

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO *Drosophila* - LEVEDURAS:
ATRAÇÃO E PRODUTIVIDADE

MURACY BÉLO

Orientador: *Margarida R. Rodrigues de Aguiar Derecin*

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em Genética
e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho, 1978

LEVEDURAS E RESPECTIVOS SÍMBOLOS USADOS NO PRESENTE TRABALHO

Símbolo	Nome científico	Símbolo	Nome científico
1-CAA	<u>Candida albicans</u>	23-KLA	<u>Kloeckera africana</u>
2-CAK	<u>Candida krusei</u>	24-LEG	<u>Leucosporidium gelidum</u>
3-CAM	<u>Candida macedoniensis</u>	25-LES	<u>Leucosporidium scottii</u>
4-CAM	<u>Candida melinii</u>	26-LES	<u>Leucosporidium stokesii</u>
5-CAM	<u>Candida muscorum</u>	27-PIE	<u>Pichia etchellsii</u>
6-CAP	<u>Candida pseudotropicalis</u>	28-PIF	<u>Pichia fermentans</u>
7-CAP	<u>Candida parapsilosis</u>	29-PIP	<u>Pichia polymorpha</u>
8-CAT	<u>Candida tropicalis</u>	30-PIV	<u>Pichia vini</u>
9-CAT	<u>Candida tenuis</u>	31-RHG	<u>Rhodotorula glutinis</u>
10-CIM	<u>Citeromyces matritensis</u>	32-RHR	<u>Rhodotorula rubra</u>
11-CRM	<u>Cryptococcus macerans</u>	33-SAI	<u>Saccharomyces italicus</u>
12-CRA	<u>Cryptococcus albidus</u>	34-SAR	<u>Saccharomyces rouxii</u>
13-DEH	<u>Debaryomyces hansenii</u>	35-SAL	<u>Saccharomycodes ludwigii</u>
14-ENB	<u>Endomycopsis bispora</u>	36-SPJ	<u>Sporidiobolus johnsonii</u>
15-HAA	<u>Hansenula anomala</u>	37-SCS	<u>Schizoblastosporion starkeyi</u>
16-HAB	<u>Hansenula beijerinckii</u>	38-TOC	<u>Torulopsis colliculosa</u>
17-HAC	<u>Hansenula canadensis</u>	39-TOD	<u>Torulopsis dattila</u>
18-HAC	<u>Hansenula californica</u>	40-TOE	<u>Torulopsis erbonii</u>
19-HAP	<u>Hansenula polymorpha</u>	41-TOP	<u>Torulopsis pinus</u>
20-HAS	<u>Hansenula saturnus</u>	42-TRA	<u>Tricosporon aculeatum</u>
21-HAV	<u>Hanseniaspora valbyensis</u>	43-TRP	<u>Tricosporon pullulans</u>
22-KHW	<u>Khuyveromyces wickerhamii</u>	44-TRV	<u>Trigonopsis variabilis</u>

Para Eunice e Gustavo

BIOGRAFIA SUMÁRIA DO AUTOR

Muracy Bélo, filho de Reginaldo da Silva Bélo e de Jacy Morari Bélo, nasceu aos 14 de fevereiro de 1946 em Olímpia (SP).

Licenciado em História Natural em 1970 pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de São José do Rio Preto, hoje Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".

Lecionou em estabelecimentos do ensino secundário oficial do Estado de São Paulo, durante os anos letivos de 1969 e 1970.

Em 1971 iniciou o curso de Pós-Graduação no Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A dissertação, intitulada "Flutuações em Uma População de Drosophila de Habitat Doméstico" foi defendida em 13 de dezembro de 1973, sendo o resultado "nota 10 , com distinção e louvor". O trabalho de Mestrado foi realizado durante vigência de bolsas da FAPESP, de 01/03/71 a 30/06/73.

Aceito no primeiro semestre de 1974 como aluno regular ao nível de Doutorado no curso de Pós-Graduação de Genética e Melhoramento de Plantas, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de

São Paulo, em Piracicaba (SP).

Contratado em 15 de agosto de 1974 como prof
fessor junto ao Departamento de Biologia Aplicada à Agro
pecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias ,
Campus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista "Ju
lio de Mesquita Filho", onde vem desenvolvendo atividades
didáticas e de pesquisa.

. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado em grande parte pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), dentro do Programa Integrado de Genética (SIP/04 - 037).

Desejo manifestar os meus agradecimentos a todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho.

À Prof^a Dra Margarida L. R. A. Perecin, que devido à sua compreensão e auxílio prestados, contribuiu para a realização desta pesquisa.

Aos Prof^{os} Dr. Ernesto Paterniani, Dr. João Lúcio Azevedo e Roland Vencovsky do Conselho do Curso de Pós-Graduação Genética e Melhoramento de Plantas, e demais Prof^{os} do referido Curso, pelo interesse sempre demonstrado pelo trabalho e incentivo.

