas de fácil identificação, este tipo de variação de pigmentação é propício ao estudo da variação fenotípica, pois pode ser rapidamente caracterizada sob a forma de número de pintas, possibilitando estudos com tamanhos amostrais razoáveis.

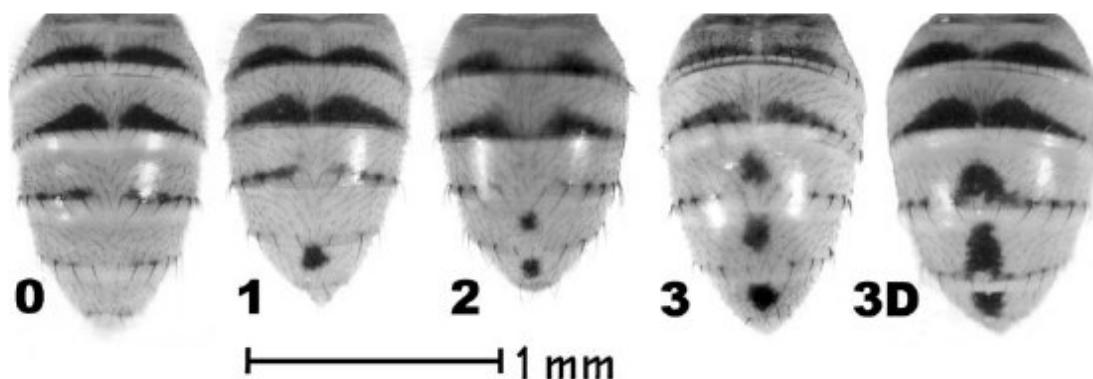


Figura I.1. Padrão de pigmentação abdominal em *D. mediopunctata*, com os quatro fenótipos de pintas (Hatadani, 2002).

Em relação à determinação do fenótipo deste caráter, há influência tanto ambiental como genética. Quanto à determinação ambiental, o caráter apresenta alta plasticidade fenotípica em resposta à temperatura de desenvolvimento. Assim, em ambientes mais frios são desenvolvidos animais mais escuros (com mais pintas) e em ambientes mais quentes são formados animais mais claros (com menos pintas) (Hatadani, 2002). O padrão de plasticidade, portanto, obedece ao esperado pela hipótese do *thermal-budget*.

Quanto à determinação genética do fenótipo, Hatadani *et al.* (2004) constataram uma associação não-aleatória entre as inversões *PA0* e *PC0* e o número de pintas abdominais, na qual a primeira está associada a fenótipos mais claros (com menos pintas)

e a segunda a fenótipos mais escuros (com mais pintas). Esta associação, aparentemente, geraria um padrão em desacordo com o esperado pela hipótese do *thermal-budget*, visto que o relaciona a inversão que estaria mais adaptada ao frio (*PA0*) a fenótipos claros e a inversão mais adaptada ao calor (*PC0*) a fenótipos escuros.

Em outro trabalho relativo ao policromatismo, desta vez com populações naturais, foram observadas evidências de um padrão de variação de contragradiente para o caráter, que se caracteriza por uma variação genética em sentido contrário à variação ambiental. Evidências deste padrão foram observadas num experimento em que animais trazidos do campo foram comparados quanto aos seus fenótipos e de suas progênies (Hatadani, 2002). Os animais coletados em meses mais frios apresentaram mais pintas que aqueles coletados em meses mais quentes, obedecendo ao padrão conhecido de plasticidade fenotípica. Porém, suas progênies criadas sob mesma temperatura no laboratório apresentaram padrão oposto: aquelas provenientes de meses frios foram mais claras que aquelas dos meses mais quentes (Hatadani, 2002). Geralmente, este padrão de variação é associado à ocorrência de seleção natural no sentido contrário à variação causada pelo ambiente (Conover & Schultz, 1995), chamada de seleção antagonista (Falconer, 1990). No caso da espécie estudada, o padrão de variação é consistente com a associação entre as inversões *PA0* e *PC0* e o número de pintas.

Comumente, a existência de variação genética subjacente à variação de caracteres conspícuos é vista como objeto da ação de seleção natural (Cain & Sheppard, 1950; Gillespie & Oxford, 1998; True, 2003). De forma semelhante, a ocorrência de polimorfismo de inversões guarda alguns exemplos de evidências fortes de seleção natural e é freqüentemente associada à manutenção por seleção natural (Hoffman *et al.*, 2004). E há ainda a possibilidade de que estes arranjos sejam utilizados como arcabouço para a formação de conjuntos gênicos coadaptados à mesma condição ambiental (Hoffman *et al.*, 2004).

Assim, o conjunto de resultados produzidos a respeito da pigmentação nesta espécie, bem como a comparação dos padrões observados com outros casos já descritos, sugerem que o policromatismo de *D. mediopunctata* deve estar sob ação de seleção natural, sem ser possível, no entanto, indicar os mecanismos biológicos que gerariam tal pressão seletiva. Uma vez que o policromatismo nesta espécie tem forte determinação genética e ambiental, estudar os fatores determinantes da variação encontrada em campo pode esclarecer possíveis mecanismos de seleção e ajudar na construção de hipóteses, que podem ser então submetidas a novos testes.

Plasticidade fenotípica.

Plasticidade fenotípica pode ser definida como a capacidade de um mesmo genótipo produzir fenótipos diferentes, em resposta a condições ambientais distintas (Pigliucci *et al.*, 2006). A existência de plasticidade fenotípica em um caráter pode significar uma resposta definida por restrições fisiológicas, bioquímicas ou de desenvolvimento do organismo, não sendo necessariamente adaptativa. Por outro lado, em alguns casos a plasticidade pode ser uma resposta adaptativa à variação ambiental, possibilitando à espécie ocupar ambientes variáveis temporal e espacialmente (Grill *et al.*, 1997; Pigliucci *et al.*, 2006). Estudos sobre a determinação genética deste tipo de variação fenotípica evidenciaram que a mesma pode ser considerada um traço que pode responder à ação da seleção natural (Pigliucci, 2005; Scheiner, 1993). Outros trabalhos tratam ainda de questões sobre as bases genéticas da plasticidade, investigando sua relação com a base genética do caráter em si e outros fatores, como heterozigose, pleiotropia e epistasia (Scheiner & Lyman, 1989; Scheiner, 1993). Por outro lado, como questiona Pigliucci (2005), não haveria motivos *a priori* para esperar uma mesma base genética para a plasticidade de todos os caracteres. Ainda assim, entender as bases genéticas da plasticidade de um caráter específico pode ajudar no entendimento do papel da plasticidade, bem como sua relação com a determinação genética do caráter em si. A existência de genes próprios da plasticidade, determinando sua forma e limites, possibilita a ação de seleção direta e isoladamente sobre a este traço, sem afetar necessariamente a média do caráter que apresenta plasticidade. Por outro lado, se os genes de determinação da média do caráter e de sua plasticidade forem compartilhados entre estes dois traços, a seleção sobre o fenótipo isolado em um ambiente pode afetar a plasticidade indiretamente (Falconer, 1990), assim como a seleção sobre a plasticidade pode afetar a média do caráter.

Uma forma possível e muito utilizada de estudar a plasticidade de um caráter é a descrição das normas de reação de um ou mais genótipos (Barker & Krebs, 1995; David *et al.*, 2006; Dev Karan *et al.*, 2000; Gibert *et al.*, 1998; Gibert *et al.*, 1999a; Gibert *et al.*, 2004; Gupta & Lewontin, 1982; Pétavy *et al.*, 2002; Van Dooren *et al.*, 2005). Este tipo de abordagem pode proporcionar o conhecimento da capacidade de cada genótipo responder a diferentes ambientes utilizados; bem como a variação na resposta fenotípica de diferentes genótipos, caracterizando tanto a resposta média, ou tendência, de uma população ou linhagem, como a variação nesta resposta. Isto permite estabelecer

relações entre plasticidade, genótipo e fenótipo, esclarecendo o papel da resposta fenotípica na vida do organismo estudado.

A pigmentação abdominal de *D. mediopunctata* apresenta alto grau de plasticidade fenotípica em resposta à temperatura, sendo que linhagens que apresentem poucas pintas quando criadas a 20° C podem passar a ter predominantemente três pintas a 16,5° C (Hatadani, 2002). Apesar de haver algumas hipóteses para explicar a variação de pigmentação em outras espécies, não há conhecimento suficiente sobre esta propriedade em *D. mediopunctata* para avaliar se estas são plausíveis neste caso, ou ainda se a plasticidade neste caráter é adaptativa ou um subproduto de processos fisiológicos ou de desenvolvimento. Também não se conhece como linhagens diferentes respondem à variação de temperatura, nem há caracterização da forma como esta resposta ocorre, e se há relação entre fenótipo, cariótipo e a plasticidade do caráter. Principalmente, a associação não-aleatória entre inversões do cromossomo II e fenótipos de pintas diferentes levanta a possibilidade de haver influência direta das inversões (complexos gênicos coadaptados) sobre a plasticidade do caráter. Aparentemente, o padrão de plasticidade fenotípica deste caráter parece obedecer à hipótese de termorregulação através da pigmentação. Porém, o padrão de contragradiente descrito por Hatadani (2002) parece contradizer a idéia de que a pigmentação teria este papel predominante nesta espécie.

Assim como a base genética, os processos fisiológicos responsáveis pela plasticidade ainda são pouco conhecidos. Tal é o caso do policromatismo de *D. mediopunctata*. Aparentemente, a atuação da temperatura sobre a pigmentação nesta espécie ocorre no desenvolvimento de ovo a adulto. Há evidências de que os processos de pigmentação em *Drosophila* ocorram no final do desenvolvimento (Pentz *et al.*, 1986; True *et al.*, 2005) e, portanto, na fase de pupa, que pode ser caracterizada como uma fase de diferenciação (James & Partridge, 1995). Assim, é possível que estes mesmos processos sejam afetados pela temperatura do ambiente. Porém, também há a possibilidade de que exista algum fator sensível à temperatura, com capacidade de alterar o fenótipo final de pintas do adulto nos primeiros momentos de desenvolvimento da mosca. Em *D. melanogaster* e *D. simulans*, foram determinados os períodos termo-sensíveis para o fenótipo de pigmentação do abdome (Chakir *et al.*, 2002). Em ambas espécies, foi observada uma alteração no fenótipo médio produzido dentro da fase de pupa, evidenciando uma sincronia entre processos de diferenciação da cutícula e da influência da temperatura.

Em *D. mediopunctata*, não há conhecimento sobre qual o momento do desenvolvimento no qual a temperatura influencia a determinação do número de pintas. Assim, conhecer o período termo-sensível à temperatura na formação do fenótipo de pintas pode ajudar na busca de fatores sensível à temperatura e elaborar experimentos e hipóteses sobre a formação e o papel da plasticidade deste caráter.

Taxa de desenvolvimento e plasticidade.

Uma característica da história de vida de *Drosophila* frequentemente estudada é o tempo de desenvolvimento (Bochdanovits & De Jong, 2003; Budnik *et al.*, 1971; James & Partridge, 1995; Knibb *et al.*, 1987; Prasad *et al.*, 2000; Sgrò & Blows, 2003; Van der Linde & Sevenster, 2006). Esta característica é altamente influenciada pela temperatura, apresentando plasticidade fenotípica, que se constitui numa velocidade de desenvolvimento maior em temperaturas mais altas e, portanto, um tempo de desenvolvimento mais curto, em diversas espécies. O tempo de desenvolvimento é um componente do valor adaptativo, sendo selecionado, em geral, no sentido da sua diminuição (Collinge *et al.*, 2006; James & Partridge, 1995; Knibb *et al.*, 1987; Prasad *et al.*, 2000; Sgrò & Blows, 2003;). Porém, há limites para esta tendência, pois uma diminuição muito drástica deste período poderia causar perdas em outros componentes do valor adaptativo, como a viabilidade e o tamanho do adulto (Prasad *et al.*, 2000). Além da resposta fenotípica à temperatura, há evidências de que em algumas espécies a seleção favorece um desenvolvimento mais rápido em temperaturas mais baixas. A taxa de desenvolvimento determina o intervalo de tempo que o indivíduo leva para começar a se reproduzir, tendendo a ser aumentada por seleção. Além disso, durante a fase larval as larvas ficam expostas à predação e presas num sítio cuja qualidade tende a diminuir, de modo que esta fase é selecionada para diminuir (James & Partridge, 1995).

Em *D. mediopunctata*, a taxa de desenvolvimento é afetada pela temperatura e há a possibilidade de esta ser selecionada diferencialmente em locais com temperaturas diferentes, e haver relação entre este caráter e as inversões *PA0* e *PC0*. Assim, estudar a relação entre estas inversões, o fenótipo de pintas e a taxa de desenvolvimento pode contribuir para o entendimento da relação destas variáveis com a temperatura ambiental.

Determinação genética.

A herdabilidade pode ser definida como a proporção da variação fenotípica determinada pela variação genética aditiva, e pode ser usada para quantificar a capacidade de uma dada população de responder à ação de seleção natural sobre um determinado caráter. Assim, estimativas de herdabilidade podem ajudar no entendimento de caracteres que se julga estar sob seleção.

Em caracteres com alta plasticidade fenotípica, a princípio, o alto grau de variação causado pelo ambiente pode reduzir a determinação genética do mesmo, diminuindo a herdabilidade. A pigmentação abdominal de *D. mediopunctata*, por apresentar alta plasticidade fenotípica, a princípio se enquadra nesta expectativa. Porém, é possível que em temperaturas intermediárias seja mantida a correspondência fenotípica entre pais e filhos, dependendo do grau de determinação genética. Assim, a existência de alta plasticidade em resposta à temperatura numa espécie que está submetida em seu habitat a variações sazonais e espaciais pode dificultar a ação de seleção natural, por aumentar a variação ambiental e reduzir a herdabilidade. Desta forma, estudar a determinação genética de um caráter potencialmente sob seleção se faz necessário.

Estimativas de herdabilidade feitas a partir de procedimentos laboratoriais tendem, por sua natureza, a produzir superestimativas, pois o ambiente homogêneo e controlado do laboratório tende a reduzir a variância ambiental, aumentando a proporção da determinação genética sobre o fenótipo (Riska *et al.*, 1989). Assim, para fazer inferências sobre a evolução fenotípica de um caráter na natureza, deve-se estudar a herdabilidade do caráter no campo. Para tal, seria necessário obter famílias inteiras da espécie estudada na natureza, tarefa impossível com a maioria das espécies de *Drosophila*. Entretanto, um método utilizado por Coyne & Beecham (1987) possibilita fazer uma aproximação das estimativas ao valor da herdabilidade natural, utilizando a regressão das médias de filhos criados no laboratório pelos valores de pais coletados no campo. Assim, as estimativas de herdabilidade obtidas tendem a se aproximar da herdabilidade das populações naturais. Porém, como os filhos são criados no laboratório, ainda há uma tendência à redução da variância ambiental e, portanto, gerar estimativas acima daquela que existe no campo.

Apesar de a pigmentação ser considerada um alvo potencial de seleção natural em insetos, há poucos trabalhos com estimativas de herdabilidade para pigmentação, principalmente neste grupo (Gibert *et al.* 1998b; Lee & Wilson, 2006). Assim, determinar a

herdabilidade de padrões de pigmentação pode gerar respostas quanto à determinação genética destes traços e, logo, sua capacidade de responder à seleção natural.

Tamanho corporal em *Drosophila*.

Outro caráter que apresenta um padrão de variação com determinação genética e ambiental é o tamanho corporal. Este caráter é amplamente estudado em *Drosophila*, sendo influenciado pela temperatura de desenvolvimento (Atkinson & Sibly, 1997; Cabanita & Atkinson, 2006; David *et al.*, 2006; Pétavy *et al.*, 2001;) e pela densidade (Baldal *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 1994).

Especificamente, o padrão de relação entre o tamanho corporal e a temperatura é conhecido como regra temperatura-tamanho (*temperature-size rule*), que consiste na presença de animais maiores em temperaturas menores e animais menores em temperaturas maiores. Este padrão se repete nos níveis fenotípico e genético, gerando em alguns casos diferenças entre populações que ocupam ambientes com diferentes temperaturas, ou clines em gradientes latitudinais e altitudinais, associados a esta variável (Atkinson & Sibly, 1997; Bochdanovits & De Jong, 2003; Cavicchi *et al.*, 1989; David *et al.*, 2006; Pétavy *et al.*, 2001). Em *D. mediopunctata*, um exemplo de cline altitudinal foi observado em populações naturais, obedecendo à regra temperatura-tamanho (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999). A explicação mais difundida para este tipo de variação é conhecida como regra de Bergman, que diz que um tamanho maior no frio diminuiria a relação superfície/volume, que determina a troca de calor do corpo com o ambiente. Porém, outras hipóteses acerca deste padrão, principalmente relativas a animais ectotermos, têm sido propostas (Atkinson & Sibly, 1997; Cabanita & Atkinson, 2006).

O tamanho corporal, em *Drosophila*, está ligado ao valor adaptativo (Bochdanovits & De Jong, 2003; Sisodia & Singh, 2004; Yadav & Singh, 2006). Tradicionalmente, espera-se que caracteres ligados ao valor adaptativo tenham uma baixa proporção de determinação genética aditiva e, portanto, baixa herdabilidade. Este parece ser o caso do tamanho corporal em *Drosophila*. Alguns trabalhos já realizaram procedimentos para estimar a herdabilidade do tamanho corporal neste gênero, em geral utilizando o tamanho da asa ou o comprimento do tórax como indicadores do caráter. Em geral, têm sido obtidas baixas estimativas de herdabilidade “natural” para o tamanho corporal (Coyne & Beecham, 1987; Matta & Bitner-Mathé, 2004; Moraes & Sene, 2004; Prout & Barker, 1989), inclusive para *D. mediopunctata* (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999a; Bitner-Mathé & Klaczko, 1999b).

Objetivos:

Com este trabalho pretende-se estudar aspectos da determinação ambiental e genética do número de pintas abdominais em *D. mediopunctata*, visando colaborar para um melhor entendimento das causas da variação deste carácter e para a formulação de hipóteses acerca da função biológica do mesmo nesta espécie.

Assim, pretende-se descrever a norma de reação da pigmentação abdominal (número de pintas) em relação à temperatura, e determinar o período de desenvolvimento termo-sensível para o fenótipo deste carácter em *D. mediopunctata*.

Uma vez que o conjunto de dados atual aponta para uma provável seleção sobre o número de pintas abdominais nesta espécie e diante do alto grau de plasticidade observado neste traço, deseja-se estimar a herdabilidade para o mesmo em mais de um ambiente. Além disso, pretende-se determinar a herdabilidade do tamanho corporal, na expectativa de que este conjunto de estimativas sirva como um bom parâmetro de comparação, uma vez que há poucas estimativas de herdabilidade para pigmentação em *Drosophila*.

Especificamente, os objetivos deste trabalho são:

- Descrever detalhadamente a norma de reação do número de pintas à temperatura.
- Verificar se há influência direta dos arranjos gênicos *PA0* e *PC0* e do fenótipo de pintas sobre as respostas fenotípicas.
- Descrever a norma de reação da taxa de desenvolvimento à temperatura, investigando as mesmas variáveis relacionadas para o número de pintas.
- Detectar a fase de desenvolvimento em que se dá a influência da temperatura sobre o número de pintas abdominais.
- Obter estimativas de herdabilidade, em condições quase naturais e de laboratório, para o número de pintas abdominais de *D. mediopunctata*.
- Obter estimativas de herdabilidade, em condições quase naturais e de laboratório, para o tamanho do tórax, e compará-las com aquelas obtidas para o número de pintas.

II. Material e Métodos.

II.1. Plasticidade Fenotípica.

II.1.1. Norma de Reação:

O fenótipo de pintas e o tempo de desenvolvimento foram observados em moscas de oito estirpes, que se desenvolveram num gradiente térmico entre 14 e 24 °C.

Estirpes: as estirpes utilizadas foram obtidas, juntamente com outras, num procedimento anterior realizado no laboratório, descrito em Hatadani *et al.* (2004). O método usado permitiu obter estirpes que, compartilhando o mesmo background genético (incluindo as mutações *alfinete* e *coral*, nos cromossomos IV e V), diferiam apenas em relação ao cromossomo II, o qual estava em homozigose. O esquema usado está na Fig. II.1.

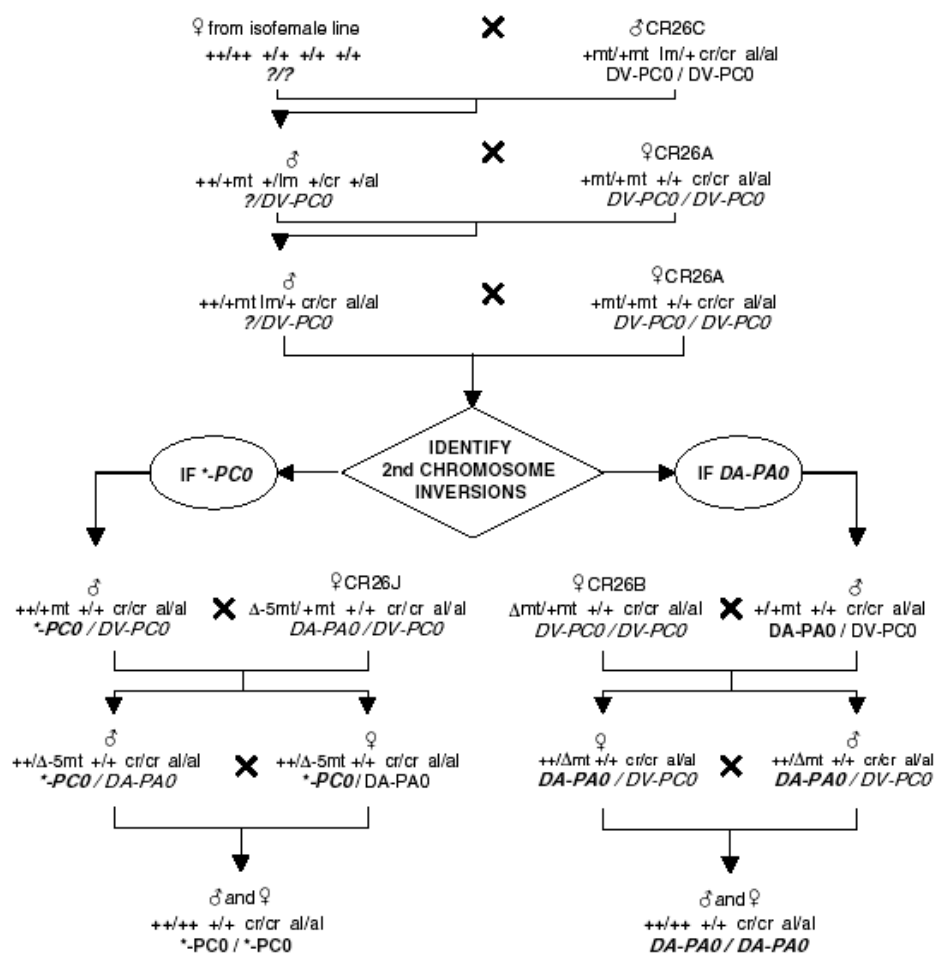


Figura II.1. Esquema de cruzamentos utilizados para obter estirpes com diferentes cromossomos II sobre o mesmo background genético (Hatadani *et al.*, 2004).

Dentre as estirpes obtidas, Hatadani *et al.* (2004) analisaram o padrão de pintas de nove estirpes *PA0* e nove *PC0*. Os resultados destes autores estão na Fig. II.2.

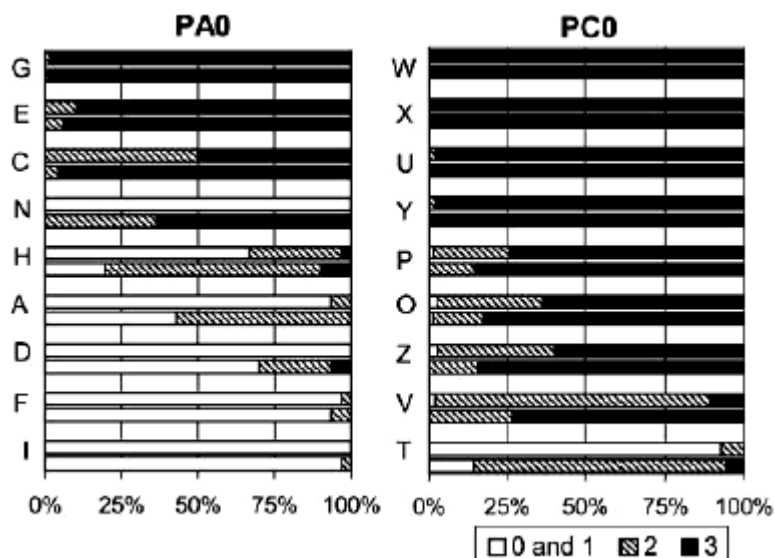


Figura II.2. Proporção dos fenótipos de pintas nas estirpes obtidas, em fêmeas (barras de cima) e machos (barras de baixo) (Hatadani *et al.*, 2004).

Do conjunto total de estirpes obtidas por estes autores, foram retiradas oito, seguindo uma amostragem estratificada, que satisfazia os seguintes critérios: a) quatro estirpes por cariótipo (*PA0* e *PC0*); b) duas estirpes com fenótipo claro extremo (poucas pintas), 2 com fenótipo escuro extremo (muitas pintas), 2 intermediárias claras, e 2 intermediárias escuras; c) que cada inversão estivesse representada na amostra, na medida do possível, em mais de uma classe fenotípica (e não concentrasse as escuras só em *PC0* e as claras em *PA0*). O objetivo dessa amostragem foi minimizar o confundimento (“confounding effect”) entre inversão e fenótipo.

Desta forma para *PA0* foram usadas as estirpes **I**, **D**, **H** e **G**, das quais duas eram claras, uma intermediária clara e uma escura. Para *PC0* foram utilizadas **T**, **O**, **Z** e **X** (uma intermediária clara, 2 intermediárias escuras e uma escura). As médias do número de pintas por estirpe, bem como a nomenclatura doravante usada para denominá-las estão na Tabela II.1.

Colocação dos indivíduos no gradiente: a coleta de larvas para colocação no gradiente foi feita utilizando lâminas cobertas com gel de ágar (1,2%) pinceladas com uma solução

com fermento biológico. As lâminas foram colocadas em garrafas sem meio de cultura contendo os indivíduos adultos de cada estirpe e após um dia foram retiradas, passando a seguir mais um dia isoladas, de modo que não haveria outras oviposições e os ovos poderiam eclodir. No final deste período, as larvas foram retiradas e colocadas, em grupos de 15, em um tubinho contendo 5 ml de meio de cultura.

Tabela II.1. Número médio de pintas por estirpe, e classificação fenotípica.

Estirpe	Cariótipo	média inicial	classe fenotípica
I	PA0	1,01	Clara
D	PA0	1,18	Clara
H	PA0	1,62	Inter clara
T	PC0	1,48	Inter clara
Z	PC0	2,71	Inter escura
O	PC0	2,70	Inter escura
G	PA0	2,98	Escura
X	PC0	3,00	Escura

Gradiente Térmico: utilizando o mesmo aparelho montado por Medeiros (2006), modificado a partir de Fogleman (1978), foi estabelecido um gradiente térmico com onze temperaturas, indo de 14° a 24° C, com escala de um grau. Cada tubinho com larvas foi colocado a cada grau, com três repetições, totalizando 264 tubinhos com 15 larvas cada (3960 larvas no total). Foi feita a observação diária da temperatura do gradiente e das fases de desenvolvimento dos indivíduos, e as imagos foram retirados diariamente após a primeira emergência observada.

Obtenção dos dados: para cada indivíduo foi registrado o dia de emergência, o que permitiu calcular para cada um o tempo de desenvolvimento. A taxa de desenvolvimento foi estimada como o inverso do tempo de desenvolvimento ($1/t$), onde t é o tempo de desenvolvimento expresso em número de dias. Após um mínimo de três dias a partir da data de retirada de cada indivíduo do gradiente, o número de pintas abdominais foi registrado.

Análise dos dados:

Foram analisados no total 1134 animais. Uma análise preliminar foi feita através da observação dos gráficos representando as médias de pintas ou taxa de desenvolvimento por estirpe e sexo. Para testar quantitativamente a influência da temperatura, do cariótipo, do sexo e das estirpes, foi realizada uma ANCOVA (Systat 8.0, 1998), na qual as variáveis

cariótipo e sexo foram codificadas como categóricas e a temperatura de desenvolvimento como co-variável. O efeito da estirpe foi aninhado por cariótipo. Foram testadas as interações duas a duas entre todas as variáveis, com exceção da variável “estirpes”. A seguir, para as duas variáveis analisadas (número de pintas e taxa de desenvolvimento), foi feita uma segunda ANCOVA, testando a influência de todas as variáveis testadas anteriormente, sendo que a variável cariótipo foi substituída pela variável classe fenotípica, também codificada como categórica, com as classes clara, intermediária clara, intermediária escura e escura, independentes do cariótipo.

Para as variáveis cariótipo e fenótipo inicial, foram feitas as curvas médias, agrupando as estirpes por sexo, possibilitando a interpretação gráfica dos fatores detectados pelas ANCOVAs. Depois da inspeção visual dos gráficos, buscou-se ajustar uma equação quadrática ($y = a + bx + cx^2$) aos dados. Nesse caso, se este modelo se ajustar bem aos dados, pode-se analisar o coeficiente de curvatura (c). Se ele for significativamente maior que 0 (positivo) indica que a curva é convexa; se for significativamente menor que 0 (negativo), a curva é côncava; e se não for significativamente diferente de 0, a curva se reduz à equação linear (Heino *et al.*, 2002). Outro método de análise, baseado na análise das derivadas das normas de reação, pode ser encontrado em Gibert *et al.* (1998a), Pétavy *et al.* (2002) e David *et al.* (2006). Além disso, foram estimadas as médias gerais, englobando todas as temperaturas, por cariótipo e classe fenotípica, para a taxa de desenvolvimento, para interpretar os efeitos destas variáveis.

II.1.2. Experimento de Transferência de temperaturas

Estirpes: foram utilizadas duas estirpes isofêmeas obtidas a partir de uma coleta feita em abril de 2005 na Mata Ribeirão Cachoeira, Campinas, SP. Antes do início do experimento, estas estirpes estavam sendo criadas a 20° C. Verificou-se que o fenótipo dos machos e fêmeas se mantinha entre 1 e 2 pintas, mantendo-se a diferença entre sexos. Foram coletados ovos em lâminas cobertas com gel de ágar e uma camada de fermento posicionadas dentro de garrafas sem meio de cultura contendo os adultos de cada estirpe separadamente.

Tratamento experimental: os ovos de cada estirpe, em grupos de dez, foram colocados em tubos com 5ml de meio de cultura e colocados numa câmara a 20°C e com fotoperíodo de 12:12h. Esta temperatura foi escolhida para obter animais com poucas

pintas e que apresentassem boa viabilidade, visto que já se observou que ela declina acima de 20°C. No início do experimento, um grupo de quatro tubos foi colocado numa outra câmara a 16,5°C e fotoperíodo igual ao da primeira, submetendo-os a uma temperatura, na qual os animais emergem normalmente com mais pintas. A partir de então, a cada dia um grupo de quatro tubos foi transferido da câmara a 20°C para a câmara a 16,5°C. A transferência de tubos foi encerrada no primeiro dia em que imagos foram observadas nos tubos que ainda estavam a 20°C. Foi contado o número de pintas de todos os adultos, no mínimo três dias após a emergência (total de 254 adultos). Foram considerados tratamentos controle os conjuntos de tubos que passaram todo o tempo de desenvolvimento a 16,5° e a 20° C.

O experimento recíproco foi também iniciado, mas devido à baixa produção das moscas não pode ser realizado; e a exigüidade do prazo de defesa da tese impediu que fosse repetido.

Análise dos dados: para verificar se os tratamentos controle foram submetidos a condições suficientemente distintas para produzir diferentes fenótipos, os dados dos animais destes tratamentos foram comparados por um teste *t*. Como o número final de adultos por dia de transferência foi baixo, gerando muita variação que dificultava a interpretação dos dados, os dados das duas estirpes foram analisados juntamente, e foram agrupados a cada três dias, separados de acordo com a fase de desenvolvimento na qual se encontravam no dia de transferência para 16,5°C(ovo, larva, pupa e imago). A seguir, os dados dos indivíduos de todos os tratamentos foram submetidos a uma ANOVA, testando a influência da fase de transferência de 20°C para 16,5°C. Foi feito então um teste *a posteriori* de Tukey, para verificar se houve agrupamento dos dados produzidos em cada fase de transferência. O programas Systat v8.0 (Systat Software Inc., 1998) foi utilizado em todas as análises estatísticas.

II.2. Herdabilidade.

II.2.1. Coletas para estimativas de herdabilidade:

Local: a Mata Ribeirão Cachoeira localiza-se no condomínio Colinas do Atibaia, distrito de Souzas, em Campinas, SP (22°50'13"S e 46°55'58"W). Esta área pertence à APA de Souzas e Joaquim Egídio e é um remanescente de floresta mesófila semi-decídua típica do planalto paulista. A floresta tem altitudes entre 630 e 760m e possui um curso d'água em seu interior. Esta é a segunda maior mata do município de Campinas, com 244,9 ha.,

e está menos exposta a efeitos antrópicos e mais protegida de vendavais que a Mata de Santa Genebra, a maior em área do município.

Coletas: para obtenção das moscas, foram posicionadas iscas de banana com fermento em pratos de plástico ao longo da trilha principal da mata, que percorre um trecho do curso d'água. No dia seguinte à colocação das iscas, a coleta dos animais, com rede entomológica, foi iniciada. A primeira coleta foi realizada em 25 de fevereiro, e foram obtidos aproximadamente 30 fêmeas e 29 machos. A segunda coleta foi realizada de 4 a 9 de abril, quando foram obtidos 112 machos. A terceira coleta foi feita de 30 de setembro a 7 de outubro de 2005 e foram obtidas somente 35 fêmeas. Em todas as coletas os animais foram capturados até as 10:00h da manhã.

II.2.2. Estimativas de herdabilidade

II.2.2.a. Primeiro conjunto de estimativas:

Cruzamentos: as fêmeas coletadas em fevereiro de 2005 foram colocadas em tubos individuais com meio de cultura para oviposição, numa câmara a 18°C. Da primeira geração originada por essas fêmeas, foram separadas fêmeas virgens, que foram mantidas para amadurecimento por 15 dias, até meados de abril. Os machos obtidos na coleta de 7 de abril, por sua vez, foram colocados, individualmente, em tubos com meio de cultura. Nestes mesmos tubos, foram colocadas duplas das fêmeas virgens obtidas a partir da coleta de fevereiro, por um período de quatro dias para cruzamento.

Tratamentos: após o período de cruzamento os machos foram guardados e cada fêmea foi colocada individualmente em um tubo com meio para oviposição. A cada dois dias todas as fêmeas foram transferidas para um novo tubo, por três vezes. Ao final deste procedimento, cada fêmea tinha colocado ovos em três tubos, formando três conjuntos resultantes do cruzamento descrito anteriormente. Cada conjunto de tubos, com os ovos das fêmeas, foi então submetido a um tratamento durante o desenvolvimento dos ovos até a emergência: o primeiro conjunto de tubos foi colocado numa câmara a 20° C e o segundo numa câmara a 18° C. Já o terceiro conjunto de tubos foi levado para a Mata Ribeirão Cachoeira, onde foi colocado protegido da chuva num local sombreado onde, durante as coletas, foi observada a maior proporção de *D. mediopunctata* (Figura II.3).

Obtenção dos dados: para cada tratamento, até três filhos e até três filhas de cada fêmea foram analisados.