Ao Prof^o Dr. Celso A. Mourão e demais membros do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de S.J. do Rio Preto - UNESP, pelas valiosas sugestões e auxílios prestados.

Ao Dr. Jehud Bertolozzi do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, Campus de Botucatu - UNESP, por ceder espécies de levedura isoladas do trato digestivo de moscas coletadas na região de Humaitá (AM).

Ao Dr. Pedro M. Lacava do Departamento de

Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal - UNESP, pelo auxílio prestado referente à manipulação dos microrganismos.

Ao Dr. Carlos Daghljan pelo auxílio na preparação do Summary and Conclusions.

Aos Srs. Julio Cirelli e Ademir de Oliveira Veschi pelo trabalho datilográfico.

À Dra. Therezinha A. Salomão Chefe do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária e ao Dr. Marcos A. Gianonni Diretor da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal - UNESP, pelas facilidades concedidas.

Índice	Página
1. Resumo e Conclusões.....	1
2. Introdução.....	4
3. Revisão de literatura.....	10
4. Material e Métodos.....	27
4.1. Espécies de <u>Drosophila</u>	27
4.2. Espécies de levedura.....	28
4.3. Caixa para testes de atração.....	31
4.4. Meios de cultura.....	33
4.4.1. Meio de Mittler.....	33
4.4.2. Meio para esterilização do trato diges tivo das moscas.....	34
4.4.3. Meio de Sabouraud.....	34
4.4.4. Meio de trigo-fubá.....	35
4.5. Técnica para esterilização do trato diges tivo das moscas.....	35
4.6. Experimentos.....	36
4.6.1. Experimentos da esterilização do trato digestivo das moscas.....	36
4.6.2. Experimentos de atração.....	37
4.6.3. Coletas na natureza.....	39
4.6.4. Experimentos de produtividade.....	40
4.6.5. Experimentos de produtividade em <u>Candida</u>	42
5. Resultados.....	43
5.1. Esterilização do trato digestivo das moscas...	43
5.2. Atração.....	45

5.3. Coletas na natureza.....	81
5.4. Produtividade.....	87
5.5. Produtividade em <u>Candida</u>	125
6. Discussão.....	143
7. Summary and Conclusions.....	163
8. Literatura citada.....	166

1. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho é um estudo da associação Drosophila-leveduras, quanto à atração e à produtividade. Foram utilizadas 5 espécies de Drosophila (D. ananassae, D. hydei, D. kikkawai, D. melanogaster e D. simulans) e 44 espécies de levedura, pertencentes a 19 gêneros.

Foi empregada uma técnica nova de esterilização do trato digestivo das moscas, a qual consiste em mantê-las em meio de cultura acrescido de bactericidas e fungicidas, durante 3 dias.

Foi idealizado um dispositivo para o estudo da atração. Em uma caixa são dispostas 22 garrafas de um quarto de litro, possibilitando a exposição simultânea às moscas, de até 22 espécies de levedura. As moscas são liberadas na caixa e decorrido um tempo determinado as garrafas são fechadas, contando-se o número de moscas que se dirigiram a cada levedura.

A técnica de esterilização e a caixa de

atração mostraram-se eficazes para os fins propostos. Seu emprego abre possibilidades de estudo de vários aspectos da associação Drosophila-leveduras.

Foram evidenciadas diferenças entre as espécies de Drosophila quanto à capacidade de atração das leveduras, sendo proposto um critério para distinguir diferenças qualitativas e quantitativas.

A flexibilidade dos imagos, em suas preferências alimentares, obedeceu a relação D. hydei < D. ananas < D. kikkawai = D. melanogaster < D. simulans.

Não foram encontradas evidências de efeito diferencial das leveduras na atração de fêmeas e machos.

Experimentos de atração na natureza, com iscas inoculadas com leveduras específicas, deram resultados parcialmente concordantes com hipóteses formuladas a partir de testes na caixa de atração.

Dois experimentos, realizados com agrupamentos diferentes de leveduras na caixa de atração, produziram resultados fortemente concordantes. Este fato é apontado como uma evidência, de laboratório, da existência de uma atração diferencial das espécies de Drosophila pelas leveduras empregadas.

Ocorreram diferenças acentuadas entre as espécies de Drosophila quanto à produtividade em diferentes leveduras. Entretanto, foram fracas as relações entre atração e produtividade nas mesmas leveduras, o que se apresen

ta como uma evidência, de laboratório, dos locais de criação e alimentação na natureza. Uma espécie de levedura pode atrair um grande número de indivíduos, os quais poderão ou não deixar um número grande de descendentes.

Um experimento para medida da produtividade, em 5 espécies do gênero Candida, mostrou a existência de diferentes graus de interação, não só espécie-levedura como sexo-levedura, no número e na biomassa da progênie.

Os resultados obtidos da atração e da produtividade permitiram reconhecer evidências a favor e contra o princípio da exclusão competitiva, sugerindo-se procedimentos para a abordagem desse problema.