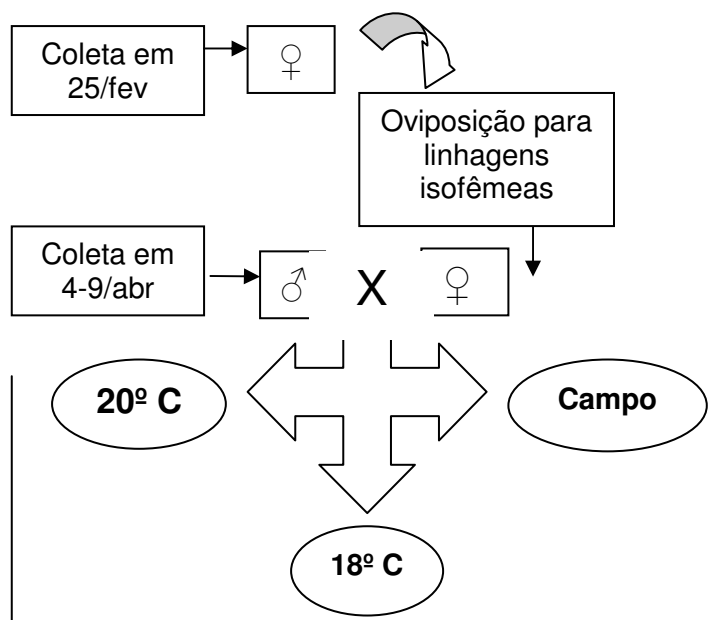


Figura II.3. Esquema dos cruzamentos e tratamentos para obtenção dos filhos e filhas para estimativa de herdabilidade de número de pintas e tamanho do tórax.

Número de pintas: todos os pais e mães foram observados ainda vivos. Até três filhos foram observados por mãe, ainda vivos, após um mínimo de três dias da emergência. Já as filhas foram conservadas em álcool 70% e somente depois até três filhas por mãe tiveram seu número de pintas contado. Já se observou que a preservação em álcool não interfere no diagnóstico do fenótipo de manchas nos primeiros meses. Todos os animais com o número de pintas determinado foram conservados individualmente em álcool 70%.

Tamanho do tórax: foi feita a medição do tórax de todos os animais que tiveram o número de pintas determinado, da inserção da cabeça até a ponta do escutelo, em lupa com ocular milimetrada, um procedimento simples que serve como bom indicador do tamanho corporal, utilizado por Bitner-Mathé & Klaczko (1999b), nesta mesma espécie.

Análise estatística e métodos de estimativa: para cada variável e em cada tratamento, foram calculados os valores de média e variância. Também foram calculadas as médias dos valores dos filhos e filhas de cada mãe e as médias dos valores dos filhos e filhas de cada pai (inclui os filhos de duas mães). Para levar em conta o tamanho variável das

famílias adotou-se o procedimento descrito por Falconer & Mackay (1996) que dá pesos às famílias em função do número de filhos (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999).

As estimativas de herdabilidade para as duas características analisadas foram feitas a partir da regressão linear das diferentes médias de valores fenotípicos de filhos ou filhas sobre: fenótipo dos pais, fenótipo das mães e média do fenótipo dos pais com uma das mães. No caso de regressão sobre o fenótipo dos pais ou das mães, as estimativas foram obtidas como o dobro do coeficiente angular da respectiva regressão. No caso de regressão sobre a média entre pai e uma das mães, as estimativas foram o próprio valor do coeficiente de regressão (Falconer & Mackay, 1996). Foram medidos e contados os 112 pais, 224 mães, 1217 filhos e 1245 filhas, somando 2798 animais analisados. Método semelhante de estimativa de herdabilidade "natural" foi empregado por Coyne & Beecham (1987) para o comprimento da asa e número de cerdas abdominais de *D. melanogaster*.

II.2.2.b. Segundo conjunto de estimativas:

Material: as fêmeas obtidas na coleta de outubro de 2005 tiveram o número de pintas registrado e foram colocadas em tubos individuais com meio de cultura, por três dias.

Tratamento: os tubos, com os ovos das fêmeas coletadas, foram colocados numa câmara a 18° C para o desenvolvimento dos ovos até a emergência das imagos.

Análise dos dados e estimativa de herdabilidade: o fenótipo de todos os filhos e filhas de cada mãe foi registrado, e foram calculadas então as médias de filhos e filhas por mãe. As estimativas de herdabilidade foram calculadas como o dobro do valor do coeficiente de regressão da média de filhos ou filhas pelas mães, seguindo os mesmos procedimentos que foram adotados para o primeiro conjunto de estimativas apresentado. Esta metodologia já foi usada em *D. mediopunctata* para estimar a herdabilidade de tamanho e forma da asa da população do Parque Nacional do Itatiaia (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999b; Bitner-Mathé & Klaczko, 1998).

III. Resultados.

III.1. Plasticidade Fenotípica.

III.1.1. Norma de Reação.

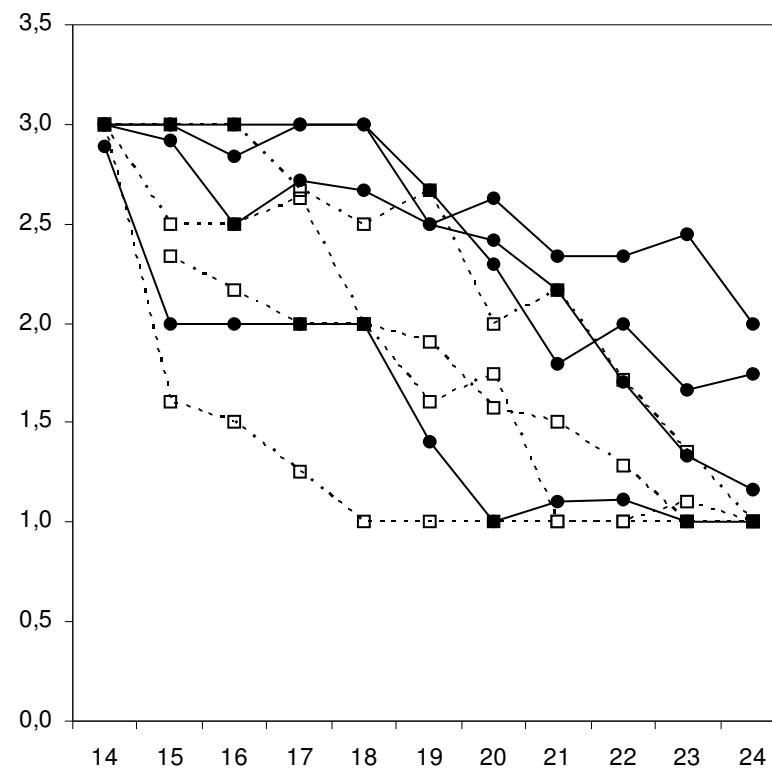
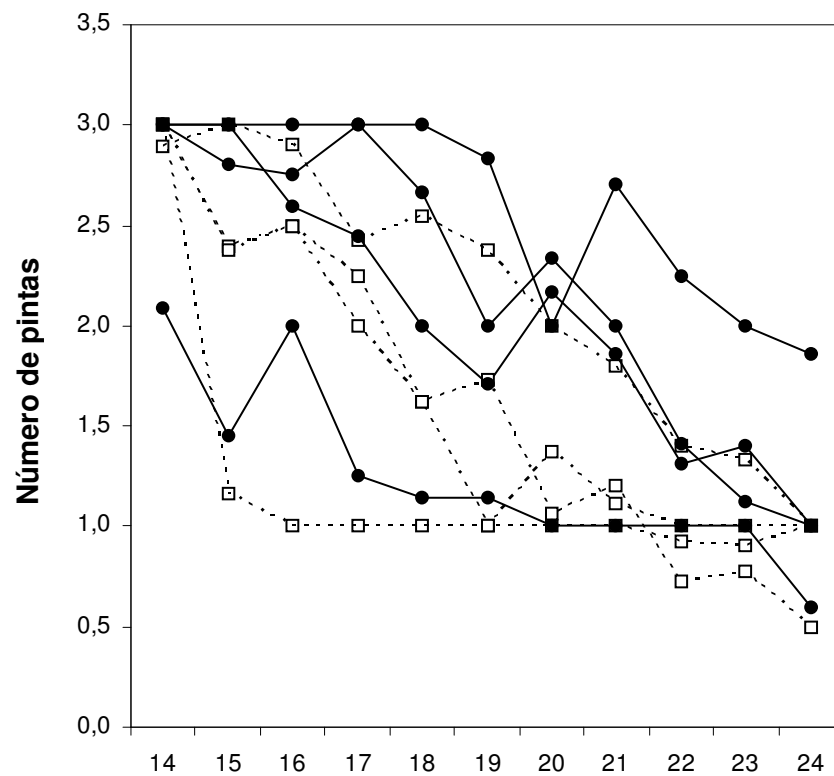
III.1.1.a. Número de pintas abdominais:

O número de pintas de todas as estirpes foi fortemente afetado pelo gradiente térmico. O número médio de pintas por indivíduo a 14°C foi 2,86 pintas, e a 24°C foi de 1,19.

As médias de pintas de cada uma das oito estirpes foram calculadas e representadas graficamente como curvas de resposta separadas por sexo. Para melhor compreender os padrões obtidos foram traçados dois conjuntos de curvas (absolutamente equivalentes). No primeiro estão evidenciadas as inversões *PA0* e *PC0* (Fig. III.1). Neste caso não há um padrão claro de diferença entre inversões; haja vista a sobreposição de curvas de *PA0* e *PC0*, tanto em machos quanto em fêmeas (veja Fig. III.1.a e b).

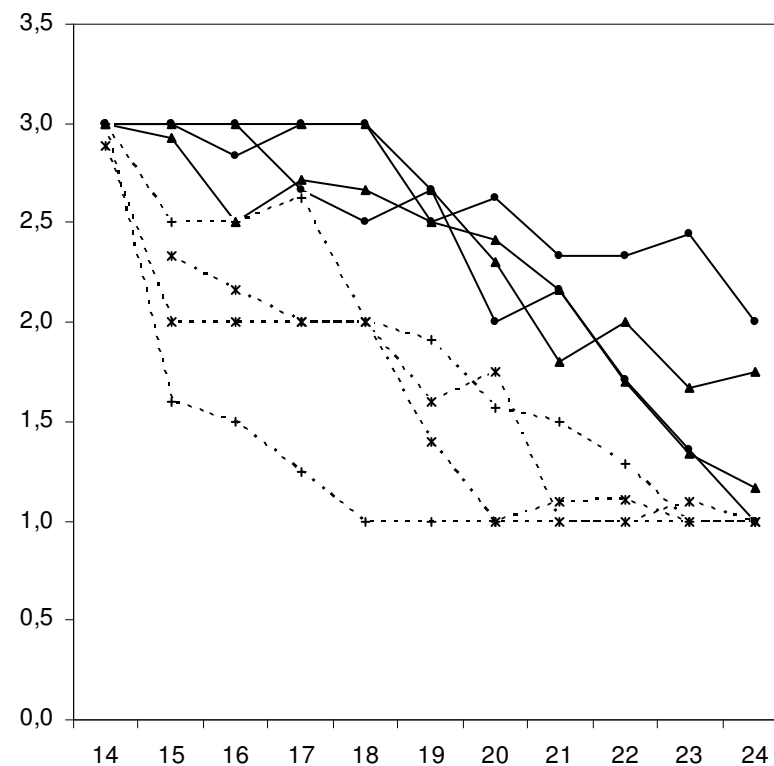
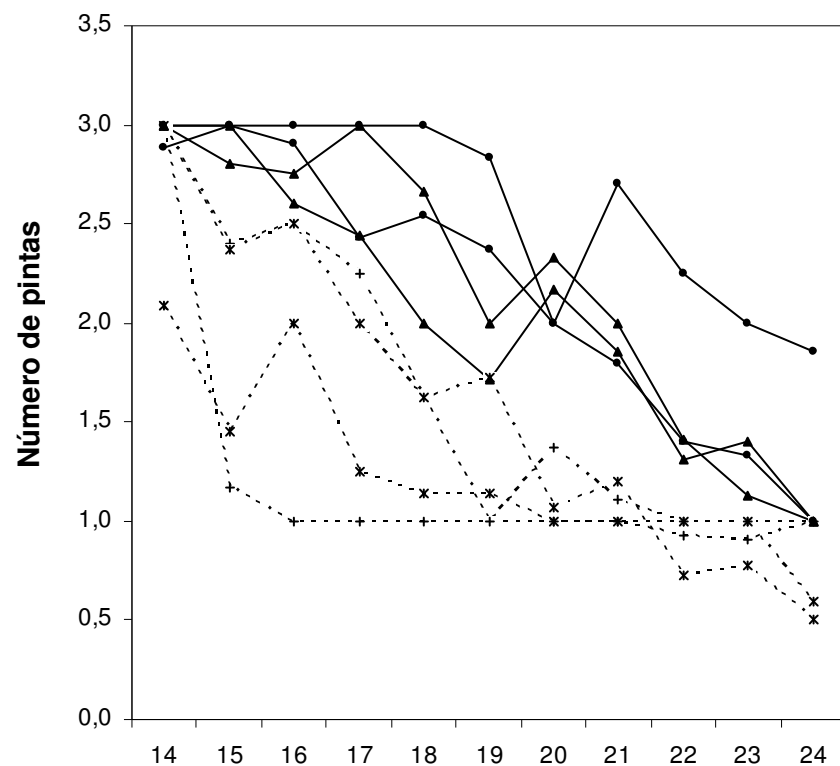
O segundo conjunto de curvas está na Fig. III.2. Ele mostra as 4 diferentes classes fenotípicas (clara, intermediária clara, intermediária escura, e escura). Em contraste com o conjunto anterior, este mostrou padrão bem nítido. Apesar das curvas obtidas apresentarem uma alta variação entre estirpes e classes fenotípicas, foi possível detectar um padrão de separação em dois grupos distintos, sem sobreposição entre si. Mesmo que dentro destes grupos, tenha havido alta sobreposição das curvas de diferentes classes, isto é, as classes *clara* e *intermediária clara* se mostraram separadas das classes *escura* e *intermediária escura* (Fig. III.2.a e b), e isto se repetiu em machos e fêmeas. Isto fica ainda mais claro ao agrupar as curvas de cada dupla de estirpes de cada classe fenotípica. As curvas médias das classes *clara* e *intermediária clara* se sobrepuseram, assim como as curvas médias das classes *escura* e *intermediária escura* (Fig. III.3).

Esta análise gráfica sugere que há diferenças entre estirpes influenciadas pela classe fenotípica, mas que não são determinadas pelos diferentes cariótipos. Este padrão foi esclarecido por duas ANCOVAS independentes, que foram realizadas, uma levando em conta o cariótipo e a outra a classe fenotípica. A primeira ANCOVA (com o cariótipo) não detectou efeito do cariótipo ou de suas interações com outras variáveis sobre o número de pintas. Já a segunda ANCOVA (com a classe fenotípica) revelou o efeito da classe fenotípica e de suas interações com a temperatura e o sexo sobre o número de pintas das estirpes (Tabelas III.1 e III.2).



Temperatura (°C)

Figura III.1. Número médio de pintas por estirpe e temperatura: a) em fêmeas; b) em machos. Linhas cheias: **PC0**; linhas pontilhadas: **PA0**.



Temperatura (°C)

Figura III.2. Número médio de pintas por estirpe e temperatura: a) em fêmeas; b) em machos. Linhas cheias: **fenótipos escuros** ou **intermediários escuros**; linhas pontilhadas: **fenótipos claros** ou **intermediários claros**.

Tabela III.1. Resultados da ANCOVA para o número de pintas

	GL	F	P
Temperatura	1	881,870	<0,001
Sexo	1	0,928	0,336
Cariótipo	1	1,417	0,234
Temperatura x Sexo	1	0,026	0,873
Cariótipo x Temperatura	1	0,782	0,377
Sexo x Cariótipo	1	1,815	0,178
Estirpe (Cariótipo)	6	121,609	<0,001

Tabela III.2. Resultados da ANCOVA para número de pintas, com classe fenotípica.

	GL	F	P
Temperatura	1	894,518	<0,001
Sexo	1	1,116	0,291
Classe Fenotípica	3	12,096	<0,001
Temperatura x Sexo	1	0,006	0,938
Classe Fenotípica x Temperatura	3	5,179	0,001
Sexo x Classe Fenotípica	3	3,096	0,026
Estirpe (Classe Fenotípica)	4	32,701	<0,001

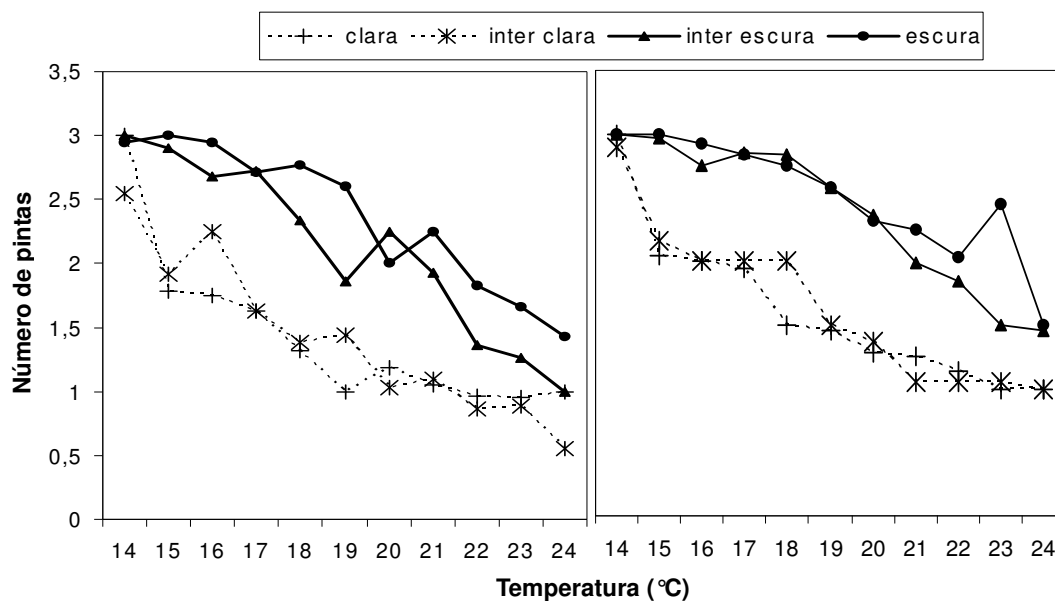


Figura III.3. Curvas médias de resposta por classe fenotípica, em fêmeas (esquerda) e machos (direita).

Para descrever a variação dos dois grupos de classes fenotípicas (*clar+intclar* e *esc+intesc*) foram ajustadas equações quadráticas que se mostraram satisfatórias. Os valores de r^2 obtidos para estas regressões quadráticas, nos dois casos, foram elevados (0,94 e 0,95 para fêmeas e machos do grupo incluindo as claras; e 0,99 e 0,99 para fêmeas e machos do grupo incluindo as escuras) todos altamente significativos ($P < 0,001$). Os coeficientes das equações que descrevem a variação em cada sexo e cada grupo estão na Tabela III.3.

Dentro de cada grupo, para quaisquer parâmetros da equação, não houve diferenças significativas entre sexos. Entretanto, o coeficiente de curvatura (*c*) foi significativamente negativo para o grupo claro, mostrando que o fenômeno é não-linear e a curva é côncava. Em contraste, o grupo escuro mostrou coeficiente de curvatura significativamente positivo, bem como significativamente diferente do grupo claro (não há sobreposição dos intervalos de confiança) evidenciando uma resposta não-linear e com curvatura convexa. Assim, foi possível detectar dois padrões distintos de resposta à variação de temperatura. (Figuras III.4 e III.5)

Tabela III.3. Parâmetros estimados (e intervalos de confiança a 95%), por fenótipo e sexo, por regressões quadráticas seguindo a equação $P = a + bT + cT^2$, onde P é o número de pintas e T a temperatura.

		GRUPO CLARO	GRUPO ESCURO
		(<i>clara + inter. clara</i>)	(<i>escuro + inter. escuro</i>)
Fêmeas	a	11,291 (6,681-15,900)	2,288 (-0,050)-(4,625)
	b	-0,893 (-1,387)-(-0,398)	0,188 (-0,0623)-(0,4393)
	c	0,019 (0,006-0,0321)	-0,010 (-0,0163)-(-0,0031)
Machos	a	10,592 (6,362-14,821)	1,024 (-0,774-2,821)
	b	-0,789 (-1,242)-(-0,335)	0,314 (0,121-0,507)
	c	0,016 (0,0043-0,0281)	-0,012 (-0,017)-(-0,0072)

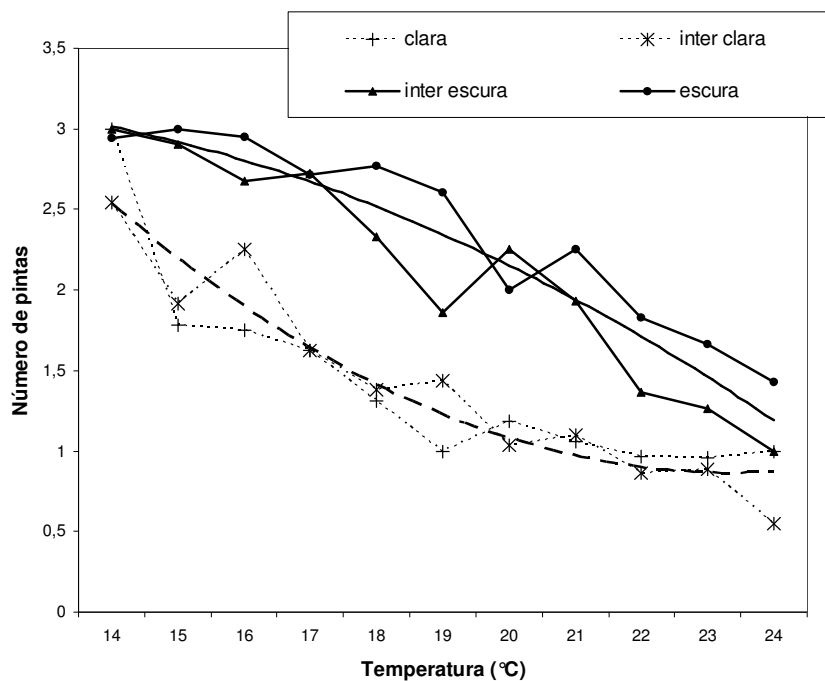


Figura III.4. Curvas médias de resposta do número de pintas das fêmeas à variação de temperatura para as quatro classes fenotípicas, com linhas de tendência para cada grupo fenotípico de duas classes.

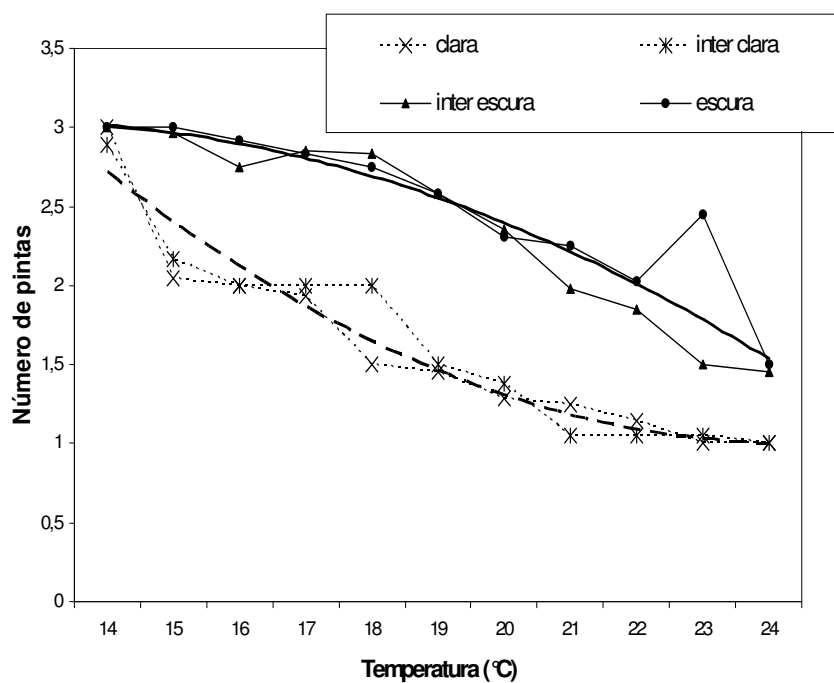


Figura III.5. Curvas médias de resposta do número de pintas dos machos à variação de temperatura para as quatro classes fenotípicas, com linhas de tendência para cada grupo fenotípico de duas classes.

É interessante notar que houve apenas dois tipos de norma de reação, sendo os dois quadráticos e diferindo na convexidade da curva que explicou cada tipo de resposta. As oito estirpes se agruparam dentro de cada uma dessas respostas em dois grupos de quatro estirpes. Mesmo para as classes fenotípicas intermediárias não houve um padrão de resposta intermediário.

III.1.1.b. Taxa de desenvolvimento:

A transformação do tempo de desenvolvimento de cada indivíduo em taxa ou velocidade de desenvolvimento, através da razão 1/tempo de desenvolvimento, revelou um contraste com os resultados relativos ao número de pintas. A primeira ANCOVA detectou uma influência significativa do cariótipo e de sua interação com a temperatura, que indica que houve respostas diferentes ao gradiente térmico por parte das duas inversões utilizadas. Isto foi diferente do observado para o número de pintas, onde não houve efeito do cariótipo (Tabela III.4).

Tabela III.4. Resultados da ANCOVA para a taxa de desenvolvimento.

	GL	F	P
Temperatura	1	12164,337	<0,00001
Sexo	1	0,299	0,5844
Cariótipo	1	11,655	0,0006
Temperatura x Sexo	1	0,674	0,4116
Cariótipo x Temperatura	1	17,556	0,00003
Sexo x Cariótipo	1	0,819	0,3655
Estirpe (Cariótipo)	6	8,848	<0,00001

A segunda ANCOVA revelou uma influência significativa da classe fenotípica sobre a média da taxa de desenvolvimento das estirpes e sua resposta ao gradiente térmico, indicada pela interação significativa com a temperatura. Novamente, não foi detectada influência do sexo como variável isolada ou em interação com outras (Tabela III.5).

Tabela III.5. Resultados da ANCOVA para taxa de desenvolvimento, com classe fenotípica.

	GL	F	P
Temperatura	1	12319,4	<0,00001
Sexo	1	0,8786	0,3487
Classe Fenotípica	3	6,9489	0,00012
Temperatura x Sexo	1	1,404	0,236
Classe Fenotípica x Temperatura	3	8,7671	<0,00001
Sexo x Classe fenotípica	3	0,5838	0,6256
Estirpe (Classe fenotípica)	4	13,4331	<0,00001

Apesar das ANCOVAs terem detectado influência significativa tanto do cariótipo como da classe fenotípica sobre a taxa média de desenvolvimento e as respostas das estirpes ao gradiente, não foi possível detectar nenhum padrão claro de diferenças geradas por estas variáveis pela observação das normas de reação das estirpes, como ocorreu no caso do número de pintas, devido à alta sobreposição entre as curvas resultantes de cada estirpe tanto em fêmeas como em machos (Fig. III.6 a e b).

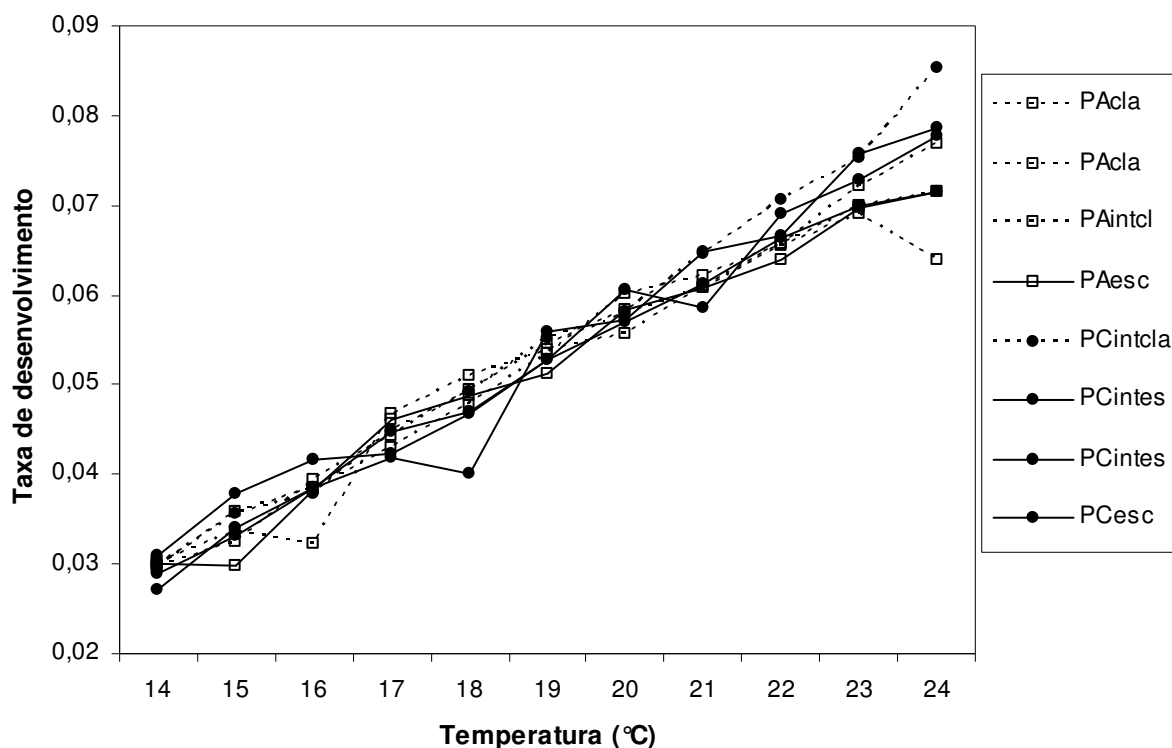


Figura III.6. a). Taxa média de desenvolvimento em fêmeas, por estirpe e temperatura.

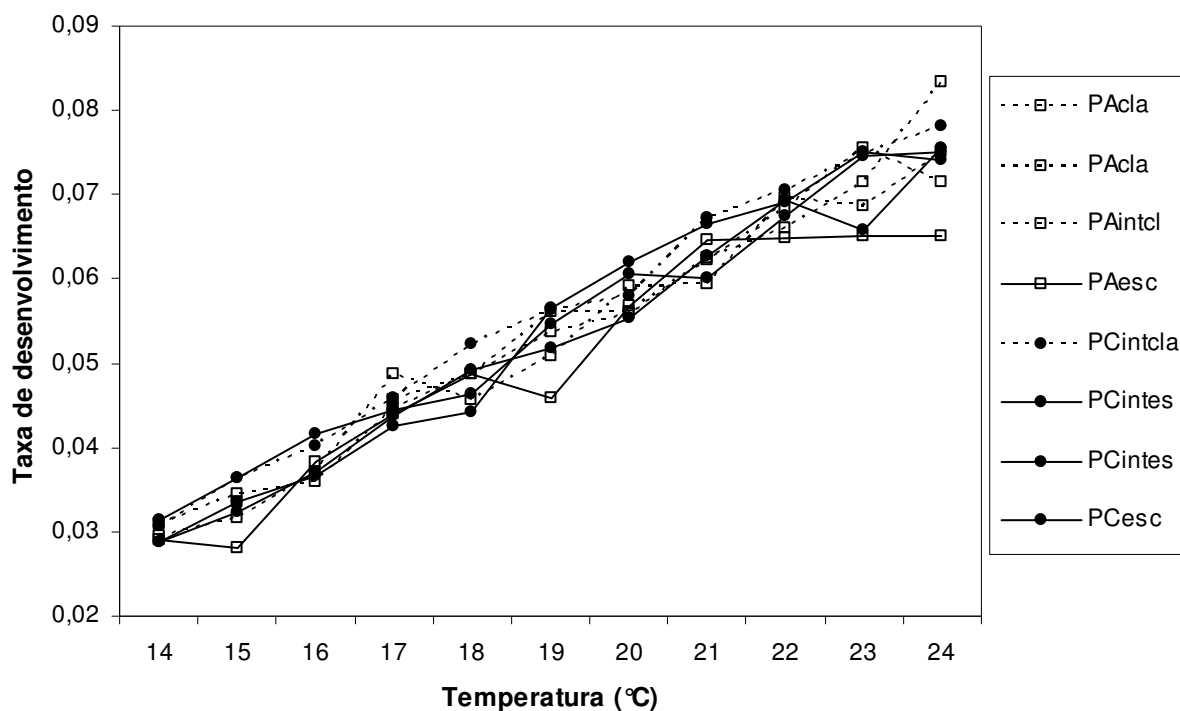


Figura III.6. b). Taxa média de desenvolvimento em machos, por estirpe e temperatura.

A partir das médias gerais por cariótipo foi possível observar que não houve diferença significativa entre as médias das fêmeas de cada cariótipo. Já a média da taxa de desenvolvimento dos machos homocariotípicos para *PA0* foi significativamente menor que a média dos machos homocariotípicos para *PC0*, o que demonstra um desenvolvimento mais rápido nas estirpes com a inversão *PC0* em relação a *PA0* (Tabela III.6).

Tabela III.6. médias gerais e intervalos de confiança de 95% em fêmeas e machos, por cariótipo.

		média	N	Min	Max
fêmeas	PA	0,053446	297	0,051937	0,054955
	PC	0,054281	283	0,052524	0,056038
machos	PA	0,051373	251	0,049579	0,053167
	PC	0,054829	303	0,053078	0,05658

As médias gerais por classe fenotípica revelaram, assim como para as médias gerais por cariótipo, diferenças significativas somente em machos: os fenótipos intermediários tiveram desenvolvimento mais rápido que os outros dois classes fenotípicas (claro e escuro), sendo a classe fenotípica intermediário claro aquele com desenvolvimento mais rápido (Tabela III.7).

Tabela III.7. Médias gerais das taxas de desenvolvimento em fêmeas e machos, por classe fenotípica, $\pm$ erro-padrão (n).

	Clara	Inter Clara	Inter Escura	Escura
Fêmeas	0,0543 $\pm$ 0,00106 (145)	0,0535 $\pm$ 0,00115 (170)	0,0549 $\pm$ 0,00123 (139)	0,0525 $\pm$ 0,00126 (126)
Machos	0,0516 $\pm$ 0,00123 (135)	0,0557 $\pm$ 0,00113 (146)	0,0545 $\pm$ 0,00135 (144)	0,0506 $\pm$ 0,00140 (129)

Para as curvas de resposta por cariótipo ou classe fenotípica, em todos os casos, as regressões descritas por polinômios de segundo grau geraram parâmetros **c** que não eram significativamente diferentes de zero, indicando que as regressões lineares eram suficientes para explicar as variações observadas.

Apesar da diferença significativa entre as taxas médias dos machos de cada cariótipo, os parâmetros estimados das regressões lineares de cada cariótipo não foram significativamente diferentes neste sexo. Somente nas fêmeas houve diferença nos dois parâmetros da equação. Em **a** que determina o valor de y quando x é igual a 0, e pode ser interpretado como um indicador do mínimo valor da taxa de desenvolvimento, e em **b**, a inclinação da reta que descreve a equação, e que pode ser interpretado como um indicador da plasticidade (Tabela III.8).

Tabela III.8. Parâmetros estimados a partir da regressão linear por sexo e cariótipo.

		a	b
Fêmeas	PA0	-0,03068 $\pm$ 0,00307	0,00435 $\pm$ 0,000159
	PC0	-0,03917 $\pm$ 0,00209	0,00487 $\pm$ 0,00010
Machos	PA0	-0,03602 $\pm$ 0,00265	0,00465 $\pm$ 0,000137
	PC0	-0,03650 $\pm$ 0,00170	0,00474 $\pm$ 0,00008

Já no caso dos parâmetros estimados para as classes fenotípicas, houve uma diferença significativa entre as estimativas do parâmetro **a** para as fêmeas, em que as

intermediárias apresentaram os menores valores. Neste mesmo sexo, as estimativas do parâmetro **b** não apresentaram diferenças significativas, com exceção da classe clara, que teve o menor valor deste parâmetro, sendo diferente das classes intermediárias. Nos machos, não houve diferença entre os parâmetros estimados, apesar da diferença nas médias gerais (Tabela III.9.a e b). Tanto no caso das normas de reação por cariótipo, como por classe fenotípica, todas as curvas apresentaram alta similaridade, não sendo possível fazer nenhuma separação entre elas que permitisse extrair um padrão razoável para explicar os resultados obtidos a partir das ANCOVAs (Figuras III.7.a e b e III.8.a e b).

Tabela III.9.a). Parâmetros estimados a partir da regressão linear por classe fenotípica, em fêmeas.

	a	b
Claras	-0,0269 ± 0,00418	0,00415 ± 0,0002
Intermed Claras	-0,04137 ± 0,00350	0,00501 ± 0,000182
Intermed Escuras	-0,03894 ± 0,00317	0,004805 ± 0,00016
Escuras	-0,03245 ± 0,002135	0,00448 ± 0,000110

Tabela III.9.b). parâmetros estimados a partir da regressão linear por classe fenotípica, em machos.

	a	b
Claras	-0,03510 ± 0,00349	0,00461 ± 0,00018
Intermed Claras	-0,03719 ± 0,002375	0,004838 ± 0,000123
Intermed Escuras	-0,039202 ± 0,00290	0,00484 ± 0,00015
Escuras	-0,03303 ± 0,00458	0,00449 ± 0,00023

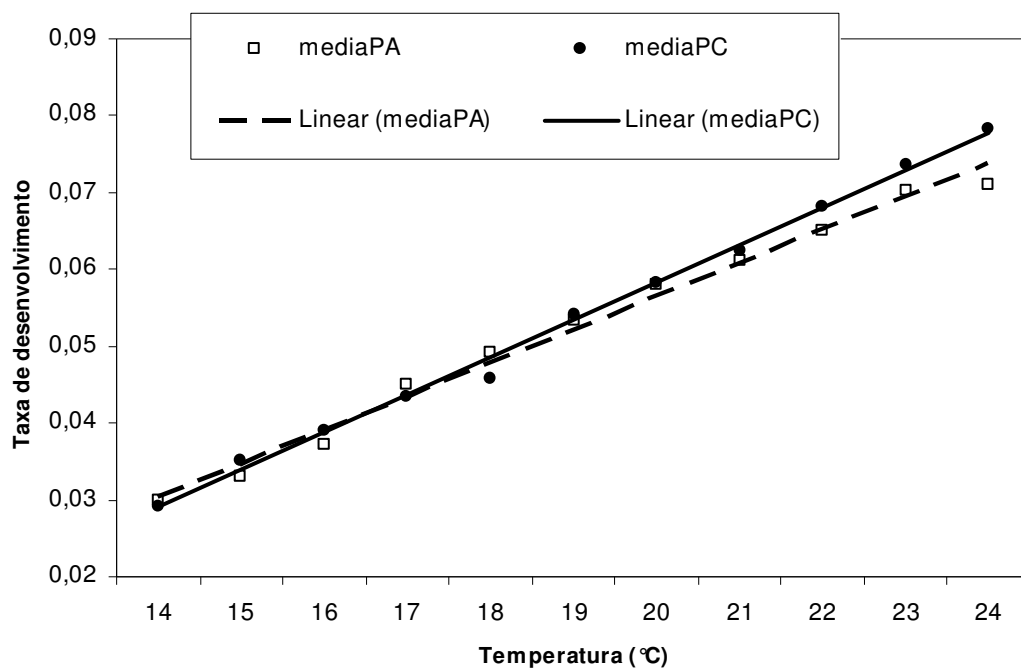


Figura III.7.a. Taxa média de desenvolvimento em fêmeas, por cariótipo e temperatura. Linhas de tendência por cariótipo, representando as regressões lineares estimadas.

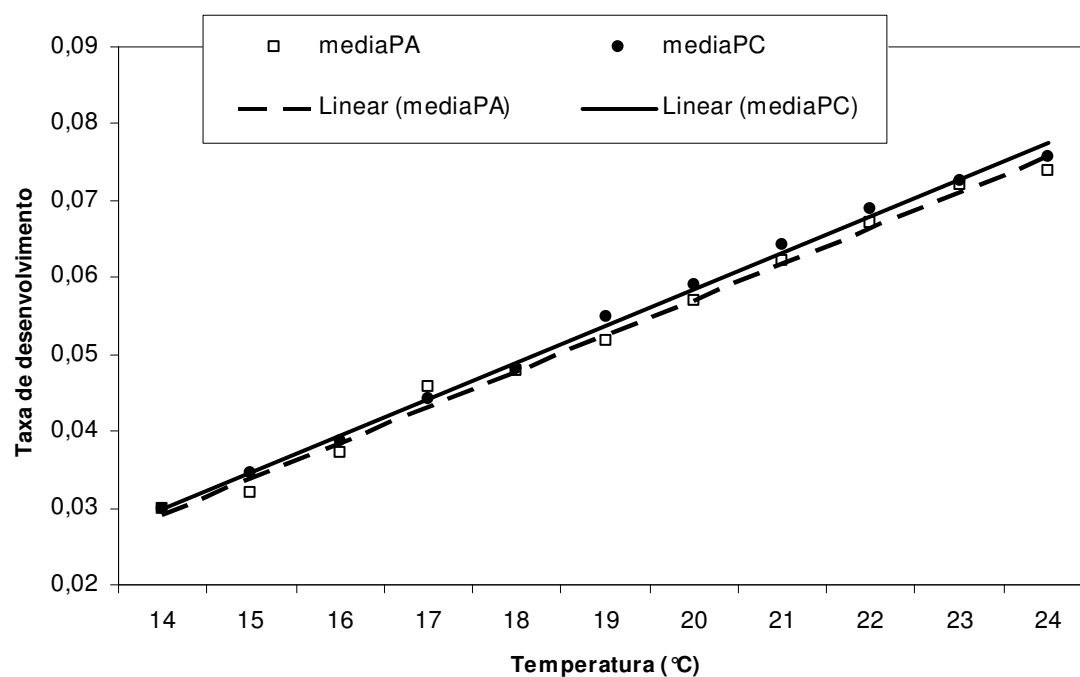


Figura III.7.b. Taxa média de desenvolvimento em machos, por cariótipo e temperatura. Linhas de tendência por cariótipo, representando as regressões lineares estimadas.

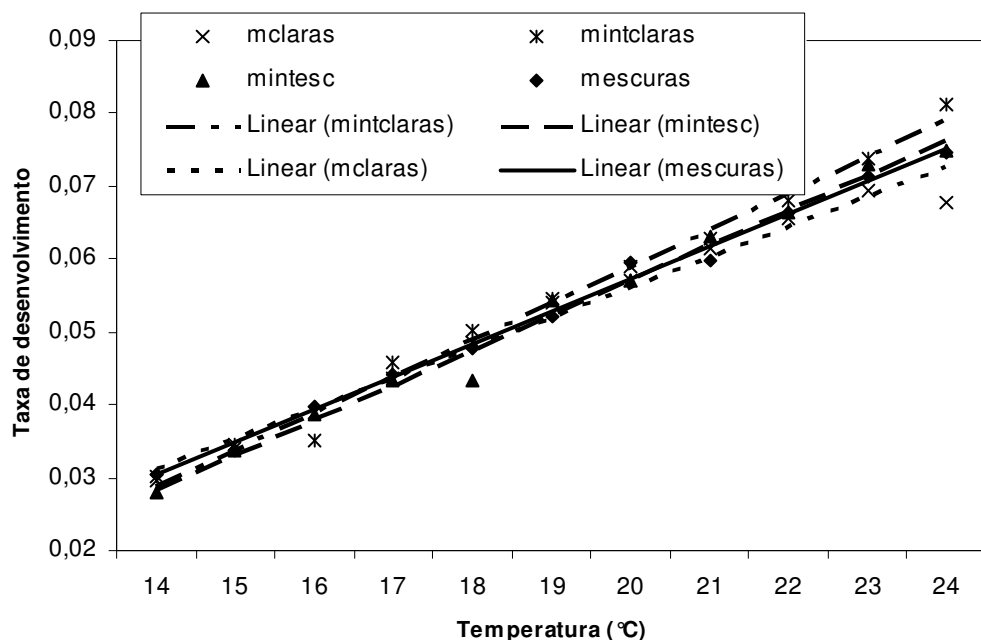


Figura III.8.a. Taxa média de desenvolvimento em fêmeas, por classe fenotípica e temperatura. Linhas de tendência representando as regressões lineares para cada classe fenotípica.

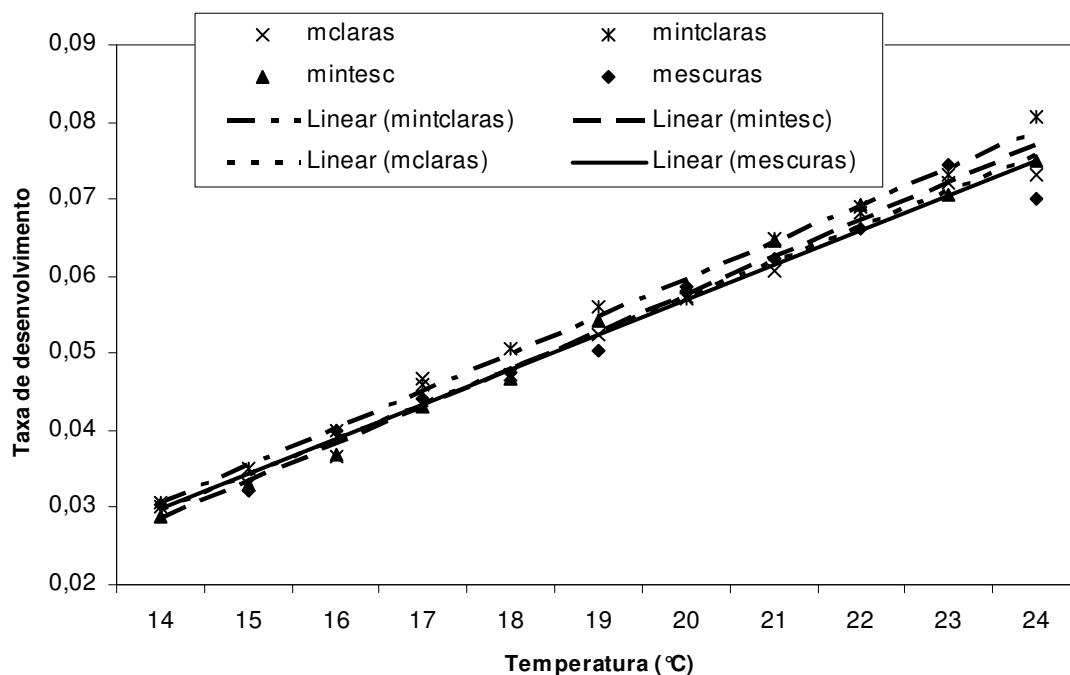


Figura III.8.b. Taxa média de desenvolvimento em machos, por classe fenotípica e temperatura. Linhas de tendência representando as regressões lineares para cada classe fenotípica.

III.1.2. Experimento de Transferência de temperaturas

O tempo de desenvolvimento da maioria dos indivíduos mantidos a 20°C foi de 15 dias. Entre a oviposição e a fase larval foram consumidos aproximadamente 47% do tempo total de desenvolvimento; a fase de pupa correspondeu aos 53% restantes.

Os tratamentos controle (que passaram 100% ou 0% do tempo a 16,5°C) produziram indivíduos com fenótipos significativamente diferentes no caso das fêmeas (2,5 pintas para 100% e 1,38 para 0% do tempo a 16,5°C), mas não nos machos, provavelmente devido ao número baixo de indivíduos obtidos neste sexo (Tabela III.10). Houve, portanto, variação entre os tratamentos extremos, indicando que as temperaturas utilizadas foram suficientes para produzir fenótipos significativamente diferentes. Uma vez que a diferença observada só foi comprovada no caso das fêmeas, a seqüência da análise quantitativa só foi feita neste sexo.

Tabela III.10. Resultados dos testes t para o número de pintas para fêmeas e machos.

	T	GI	P
Fêmeas	-4,392	8,3	0,002
Machos	-1,827	2,9	0,170

Como resultado da ANOVA do número de pintas foi observada uma influência altamente significativa da fase em que foi feita a transferência para 16,5°C nas fêmeas ($F= 5,27$; g.l.= 5, 125; $P= 0,0002$). O teste *a posteriori* de Tukey detectou diferenças par a par entre os vários tratamentos. Nas fêmeas, foi detectado um agrupamento entre os adultos e a fase pupa 3, em que foi observada a primeira diminuição do valor do fenótipo médio obtido.

As médias dos animais que passaram de 0 a 67% do tempo a 20°C apresentaram pouca flutuação, o que equivale às fases *ovo*, *larva1*, *larva2*, *pupa1* e *pupa2*. Na fase *pupa 3*, houve uma queda no valor das médias de machos e fêmeas, aproximando-se dos valores obtidos para os indivíduos que se desenvolveram completamente a 20°C (*imago*). Já as médias dos machos começaram a diminuir a partir da fase *pupa2*, ainda que o erro padrão desta fase tenha sobreposição com a média da fase anterior.

O período no qual a temperatura age sobre a determinação do número de pintas em *D. mediopunctata* se encontra, portanto, na última parte da fase pupal, o que pode ser observado pelos resultados da análise quantitativa feita com as fêmeas. Os dados dos

machos, apesar de não terem sido submetidos à análise quantitativa, reforçam esta conclusão, já que acompanham o padrão observado nas fêmeas (Figuras III.9 e III.10).

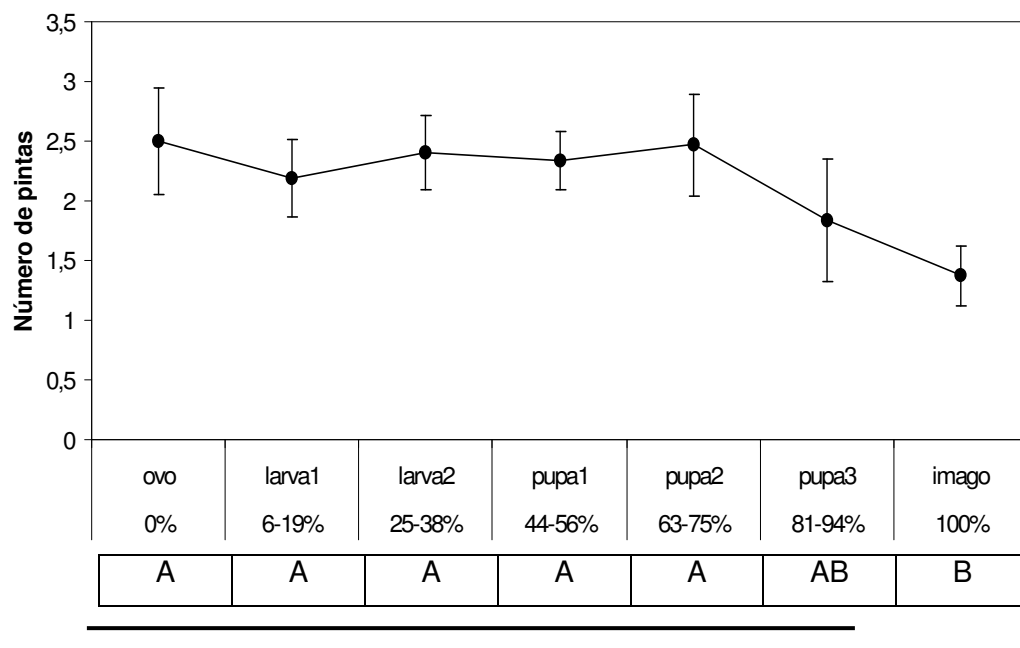


Figura III.9. Número médio de pintas das fêmeas, por estágio de desenvolvimento e percentagem do tempo total até a transferência de 20° C para 16,5° C, ± 2 erros-padrão, com agrupamento resultante do teste de Tukey. Fases ligadas por uma linha (têm a mesma letra) não são significativamente diferentes ao nível de 5%.

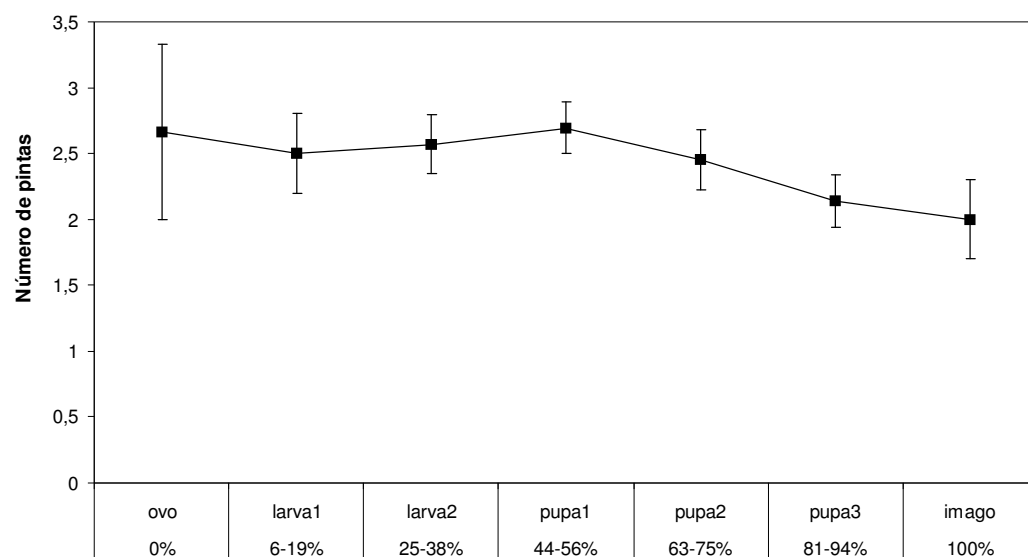


Figura III.10. Número médio de pintas dos machos, por estágio de desenvolvimento e percentagem do tempo total até a transferência de 20° C para 16,5° C, ± 2 erros-padrão.

III.2. Herdabilidade.

III.2.1. Primeiro conjunto de estimativas.

III.2.1.a. Tamanho do tórax:

As estimativas de herdabilidade do tórax estão na Tabela III.11. Elas foram, em geral, baixas (aproximadamente 10%) e não significativas. Apenas duas regressões relativas a esta característica apresentaram valores significativos, sendo uma delas a mais alta obtida (20,2%), entre filhos e mãe e a outra entre filhos e média entre pai e mãe.

Tabela III.11. Estimativas de herdabilidade relativas ao tamanho do tórax de filhos e filhas, nos três tratamentos e tipos de regressão, $\pm$ erro padrão.

Tórax	Mãe	Pai	Média
20° C			
Filhos	12,40% $\pm$ 9,40% p=0,189	10,20% $\pm$ 6,20% p=0,104	15,80%$\pm$6,40% P=0,015
Filhas	10,60% $\pm$ 11,00% p=0,341	6,40% $\pm$ 7,60% p=0,393	4,80% $\pm$ 7,80% P=0,535
18° C			
Filhos	20,20%$\pm$9,80% p=0,040	4,00% $\pm$ 6,60% p=0,550	9,30% $\pm$ 7,00% p=0,191
Filhas	-4,00% $\pm$ 10,20% p=0,703	6,20% $\pm$ 6,80% p=0,359	4,00% $\pm$ 7,30% p=0,585
Campo			
Filhos	-3,00% $\pm$ 10,00% p=0,757	-7,00% $\pm$ 6,80% p=0,305	-6,60% $\pm$ 6,30% p=0,298
Filhas	11,60% $\pm$ 11,60% p=0,322	13,40% $\pm$ 7,00% p=0,056	14,20% $\pm$ 7,90% p=0,076

O tamanho médio do tórax de filhos e filhas criados no campo foi maior que o de seus irmãos e irmãs criados a 20°C, mas semelhantes aos dos animais criados a 18°C no laboratório (Fig. III.11). Além disso, o tamanho dos pais trazidos do campo foi menor que o tamanho dos filhos de todos os tratamentos. Isto sugere que a temperatura no campo à época da criação dos filhos deve ter sido próxima de 18°C, e pode ter sido maior na época da coleta de abril de 2005.

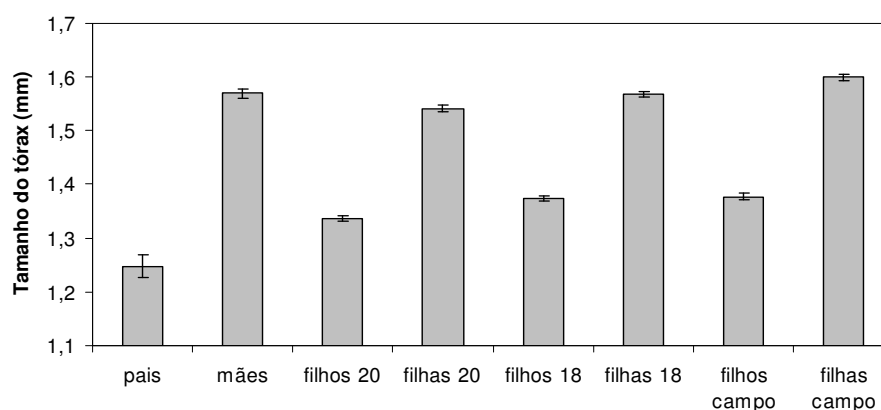


Figura III.11. Tamanho médio do tórax de pais e mães, filhos e filhas sob três tratamentos, $\pm$ 2 erros-padrão.

III.2.1.b. Número de pintas

Contrastando com os resultados relativos ao tamanho do tórax, as estimativas de herdabilidade para o número de pintas foram quase todas altas e significativas (Tabela III.12). Ainda assim, houve variação nos valores obtidos, que variaram de 30% a 69%. Houve variação entre tratamentos, com diferenças entre filhos e filhas: os valores relativos aos filhos aumentaram do tratamento de 20°C para o tratamento do campo, já para os valores relativos às filhas não houve um padrão claro. Também houve variação entre os diferentes tipos de regressão (por mãe, pai e média).

Uma diferença marcante pôde ser observada entre sexos. Somente em um caso, no tratamento campo e na regressão por pais, a estimativa relativa aos filhos foi superior à obtida para as filhas, porém, neste caso, a estimativa das filhas não foi significativa. Em todos os outros casos as estimativas de herdabilidade relativas às filhas foram maiores que aquelas obtidas em relação aos filhos (Tabela III.12).

Tabela III.12. Estimativas de herdabilidade para o número de pintas abdominais para os diferentes tratamentos e combinações de valores (mãe = regressão sobre o fenótipo das mães; pai= regressão sobre o fenótipo dos pais; média= regressão sobre o fenótipo médio entre pai e mãe). Valores significativos ($p<0,05$) em negrito.

Pintas		Mãe	Pai	Média
20° C	Filhos	32,20%±9,40% $p=0,001$	23,80%±12,80% $p=0,066$	30,00%±9,80% $p=0,003$
	Filhas	41,60%±11,20% $p<0,001$	67,40%±15,20% $p<0,001$	58,50%±11,20% $p<0,001$
18° C	Filhos	40,20%±8,80% $p<0,001$	37,20%±12,20% $p=0,003$	42,10%± 8,90% $p<0,001$
	Filhas	58,80%±11,40% $p<0,001$	59,80%±15,40% $p<0,001$	68,80%±12,30% $p<0,001$
Campo	Filhos	58,20%±10,00% $p<0,001$	42,00%±14,60% $p=0,005$	50,10%±10,50% $p<0,001$
	Filhas	64,80%±15,80% $p<0,001$	29,20%±23,60% $p=0,221$	52,50%±17,30% $p=0,003$

A média de pintas dos pais (1,63 pintas) foi significativamente menor que as médias dos filhos dos três tratamentos, o que condiz com a possibilidade de os pais terem se desenvolvido em ambiente mais quente que todos os filhos. Já a média das mães, que foram criadas a 18°C, foi superior à média das filhas criadas a 20°C, porém foi inferior às médias dos outros dois tratamentos. Curiosamente, as médias dos filhos dos tratamentos de 18°C e do campo se sobrepuseram, do mesmo modo que as médias das filhas destes dois tratamentos, evidenciando que o desenvolvimento no campo deve ter submetido os filhos deste tratamento a temperaturas próximas a 18° C. Em relação aos dados dos filhos destes dois tratamentos, não houve diferença perceptível nos valores das médias, mas na

distribuição dos dados ao redor das médias, como pode ser observado pela maior variância encontrada nos dados dos filhos e filhas do tratamento do campo (Fig. III.12).

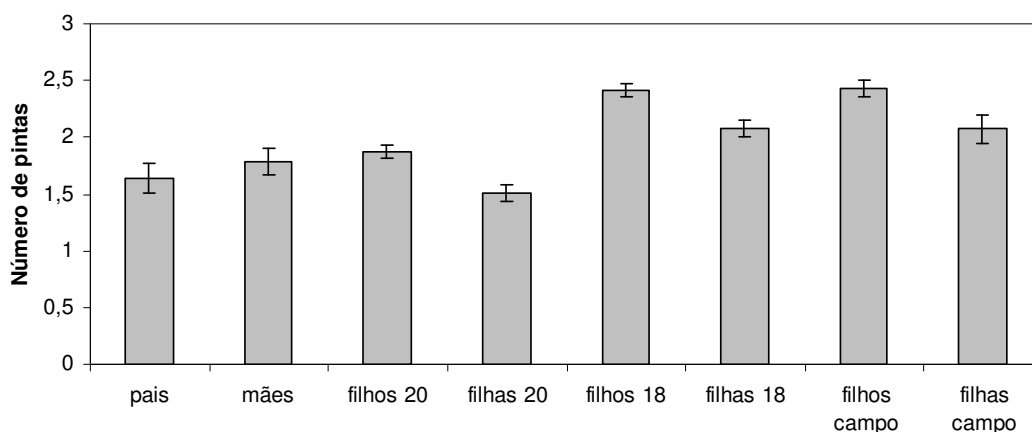


Figura III.12. Número médio de pintas de pais e mães, filhos e filhas ao longo dos três tratamentos, ± 2 erros-padrão.

III.2.2. Segundo conjunto de estimativas:

Apesar do pequeno número de fêmeas coletadas em outubro, foi possível obter uma estimativa de herdabilidade significativa no caso da regressão feita entre as médias dos filhos e os valores das mães (Tabela III.13). O valor encontrado se aproxima daquele obtido na estimativa correspondente ($40,20\% \pm 8,80\%$) do primeiro conjunto de estimativas (Tabela III.12). Porém, para a regressão das médias das filhas sobre os valores das mães, o valor obtido foi baixo e não significativo, o que contrasta com os valores obtidos anteriormente.

Tabela III.13. estimativas de herdabilidade $\pm$ erro padrão, pela regressão de filhos e filhas sobre as mães.

	$h^2 \pm EP$	p
Filhos	$32,00\% \pm 11,40\%$	0,009
Filhas	$16,40\% \pm 17,20\%$	0,349

IV. Discussão.

IV.1. Plasticidade fenotípica.

IV.1.1. Experimento de Norma de Reação:

IV.1.1.a. Número de pintas abdominais:

Efeito da temperatura.

A pigmentação abdominal de todas as estirpes submetidas ao gradiente térmico apresentou a mesma resposta básica à variação de temperatura: o número de pintas diminuiu monotonamente à medida que a temperatura aumentou de 14 para 24°C. Assim, pode-se dizer que houve, em todas as estirpes, uma diminuição do grau de pigmentação como resposta ao aumento da temperatura de desenvolvimento. Padrões semelhantes de resposta já foram observados em *Drosophila*, e estudos mais detalhados sobre a norma de reação de pigmentação já foram feitos em *D. melanogaster*, *D. simulans* (Gibert *et al.*, 1996; Gibert *et al.*, 2004; Pétavy *et al.*, 2002) e *D. kikkawai* (Gibert *et al.*, 1999a). Nas duas primeiras espécies, porém, houve homogeneidade na forma das normas de reação obtidas, quando se considerava o mesmo segmento abdominal. Já no caso de *D. kikkawai*, foi observada grande variação entre normas de reação de genótipos diferentes. No caso das normas de reação obtidas para as oito estirpes deste estudo, houve diferenças marcantes na forma como essa resposta básica ocorreu em cada estirpe, representada pelas diferentes curvas observadas.

Todas as estirpes, independentemente do cariótipo, sexo ou classe fenotípica, produziram indivíduos com os três fenótipos mais comuns (3, 2 e 1 pintas), demonstrando um alto grau de plasticidade para este caráter, independente de determinantes genéticos. É interessante notar que todas as estirpes produziram indivíduos com três pintas nas temperaturas menores (14 a 15°C), mas somente algumas produziram o fenótipo sem pintas, nas temperaturas mais altas. Tal fato pode indicar que o fenótipo menos pigmentado tenha significado diferente em relação ao outro extremo (três pintas), em termos de desenvolvimento ou adaptação. Além disso, as curvas de todas as estirpes são mais limitadas na porção inferior da variação do número de pintas do que na porção superior, indicando, talvez, uma restrição maior da plasticidade do caráter em relação aos fenótipos menos pigmentados. Em *D. falleni*, uma espécie com pigmentação abdominal sob a forma de várias pintas, Dombeck & Jaenike (2004) detectaram uma susceptibilidade duas vezes maior em indivíduos sem pintas em relação aos indivíduos pigmentados, a um

nematódeo que parasita as larvas desta espécie, evidenciando o papel dos processos relacionados à pigmentação na resposta imune nesta espécie. O processo de melanização, em insetos, além de estar envolvido na pigmentação tem papel importante como uma parte da resposta imune a invasores, além de estar envolvido nos processos de cicatrização de ferimentos (Sugumaran, 2002, Takehana, 2002). Desta forma, indivíduos sem pigmentação, em espécies que apresentem pigmentação conspícua, podem ser limitados do ponto de vista de outros processos que dependam da melanização.

Cariótipo e classe fenotípica.

A amostragem utilizada neste trabalho tentava minimizar o efeito das inversões atuando diretamente sobre a norma de reação, já que há uma associação não-aleatória entre fenótipo e inversão. Desta forma buscou-se evitar o confundimento de outros genes que poderiam estar “presos” dentro da inversão e atuando simultaneamente sobre a norma de reação. Neste sentido fomos bem sucedidos. Houve um forte contraste entre os resultados das ANCOVAs que testaram o efeito das duas variáveis de agrupamento das estirpes: o cariótipo não teve qualquer efeito significativo em relação ao número de pintas, enquanto a classe fenotípica teve efeito altamente significativo sobre o fenótipo médio e a norma de reação deste caráter. Mesmo lembrando que apesar de todas as estirpes terem produzido curvas que representam a mesma resposta básica (com diminuição da pigmentação com o aumento da temperatura), houve uma grande variação na forma como esta resposta se deu em cada estirpe.

Isto evidencia que as diferenças no número médio de pintas entre estirpes não foram determinadas pelas diferenças genéticas entre cariótipos, mas foram influenciadas pelas classes fenotípicas, que provavelmente representam genótipos para o número de pintas que podem ser encontrados em ambas as inversões *PA0* e *PC0*. As estirpes de classes fenotípicas semelhantes, portanto, devem compartilhar genes similares para o número de pintas, independentemente da inversão envolvida. Já a interação significativa entre classe fenotípica e temperatura indica que as diferenças na forma das normas de reação estiveram relacionadas à classe fenotípica.

Forma da norma de reação.

As curvas médias de resposta ao gradiente térmico, calculadas por classe fenotípica, revelaram um padrão de alta sobreposição entre as curvas de classes

fenotípicas semelhantes, gerando dois grupos distintos de norma de reação. As classes mais claras (Clara e Intermediária clara) apresentaram norma de reação que pôde ser descrita por uma parábola côncava. Já as classes mais escuras (Escura e Intermediária escura) apresentaram uma norma de reação que pôde ser descrita por uma parábola convexa.

Quando o experimento foi iniciado buscou-se a criação de classes fenotípicas extremas e intermediárias. Entretanto, uma análise *a posteriori*, induzida pelos resultados obtidos revela que na verdade as classes intermediárias são muito próximas das classes extremas. As médias dos números de pintas para os oito grupos das 4 classes (clara; intermediária clara; intermediária escura; escura) são, respectivamente: 1,01, 1,18; 1,62, 1,48; 2,71, 2,70; 2,98, 3,00 (*cf.* Material e Métodos).

Desta forma, não surpreende que as quatro classes fenotípicas se agruparam em dois grupos fenotípicos, relacionadas pela proximidade do fenótipo médio ou o grau de pigmentação que este representa. Todavia a forma completamente diferente das curvas (uma côncava e a outra convexa) não poderia ser antecipada. Entre os estudos feitos sobre norma de reação de pigmentação à temperatura, principalmente com *D. melanogaster* e *D. simulans* (Das *et al.* 1994; Gibert *et al.* 1998a Gibert *et al.* 2000; Gibert *et al.* 2004; Pétavy *et al.* 2002;) não há registro de diferenças na forma das normas de reação da pigmentação entre diferentes linhagens. Na maioria dos casos, as diferenças de forma de curva encontradas são devidas à diferença entre segmentos abdominais analisados. Assim, é possível que as diferenças encontradas entre grupos fenotípicos (com duas classes fenotípicas cada) estejam relacionadas a processos de desenvolvimento dos diferentes segmentos.

Genes, fenótipo e plasticidade.

A diferença no número médio de pintas entre classes fenotípicas, evidenciadas pelo efeito significativo desta variável, podem ser indicativas de bases genéticas diferentes entre as classes utilizadas. Já a resposta do número de pintas ao gradiente, por sua vez, ou a plasticidade do caráter, apresentou distribuição em dois grupos distintos: uma curva convexa e uma curva côncava. Apesar desta diferença na distribuição do fenótipo (em classes fenotípicas) e de sua resposta, houve um padrão de associação entre estes dois traços. Este padrão indica uma relação entre o fenótipo médio da linhagem e plasticidade, que pode ser evidência de bases genéticas semelhantes entre o fenótipo do caráter estudado e sua resposta ambiental, ou sua plasticidade. O conjunto de

genes responsável pelo fenótipo médio, portanto, parece ter relação com a forma da norma de reação, pois uma classe fenotípica comum foi sinal de uma forma de resposta comum. Dessa forma, a idéia de que os genes que determinam o caráter do traço (a quantidade de pintas ou pigmentação) sejam um conjunto independente dos genes responsáveis pela norma de reação não é reforçada pelos resultados obtidos. A discussão sobre a natureza da plasticidade fenotípica e suas respostas diretas ou indiretas à seleção natural, bem como a relação entre bases genéticas do fenótipo e da plasticidade, tem produzido vários trabalhos (Falconer, 1990; Gibert *et al.*, 1996; Gibert *et al.*, 2004; Pigliucci, 2005; Pigliucci *et al.* 2006; Scheiner, 1993;). No caso dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se dizer que há evidências de uma base genética comum para o fenótipo médio e a forma de sua norma de reação ao gradiente térmico, o que enfraquece a visão de que a plasticidade tenha bases genéticas independentes daquelas da determinação do caráter por si só.

Há vários genes reguladores e estruturais envolvidos na determinação da variação intra e interespecífica de pigmentação abdominal em *Drosophila*. Existe a possibilidade de que os mesmos genes estejam relacionados à plasticidade do caráter, apesar de as bases moleculares deste fenômeno ainda não terem sido abordadas no gênero. Os genes estruturais até agora identificados estão relacionados à síntese dos pigmentos escuros (melanina) ou claros e ao processamento de seus precursores. No caminho de síntese dos pigmentos estão envolvidos também os genes responsáveis pela transformação dos precursores dos pigmentos envolvidos. Há ainda os genes que regulam a ação dos genes estruturais: *bab*, *Abd-B* e *omb* (Brisson *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2006; Wittkopp *et al.*, 2003). Assim, há vários genes candidatos entre os que já são conhecidos a serem agentes determinantes dos padrões observados.

Plasticidade e variabilidade genética.

A observação de duas formas diferentes de norma de reação e suas relações com a classe fenotípica das estirpes possibilita uma abordagem interessante às hipóteses de seleção sobre o caráter estudado. A associação entre as inversões *PA0* e *PC0* e o número de pintas, a variação sazonal e clinal das mesmas, e o padrão de contragradiente no número de pintas observado por Hatadani (2002) sugerem uma possível e forte seleção sobre o número de pintas de *D. mediopunctata*. Padrões de contragradiente podem ser gerados por uma seleção que atue no sentido contrário à variação fenotípica, chamada de seleção antagonista. Porém, no caso de *D. mediopunctata*, uma pressão seletiva que

favorecesse os fenótipos claros em temperaturas baixas e os fenótipos escuros em temperaturas altas necessitaria de um contexto complexo para ocorrer.

Se, por outro lado, nas populações naturais estudadas, um fenótipo intermediário (entre 2 e 1 pintas por indivíduo), representando um grau intermediário de pigmentação, fosse constantemente favorecido, as linhagens com as diferentes formas de norma de reação seriam diferencialmente selecionadas de acordo com o ambiente. Em temperaturas mais baixas, com a seleção favorecendo o fenótipo intermediário, as formas claras seriam vantajosas, pois seriam as únicas a apresentarem fenótipo com valores intermediários, já que as formas escuras teriam fenótipo mais próximo a 3 pintas. Já em temperaturas mais altas, sob a mesma seleção, as formas escuras seriam favorecidas, pois nesta faixa de temperatura este grupo seria aquele a apresentar fenótipo intermediário, e as formas claras teriam fenótipo próximo ou abaixo de 1 pinta por indivíduo. Estas faixas de seleção diferencial podem ser evidenciadas pela observação dos gráficos que descrevem as curvas de resposta de cada um dos grupos citados (Fig. IV.1).

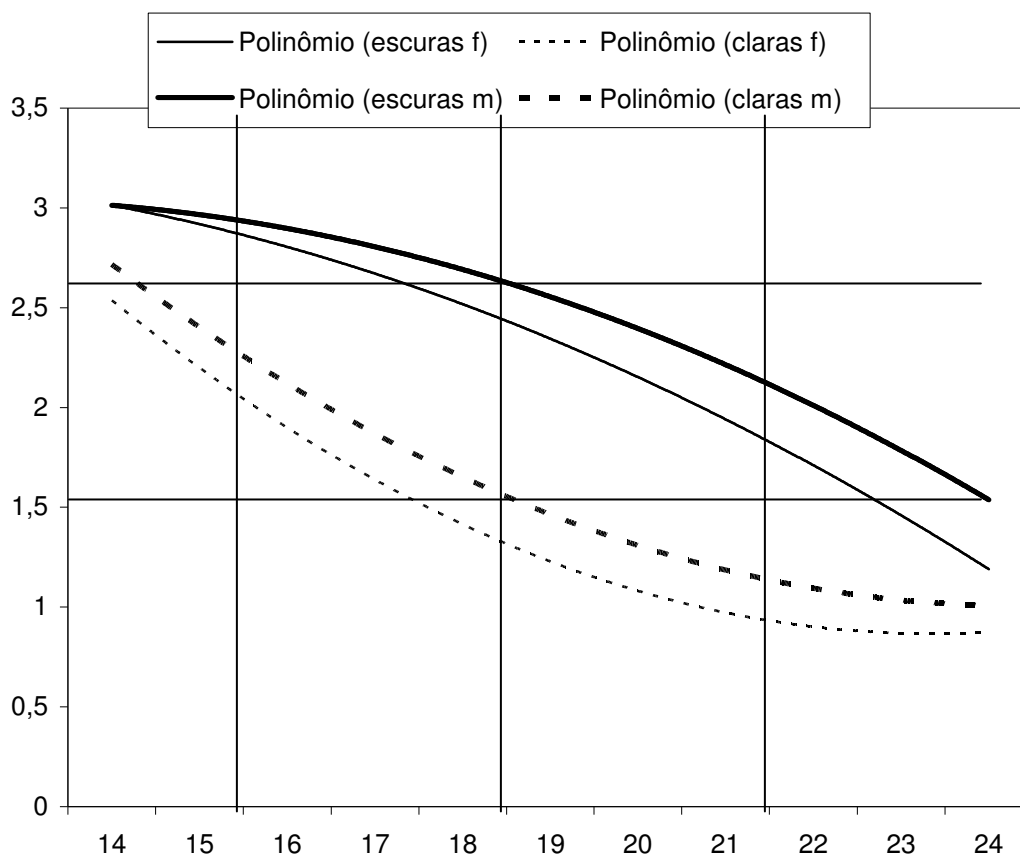


Figura IV.1. Curvas representativas das duas formas de norma de reação observadas no gradiente térmico, em fêmeas e machos. Linhas indicam as faixas de temperatura em que os dois grupos apresentam fenótipos intermediários.

Alguns mecanismos que poderiam estar envolvidos numa seleção a favor do fenótipo intermediário já foram estudados em insetos e no gênero *Drosophila*. Por exemplo, um alto custo da alta produção de melanina, pois seus precursores têm que ser absorvidos por alimentação, e a possibilidade de que a total ausência de melanina seja prejudicial a algum processo, como esclerotização, impermeabilização ou defesa do animal (Brisson *et al.*, 2005; De Gregório *et al.*, 2002; Dombeck & Jaenike, 2004; Stoehr, 2006; Sugumaran, 2002). A limitação através do custo de recursos, porém, não parece ocorrer em *D. mediopunctata*, uma vez que a densidade de larvas durante o desenvolvimento não exerce influência sobre o fenótipo final do adulto nesta espécie (Hatadani *et al.*, 2004).

IV.1.2. Tempo e taxa de desenvolvimento:

Os resultados obtidos para a taxa de desenvolvimento contrastam com aqueles descritos anteriormente, para o número de pintas. No caso desta variável, houve efeito tanto do cariótipo como da classe fenotípica, bem com das interações destas duas variáveis com a temperatura, indicando que ambas foram fontes significativas de variação da taxa média de desenvolvimento de cada estirpe e da resposta desta variável à temperatura. Também em contraste com os resultados para o número de pintas, as curvas da taxa de desenvolvimento apresentaram alta sobreposição e formas semelhantes, formando a mesma resposta: a diminuição da velocidade de desenvolvimento com o aumento da temperatura.

As análises utilizadas para tentar interpretar os efeitos do cariótipo e da classe fenotípica, porém, não foram esclarecedoras. As normas de reação por estirpe apresentaram alta sobreposição, não evidenciando nenhuma diferença clara como no caso do número de pintas. As curvas médias por cariótipo ou classe fenotípica também não revelaram separação entre estes grupos. A melhor descrição para estas curvas, nos dois casos, foi obtida por regressões lineares, cujos parâmetros não apresentaram diferenças que explicassem os efeitos detectados. Finalmente, as médias gerais, por cariótipo ou classe fenotípica, revelaram diferenças somente nos machos. Neste sexo, as estirpes homozigotas para *PC0* apresentaram desenvolvimento mais rápido, e em relação à classe fenotípica aquelas que se desenvolveram mais rápido foram as estirpes classificadas como intermediárias claras, seguidas das intermediárias escuras.

O tempo de desenvolvimento é um componente do valor adaptativo, sendo um dos traços da história de vida de *Drosophila* mais estudados (Bochdanovits & De Jong, 2003; Budnik *et al.*, 1971; James & Partridge, 1995; Knibb *et al.*, 1987; Prasad *et al.*, 2000; Sgrò & Blows, 2003; Van der Linde & Sevenster, 2006). Em *Drosophila*, o tempo de desenvolvimento durante a fase larval é fortemente selecionado no sentido da sua diminuição, pois neste período o sítio de oviposição tende a perder suas propriedades adequadas ao crescimento das larvas e estas ficam mais expostas à predação (James & Partridge, 1995). Há evidências de seleção a favor de maiores taxas de desenvolvimento em populações que ocupam temperaturas mais baixas, compensando parte do efeito fenotípico que a temperatura exerce ao aumentar o tempo de desenvolvimento e produzindo indivíduos maiores (James & Partridge, 1995; Knibb *et al.*, 1987; Prasad *et al.*, 2000; Sgrò & Blows, 2003). As informações acumuladas até o momento sugerem que a inversão *PA0* esteja acumulando genes adaptados ao frio e *PC0* acumulando genes adaptados ao calor, baseada nos trabalhos relativos à variação das freqüências destas inversões e sua associação com tamanho corporal e número de pintas (Ananina *et al.*, 2004, Hatadani *et al.* 2004). Entretanto, o possível significado da diferença encontrada entre *PA0* e *PC0* na taxa de desenvolvimento é excessivamente especulativo para entrar em detalhe.

IV.1.2. Experimento de Transferência de Temperaturas

Foi possível, a partir da análise quantitativa dos dados das fêmeas, observar que a fase em que a temperatura age sobre o fenótipo de pintas dos indivíduos encontra-se na parte final da fase pupal. Em *Drosophila*, a cada estágio larval as cutículas são trocadas, e a cutícula do último estágio é transformada no casulo da pupa. Dentro desta cutícula se forma a cutícula do adulto, o que deve ocorrer na porção final desta fase. Os animais não emergem com a cutícula pigmentada, e o pigmento é produzido na matriz extra-celular próxima às células produtoras das enzimas envolvidas, de acordo com a expressão dos genes, da mesma de forma que não se espalha por muitas células, e os pigmentos devem ser produzidos pouco antes da eclosão, durante ou logo após a mesma (Pentz *et al.* 1986, Wittkopp *et al.*, 2003). Há, portanto, uma coincidência entre a fase de influência da temperatura com a fase próxima àquela em que os processos de formação dos pigmentos estão ocorrendo na cutícula em formação. Assim, é possível que algum dos componentes dos caminhos de síntese dos pigmentos seja um fator sensível à temperatura ambiental.

Resultados semelhantes foram observados em *D. melanogaster* e *D. simulans*, com procedimento experimental similar (Chakir *et al.*, 2002).

Atualmente, há um conjunto de resultados que indicam a ação de vários genes reguladores e estruturais na determinação da variação intra e interespecífica da pigmentação em *Drosophila*, como os genes *yellow*, *tan* e *ebony*, que atuam em balanço, levando à produção de pigmentos escuros ou claros. Este balanço parece ser determinante dos padrões espaciais de pigmentação abdominal neste gênero (Drapeau *et al.*, 2006; Wittkopp *et al.*, 2002a; Wittkopp *et al.*, 2002b; Wittkopp *et al.*, 2003). Há ainda outros genes da via de síntese da melanina e genes reguladores envolvidos na produção de padrões, como *bab*, *Abd-B* e *omb* (Brisson *et al.*, 2004; Hodgetts & O'Keefe; 2006; Jeong *et al.*, 2006; Sugumaran, 2002; True *et al.*, 2005).

Porém, para tornar a generalidade das observações obtidas neste experimento mais confiável, o mesmo deve ser repetido, incluindo um tratamento recíproco e utilizando uma amostra maior, que permita o detalhamento dos resultados, sobretudo levando em consideração os resultados obtidos com os machos, onde não se detectou diferença entre os controles, provavelmente devido à amostra muito pequena.

IV.2. Estimativas de herdabilidade no campo

IV.2.1. Tamanho do tórax:

Para o tamanho do tórax, as estimativas de herdabilidade foram baixas e em geral não significativas. Resultados semelhantes para indicadores do tamanho corporal já foram observados nesta mesma espécie e em outras do gênero *Drosophila* (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999; Coyne & Beecham, 1987; Matta & Bitner-Mathé, 2004; Prout & Barker, 1989). O tamanho corporal é uma característica muito estudada em *Drosophila*, e em diferentes espécies há evidências de seleção a favor de tamanhos maiores em temperaturas menores e de tamanhos menores em temperaturas mais altas (Atkinson & Sibly 1997; Bitner-Mathé *et al.*, 1995; Bochdanovits & De Jong, 2003; David *et al.*, 2006). O padrão de variação do tamanho corporal em resposta à temperatura é conhecido como regra temperatura-tamanho, segundo a qual indivíduos maiores se desenvolvem em temperaturas menores, e indivíduos menores se desenvolvem em temperaturas mais altas. Essa variação é encontrada tanto no nível fenotípico na forma de plasticidade, como no genético, na forma de clines, sendo que os clines altitudinais e latitudinais seguem a regra de Bergmann (David *et al.* 2006). Em especial, em *D. mediopunctata* já foi

constatado cline altitudinal para tamanho (Bitner-Mathé & Klaczko, 1999), o que é um sinal de que este traço deve ter importância na sobrevivência dos indivíduos desta espécie, e poderia explicar a baixa determinação genética observada.

Outro aspecto dos resultados obtidos para o tamanho do tórax foi a consistência entre os valores deste trabalho com outros já feitos anteriormente, que reforça a idéia de que os cruzamentos e o método utilizado são eficientes para a estimativa de herdabilidade em condições mais naturais, uma vez que não foram produzidas estimativas muito diferentes entre tratamentos e entre estudos. Portanto, o uso do método que consistiu em deixar os animais se desenvolverem no campo para estimar a herdabilidade pode introduzir ao menos uma parte da variância ambiental do campo que o laboratório evita, gerando estimativas mais próximas da natureza.

IV.1.2. Número de pintas:

Contrastando com as estimativas obtidas para o tamanho do tórax, os valores de herdabilidade obtidos para o número de pintas foram todos altos e, em sua maioria, significativos, implicando a presença de alta variabilidade genética para o caráter. Houve diferenças, em alguns casos significativas, entre as estimativas de cada tratamento e entre estimativas de cada sexo no mesmo tratamento. Diferenças entre tratamentos já tinham sido observadas por Matta & Bitner-Mathé (2004) para tamanho da asa.

Em todos os casos significativos, as estimativas de herdabilidade relativas às filhas foram maiores que aquelas obtidas para os filhos, o que poderia ser sinal de influência do cromossomo X na variação do caráter. Porém, este fato pode ser devido a algum artefato estatístico ou de alguma especificidade do caráter, como uma maior variação encontrada nas fêmeas, que possibilitaria uma correspondência maior entre a distribuição das filhas e das mães, já que o caráter tem limites de variação muito restritos (de 0 a 3).

A herdabilidade pode ser definida como a proporção da variância fenotípica que é determinada pela variância genética aditiva, e serve como fator de predição da capacidade de resposta de uma população à ação de seleção sobre um determinado caráter. Assim, valores de herdabilidade altos indicam que há variação genética para o caráter e, portanto este tem potencial de apresentar resposta à seleção. A herdabilidade para o número de pintas foi alta em quase todos os casos, revelando que há variabilidade genética aditiva para o caráter e, portanto, há possibilidade de mudanças no fenótipo médio da população por ação de seleção natural. Há poucos trabalhos com estimativas de herdabilidade para pigmentação, principalmente em insetos (Gibert *et al.* 1998b ;Lee &

Wilson, 2006), apesar deste caráter ser bem estudado em algumas espécies. As estimativas obtidas neste trabalho se aproximam daquelas obtidas para *D. melanogaster*, em que foram observadas herdabilidades próximas a 50% (Gibert *et al.*, 1998b).

A evidência de alta determinação genética de um caráter pode ser interpretada, a princípio, como sinal de que se a seleção estiver atuando sobre o mesmo, deve ter baixa intensidade, ou mesmo estar ausente. Entretanto, uma alta proporção de determinação genética da variação pode ser resultado de seleção balanceada diversificadora, que manteria variabilidade genética para o traço. Um possível contexto em que uma pressão seletiva constante geraria uma seleção balanceada a partir da variação da plasticidade, num ambiente heterogêneo, foi criado a partir das normas de reação descritas para o número de pintas nesta espécie.

Assim, as hipóteses contraditórias de ausência de seleção (ou seleção fraca) e seleção balanceada são, ambas, consistentes com os resultados encontrados para a determinação genética deste caráter. Não sendo possível, portanto, refutar uma das duas hipóteses.

Independente das hipóteses causais para o grau de determinação genética do caráter, as estimativas obtidas são surpreendentes diante da plasticidade do mesmo, uma vez que estas se mantiveram robustas mesmo quando houve variação entre ambientes de pais e filhos.

Perspectivas

Os experimentos apresentados neste trabalho produziram resultados que colaboram para o estudo da variação do policromatismo de *D. mediopunctata*, levantando algumas questões que complementam aquelas já existentes anteriormente.

Há vários fatores relacionados à formação do fenótipo de pintas abdominais e sua variação nas populações naturais de *Drosophila mediopunctata* já caracterizados:

1- Animais que se desenvolvem em ambientes frios são mais escuros que animais desenvolvidos no calor, tanto no campo como no laboratório.

2- A inversão *PA0* está associada a fenótipos mais claros, enquanto a inversão *PC0* está associada a fenótipos mais escuros.

3- Estas mesmas inversões obedecem a uma variação sazonal e altitudinal numa população natural, indicando uma maior adaptação de *PA0* ao frio e de *PC0* ao calor.

4- Há evidências de que a variação genética relativa ao número de pintas ocorra, no campo, em sentido contrário à variação fenotípica para esta característica, produzindo animais mais claros no frio do que no calor, se submetidos à mesma temperatura.

Este tipo de variação, que obedece a um contragradiente, é frequentemente associado à ação de seleção, assim como a ocorrência, de polimorfismos de inversões e polimorfismos conspícuos, que também se enquadram no caso da variação estudada, criando um contexto de provável ação de seleção sobre o caráter.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho, somados às observações prévias de outros autores, geram algumas questões pertinentes à determinação genética e ambiental da pigmentação em *D. mediopunctata*. Não se sabe, por exemplo, se a plasticidade do caráter representa um subproduto de limitações fisiológicas ou uma adaptação a ambientes variáveis. Ou, ainda, se o fato de haver duas formas de resposta não seria uma adaptação diante de restrições relacionadas às formas fenotípicas deste caráter. Não foram investigadas evidências de seleção, mas foi criado um contexto que poderia explicar, de maneira relativamente simples, o padrão de contragradiente. Resta saber se há evidências de uma seleção constantemente favorecendo fenótipos intermediários. Ainda, houve evidência de uma restrição à variação em relação aos valores mais baixos, evidenciando um possível significado seletivo para o fenótipo sem pintas.

Um ponto obscuro nos resultados foi deixado pelas normas de reação da taxa de desenvolvimento, onde se detectou influência tanto das inversões utilizadas como do fenótipo de pigmentação. Mais estudos nesta área, portanto, podem esclarecer a relação entre estes fatores relacionados à temperatura ambiental, acrescentando conhecimento sobre a constituição destes arranjos e revelando novas relações entre pigmentação e desenvolvimento.

Quanto ao período de sensibilidade à temperatura em relação ao fenótipo de pintas, foi feita uma primeira aproximação, identificando a fase de desenvolvimento e a parte da mesma quando ocorre a influência da temperatura. Assim, torna-se possível um estudo mais direcionado e detalhado, que permita entender um pouco mais as bases fisiológicas e de desenvolvimento da plasticidade fenotípica.

Finalmente, foi evidenciada uma alta proporção de determinação genética para o policromatismo, sinalizando que se houver seleção sobre o caráter, há um conjunto específico de possibilidades. É possível que haja uma seleção recente ou fraca sobre o número de pintas abdominais, da mesma forma que é possível que o caráter esteja sob a ação de seleção diversificadora, que manteria variabilidade genética aditiva para o

caráter. Tal seleção pode ocorrer causada por um ambiente heterogêneo, gerando pressões seletivas variáveis ou, por outro lado, uma combinação de respostas fenotípicas variáveis e variação na plasticidade do caráter. Qual hipótese melhor explica as altas estimativas encontradas, porém, ainda resta verificar. De todo modo, parece haver uma relação entre plasticidade e determinação genética para este caráter, que pode trazer novidades para o estudo da variação fenotípica.

V. Bibliografia.

- Ananina, G. Peixoto, A.A., Bitner-Mathé, B.C., Souza, W.N., da Silva, L.B., Valente, V.L.S. & Klaczko, L.B. Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: seasonal, altitudinal, and latitudinal variation. *Gen. Biol. Mol.* 27: 61-69.
- Ananina, G., Peixoto, A.A., Souza, W.N. & Klaczko, L.B., 2002. Polytene Chromosome Map and Inversion Polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 97(5): 691-694.
- Atkinson, D. & Sibly, R.M. 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends Ecol. Evol.* 12: 235-239.
- Baldal, E.A., van der Linde, K., van Alphen, J.J.M., Brakefield, P.M. & Zwaan, B.J. 2005. The effects of larval density on adult life-history traits in three species of *Drosophila*. *Mech. Ageing Dev.* 126:407–416.
- Barker, J.S.F. & Krebs, R.A. 1995. Genetic variation and plasticity of thorax length and wing length in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii*. *J. Evol. Biol.* 8: 689-709.
- Bitner-Mathé, B.C. & Klaczko, L.B. 1998. Variation and heritability of arisal morphology in a natural population of *Drosophila mediopunctata*. *Hereditas* 128:67-71.
- Bitner-Mathé, B.C. & Klaczko, L.B. 1999b. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal and microgeographical variation. *Genetica* 105: 35-42.
- Bitner-Mathé, B.C. & L.B. Klaczko. 1999a. Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. *Genetica* 105: 203-210.
- Bochdanovits, Z. & De Jong, G. 2003. Temperature dependence of fitness components in geographical populations of *Drosophila melanogaster*: changing the association between size and fitness. *Biol. J. Linnean Soc.*: 80: 717–725.
- Brisson, J.A., De Toni, D.C., Duncan, I. & Templeton, A.R. 2005. Abdominal pigmentation variation in *Drosophila polymorpha*: Geographic variation in the trait, and underlying phylogeography. *Evolution*, 59: 1046–1059.
- Brisson, J.A., Templeton, A.R. & Duncan, I. 2004. Population Genetics of the Developmental Gene optomotor-blind (omb) in *Drosophila polymorpha*: Evidence for a Role in Abdominal Pigmentation Variation. *Genetics* 168: 1999–2010.
- Brisson, J.A., Wilder, J. & Hollocher, H. 2006. Phylogenetic analysis of the *cardini* group of *Drosophila* with respect to changes in pigmentation. *Evolution* 60: 1228–1241.
- Budnik, M., Koref-Santibañez, S. & Brncic, D. 1971. Rate of development and inversion polymorphism in *Drosophila pavani* at two temperatures. *Genetics* 69: 227-233.

- Cabanita, R. & Atkinson, D. 2006. Seasonal time constraints do not explain exceptions to the temperature size rule in ectotherms. *OIKOS* 114: 431-440.
- Cain, A.J. & Sheppard, P.M. 1950. Selection in the polymorphic land snail *Cepaea nemoralis*. *Heredity* 4: 94-275.
- Carbone, M.A., Llopart, A., deAngelis, M., Coyne, J.A. & Mackay, T.F.C. 2005. Quantitative trait loci affecting the difference in pigmentation between *Drosophila yakuba* and *D. santomea*. *Genetics* 171: 211-225.
- Cavicchi, S., Guerra, D., Natali, V., Pezzoli, C. & Giorgi, G. 1989. Temperature-related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. II. Correlation between fitness and body dimensions. *J. Evol. Biol.* 2: 235–251.
- Chakir, M., Cha, A., Gibert, P., David, J.R. 2002. Phenotypic plasticity of adult size and pigmentation in *Drosophila*: thermosensitive periods during development in two sibling species. *J. Therm. Biol.* 27: 61-70.
- Collinge, J.E., Hoffmann, A.A. & McKechnie, S. W. 2006. Altitudinal patterns for latitudinally varying traits and polymorphic markers in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *J. Evol. Biol.* 19: 473–482.
- Conover, D.O. & Schultz, E.T. 1995. Phenotypic similarity and the evolutionary significance of coutergradient variation. *Trends Ecol. Evol.* 10(6): 248-252.
- Coyne, J & Beecham, E. 1987. Heritability of two morphological characters within and among natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117: 727-737.
- da Costa, B.E.P., Rohde, C., & Valente, V.L.S., 2003. Temperature, urbanization and color polymorphism in south Brazilian populations of *Drosophila kikkawai* (Díptera, Drosophilidae) *Ineringia, Sér. Zool.* 93: 381-393.
- da Cunha, A.B. 1949. Genetic analysis of the polymorphism of color pattern in *Drosophila polymorpha*. *Evolution* 3: 239-251.
- Das, A., Mohanty, S. & Parida, B.B. 1994. Abdominal pigmentation and growth temperature in Indian *Drosophila melanogaster* : Evidence for genotype-environment interaction. *J. Biosci.* 19: 267-275.
- David, J.R., Legout, H., Moreteau, B., 2006. Phenotypic plasticity of body size in a temperate population of *Drosophila melanogaster*: when the temperature-size rule does not apply. *J. Genet.*, 85: 9-23.
- De Gregorio, E., Han, S, Lee, W., Baek, W., Osaki, T., Kawabata, S., Lee, B. Iwanaga, S., Lemaitre, B. & Brey, P.T. 2002. An Immune-Responsive Serpin Regulates the Melanization Cascade in *Drosophila*. *Dev. Cell* 3: 581–592.

- Dombeck, I. & Jaenike, J. 2004. Ecological genetics of abdominal pigmentation in *Drosophila falleni*: a pleiotropic link to nematode parasitism. *Evolution* 58: 587-596.
- Drapeau, M.D., Cyran, S.A., Viering, M.M., Geyer, P.K. & Long, A.D. 2006. A cis-regulatory sequence within the yellow locus of *Drosophila melanogaster* required for normal male mating success. *Genetics* 172: 1009–1030.
- Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. Fourth Edition. Longman Group Ltd. Edinburgh Gate, Harlow.
- Falconer, D.S. 1990. Selection in different environments: effects on environmental sensitivity (reaction norm) and on mean performance. *Genet. Res. Camb.* 56: 57-70.
- Fogleman, J. 1978. A thermal gradient bar for the study of *Drosophila*. *Drosophila Information Service*. 53: 212.
- Frota-Pessoa, O. 1954. Revision of the tripunctata group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). *Arquivos do Museu Paranaense*, n. 10, p. 253-304.
- Gibert, P., B. Moreteau, J.C. Moreteau & J.R. David, 1998b. Genetic variability of quantitative traits in a natural population of *Drosophila melanogaster* (fruit fly): analysis of wild living flies and of successive laboratory generations. *Heredity* 80: 326–335.
- Gibert, P., Capy, P., Imasheva, A., Moreteau, B., Morin, J.P., P´etavy, G. & David, J.R. 2004. Comparative analysis of morphological traits among *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: genetic variability, clines and phenotypic plasticity. *Genetica*: 120-179.
- Gibert, P., Moreteau, B. & David, J.R. 2000. Developmental constraints on an adaptive plasticity: reaction norms of pigmentation in adult segments of *Drosophila melanogaster*. *Evol. Dev.* 2:5 :249-260.
- Gibert, P., Moreteau, B. & David, J.R. 2004. Phenotypic plasticity of body pigmentation in *Drosophila melanogaster*. Genetic repeatability of quantitative parameters in two successive generations. *Heredity* 92: 499-507.
- Gibert, P., Moreteau, B., David, J.R., Scheiner, S.M. 1998a. Describing the evolution of reaction norm shape: body pigmentation in *Drosophila*. *Evolution* 52:1501-1506.
- Gibert, P., Moreteau, B., Moreteau, J.C., David, J.R. 1996. Growth temperature and adult pigmentation in two *Drosophila* sibling species: an adaptive convergence of reaction norms in sympatric populations? *Evolution* 50: 2346-2353.

- Gibert, P., Moreteau, B., Munjal, A. & David, J.R. 1999a. Phenotypic plasticity of abdominal pigmentation in *Drosophila kikkawai*: multiple interactions between a major gene, sex, abdomen segment and growth temperature. *Genetica* 105: 165-176.
- Gillespie, R.G. & Oxford, G.S. 1998. Selection on the color polymorphism in Hawaiian happy-face spiders: evidence from genetic structure and temporal fluctuations. *Evolution* 52: 775-783.
- Grill, C.P., Moore, A.J. & Brodie, E.D., 1997. The genetics of phenotypic plasticity in a colonizing population of the ladybird beetle, *Harmonia axyrids*. *Heredity* 78: 261-269.
- Gupta, A.P. & Lewontin, R.C. 1982. A study of reaction norms in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution* 36: 934-948.
- Hatadani, L.M. 2002. Polimorfismo de Coloração em *Drosophila mediopunctata*. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- Hatadani, L.M., Baptista, J.C.R., Souza, W.N. & Klaczko, L.B. 2004. Colour polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: genetic (chromosomal) analysis and nonrandom association with chromosome inversions. *Heredity* 93: 525-534.
- Heino, M., Dieckmann, U. & God, O.R. 2002. Estimating reaction norms for age and size at maturation with reconstructed immature size distributions: a new technique illustrated by application to Northeast Arctic cod. *ICES J. Mar. Sci.* 59: 562–575.
- Hodgetts, R.B. & O’Keefe, S.L. 2006. Dopa decarboxylase: A Model Gene-Enzyme System for Studying Development, Behavior, and Systematics. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 84-259.
- Hoffman, A.A., Sgró, C.M. & Weeks, A.R., 2004. Chromosomal inversion polymorphisms and adaptation. *Trends Ecol. Evol.* 19: 482-488.
- Hollocher, H., Hatcher, J.L. & Dyreson, E.G. 2000. Evolution of abdominal pigmentation differences across species in the *Drosophila dunni* subgroup. *Evolution* 54(6): 2046-2056.
- James, A.C. & Partridge, L. 1995. Thermal evolution of rate of larval development in *Drosophila melanogaster* in laboratory and field populations. *J. Evol. Biol.* 8: 315-330.
- Jeong, S., Rokas, A. & Carroll, S.B. 2006. Regulation of body pigmentation by the Abdominal-b hox protein and its gain and loss in *Drosophila* evolution. *Cell* 125: 1387–1399.
- Joron, M. 2002. Aposematic coloration. in: *Encyclopedia of insects*. Carde, R.T. & Resh, V.H. Editors. Academic Press, New York.

- Karan, D., Morin, J.P., Gibert, P., Moreteau, B., Scheiner, S.M. & David, J.R. 2000. The genetics of phenotypic plasticity. IX. Genetic Architecture, Temperature, and sex differences in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 54: 1035-1040.
- Karan, D., Morin, J.P., Gibert, P., Moreteau, B., Scheiner, S.M. & David, J.R. 2000. The genetics of phenotypic plasticity. IX. Genetic architecture, temperature, and sex differences in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 54: 1035-1040.
- Kinbb, W.R., Oakeshott, J.G. & Wilson, S.R. 1987. Chromosome inversion polymorphisms in *Drosophila melanogaster* IV. Inversion and Adh frequency changes under selection for different development times. *Heredity* 104: 59-95.
- Klaczko, L.B. 2006. Evolutionary Genetics of *Drosophila mediopunctata*. *Genetica* 126:43–55.
- Kopp, A., Duncan, I. & Carrol, S.B. 2000. Genetic control and evolution of sexually dimorphic characters in *Drosophila*. *Nature* 408: 553-559.
- Kopp, A., Graze, R.M., Xu, S., Carrol, S.B., Nuzhdin, S.V. 2004. Quantitative Trait Loci Responsible for Variation in Sexually Dimorphic Traits in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 163: 771-787.
- Lee, K.P. & Wilson, K. 2006. Melanism in a larval Lepidoptera: repeatability and heritability of a dynamic trait. *Ecol. Entomol.* 31: 196–205.
- Matta, B.P. & Bitner-Mathé, B.C. 2004. Genetic architecture of wing morphology in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: genetic variability, clines and phenotypic plasticity. *Genetica* 120: 165–179.
- Moraes, E.M. & Sene, F.M. 2004. Heritability of wing morphology in a natural population of *Drosophila gouveai*. *Genetica* 121:119-123.
- Munjal, A.K., Karan, D., Gibert, P., Moreteau, B., Parkash, R. & David, J.R. 1997. Thoracic trident pigmentation in *Drosophila melanogaster*: latitudinal and altitudinal clines in Indian populations. *Genet. Sel. Evol.* 29: 601–610.
- Oxford, G.S. & Gillespie, R. G. 1998. Evolution and ecology of spider coloration. *Annu. Rev. Entomol.* 43:619–43.
- Peixoto, A.A. & Klaczko, L.B. 1991. Linkage disequilibrium of chromosomal inversion polymorphisms of *Drosophila*. *Genetics* 129: 773-777.
- Pentz, E.S., Black, B.C. & Wright, T.R.F. 1986. A diphenol oxidase gene is part of a cluster of genes involved in catecholamine metabolism and sclerotization in *Drosophila* . I. Identification of the biochemical defect in dox-a2 [1(2)37bf] mutants. *Genetics* 112: 823-841.

- Pétavy, G., Moreteau, B., Gibert, P., David, J.R. 2002. Phenotypic plasticity of body pigmentation in *Drosophila* : influence of a developmental thermoperiodic regime in two sibling species. *Physiol. Entomol.* 27: 124-135.
- Pétavy, G., Moreteau, B., Gibert, P., Morin, J.P. & David, J.R. 2001. Phenotypic plasticity of body size in *Drosophila* : effects of a daily periodicity of growth temperature in two sibling species. *Physiol. Entomol.* 26: 351-361.
- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends Ecol. Evol.* 20: 481-486.
- Pigliucci, M., Murren, C.J. & Schlichting, C.D. 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J. Exp. Biol.* 209: 2362-2367.
- Powell, J.R. 1997. Progress and Prospects in Evolutionary Biology. The *Drosophila* Model. New York: Oxford University Press.
- Prasad, N.G., Shakarad, M., Gohil, V.M., Sheeba, V., Rajamani, M. & Joshi, A. 2000. Evolution of reduced pre-adult viability and larval growth rate in laboratory populations of *Drosophila melanogaster* selected for shorter development time. *Genet. Res. Camb.* 76: 249-259.
- Prout, T. & Barker, J.S.F. 1989. Ecological aspects of the heritability of body size in *Drosophila buzzatii*. *Genetics* 123: 803-813.
- Riska, B., Prout, T., Turelli, M. 1989. Laboratory estimates of heritability and genetic correlations in nature. *Genetics*. 123: 865-871.
- Santos, M., Fowler, K. & Partridge, L. 1994. Gene-environment interaction for body size and larval density in *Drosophila melanogaster* – an investigation of effects on development time, thorax length and adult sex-ratio. *Heredity* 72: 515–521.
- Scheiner, S.M. & Lyman, R.F. 1989. The genetics of phenotypic plasticity 1. Heritability. *J. Evol. Biol.* 2: 95-107.
- Scheiner, S.M. 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24: 35- 68.
- Sgró, C.M. & Blows, M.W. 2003. Evolution of additive and nonadditive genetic variance in development time along a cline in *Drosophila serrata*. *Evolution* 57: 1846–1851.
- Sisodia, S. & Singh, B.N. 2004. Size dependent sexual selection in *Drosophila ananassae*. *Genetica* 121: 207–217.
- Stoehr, A.M. 2006. Costly melanin ornaments: the importance of taxon? *Funct. Ecol.* 20: 276–281.

- Sugumaran, M. 2002. Comparative Biochemistry of Eumelanogenesis and the Protective Roles of Phenoloxidase and Melanin in Insects. *Pigment. Cell. Res.* 15: 2-9.
- Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Tadaka, H. & Aigaki, T. 2002. Overexpression of a pattern-recognition protein-LE, activates imd_relisch-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 13705-13710.
- True, J.R. 2003. Insect melanism: the molecules matter. *Trends Ecol. Evol.* 18: 640 -647.
- True, J.R., Yeh, S., Hovemann, B.T., Kemme, T., Meinertzhagen, I.A., Edwards, T.N. Liou, S., Han, Q. & Li, J. 2005. *Drosophila* tan Encodes a Novel Hydrolase Required in Pigmentation and Vision. *PLoS Genetics* 1: 0551-0562.
- Van Der Linde, K. & Sevenster, J.G. 2006. Local adaptation of developmental time and starvation resistance in eight *Drosophila* species of the Philippines. *Biol. J. Linnean Soc.* 87: 115-125.
- Van Dooren, T.J. M., Tully, T. & Ferrière, R. 2005. The analysis of reaction norms for age and size at maturity using maturation rate models. *Evolution* 59: 500–506.
- Watt, W.B. 1968. Adaptive Significance of Pigment Polymorphisms in *Colias* butterflies. I. Variation of Melanin Pigment in Relation to Thermoregulation. *Evolution* 22: 437-458.
- Wilder, J.A., Dyreson, E.G., O'Neil, R.J., Spangler, M.L., Gupta, R., Wilder, A.S., Hollocher, H. 2004. Contrasting modes of natural selection acting on pigmentation genes in the *Drosophila dunni* subgroup. *J. Exp. Zool. Part B* 302B: 469-482.
- Wittkopp, P.J., Carroll, S.B. & Kopp, A. 2003. Evolution in black and white: genetic control of pigment patterns in *Drosophila*. *Trends Genet.* 19: 495-504.
- Wittkopp, P.J., True, J.R. & Carroll, S.B. 2002. Reciprocal functions of the *Drosophila* Yellow and Ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns. *Development* 129: 1849-1858.
- Wittkopp, P.J., Vaccaro, K. & Carroll, S.B. 2002. Evolution of yellow Gene regulation and Pigmentation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 12: 1547–1556.
- Wittkopp, P.J., Williams, B.L., Selegue, J.E. & Carroll, S.B. 2003. *Drosophila* pigmentation evolution: Divergent genotypes underlying convergent phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 1808–1813.
- Yadav, J.P. & Singh, B.N. 2006. Evolutionary genetics of *Drosophila ananassae*. I. Effect of selection on body size and inversion frequencies. *J Zool Syst Evol Res* 44: 323–329.