2. INTRODUÇÃO

Castle et. alii (1906, cf. Dobzhansky et. alii 1963) foram os primeiros a usar Drosophila como um animal de laboratório e descobriram que era muito adequado para experimentos de genética. Esses autores estudaram o efeito do endocruzamento na fertilidade. Desde então as espécies de Drosophila vem sendo amplamente utilizadas em muitos estudos de genética e evolução.

A despeito do grande volume de informações acumuladas sobre a genética de Drosophila e do volume igualmente grande de trabalhos de pesquisa em genética feitos com tais moscas, comparativamente pouco se conhece a respeito da ecologia das espécies que compõem o gênero. Com o emprego intensivo desses organismos para estudos de genética de populações e especiação, as informações ecológicas tornam-se acentuadamente importantes. Assim, estudos das espécies de Drosophila nas mais variadas condições ambientais são convenientes e necessários.

A revisão feita por Last e Price (1969) sobre a distribuição de leveduras na natureza mostra, apesar da não intensão dos autores, que em todos os locais onde foi assinalada a presença de Drosophila por outros pesquisadores, ocorrem leveduras, desde flores até corpos de frutificação de cogumelos.

Deste modo, a importância de espécies de leveduras na dieta das espécies de Drosophila e suas relações, fornecem uma gama muito variada de motivos para experimentos que podem ser realizados no campo e/ou em laboratório.

Trabalhos de captura de moscas na natureza foram realizados por grande número de autores e na maioria das coletas, as iscas foram preparadas com frutos cultivados, sendo mais comumente usada a banana, fermentada naturalmente ou inoculada com fermento comercial; os dados mostraram que algumas espécies são muito comuns e outras raras em determinados locais.

Pavan (1957) e posteriormente Mourão (1966), descreveram a atração preferencial apresentada por espécies de Drosophila por certas espécies de frutos cultivados; Pipkin (1965) verificou que algumas moscas preferem frutos nativos aos frutos cultivados.

Destê modo, a interpretação dos resultados de coletas para conhecimento da fauna de determinado local, com um só tipo de substrato, assim como as frequências das espécies, tornou-se até certo ponto duvidosa em virtude da possibilidade de algumas espécies não apresentarem atração para

certo tipo de isca. Portanto, coletas em iscas com diferentes substratos e com diferentes espécies de leveduras poderiam dar informações melhores sobre as frequências das espécies de moscas na natureza.

Outra possibilidade de estudo é o isolamento de leveduras do trato digestivo das moscas consideradas como raras, seu cultivo em laboratório e a inoculação em iscas previamente autoclavadas para posterior exposição na natureza. Deste modo, uma espécie considerada rara, poderia talvez ser atraída em números relativamente altos por uma isca com determinada levedura.

Mourão et alii (1965) descreveram que a fauna de Drosophila no Brasil consta de 121 espécies; destas, a maior parte não tem sido empregada em estudos de laboratório, em virtude das mesmas não se desenvolverem nos meios de cultura usuais.

O conhecimento de espécies de leveduras capazes de atrair determinadas espécies de Drosophila e a adição de leveduras específicas aos meios de cultura usuais para as moscas, abrem possibilidades para a realização de estudos genéticos, populacionais e evolutivos em muitos grupos de Drosophila ainda não explorados.

Dobzhansky e Pavan (1950), Pavan (1957), Mourão (1966), Bélo (1973) e Parsons (1975), entre outros, verificaram que as populações naturais de moscas flutuam durante o ano. Last e Price (1969) e Carmo-Souza (1969) assi-

nalaram a ocorrência de leveduras que também apresentaram flutuações estacionais. Assim, a possibilidade da fonte alimentar (leveduras) ser um poderoso fator que pode influir no tamanho das populações de Drosophila e suas variações durante o ano, é altamente sugestiva.

Os estudos de populações experimentais realizados por Crombie (1947) com Tribolium e Oryzaephilus, por Frank (1952) com espécies de Cladocera e mais modernamente por Barker (1971) com espécies de Drosophila, têm mostrado que quando duas espécies competem pelos mesmos recursos, uma acaba por eliminar a outra. Entretanto, alguns autores, entre os quais Ayala (1968, 1969, 1970 e 1971), Levins (1968) e Tadei (1973), mostraram a coexistência de duas espécies em um ambiente relativamente uniforme, o que parece contradizer o princípio da exclusão competitiva. O estudo de competição em Drosophila, com leveduras específicas introduzidas em meio sintético, servindo como a única fonte de proteínas e vitaminas para criação e alimentação de larvas e imagos, poderá possibilitar valiosas informações a respeito das relações entre os organismos em competição, contribuindo assim para o melhor esclarecimento do controvertido princípio da exclusão competitiva de Gause (1934 e 1971).

Carmo-Souza (1969) mostrou a ocorrência de espécies de levedura associadas com determinados tipos de solos e frutos. Conseqüentemente isso pode acarretar a ocorrência de determinados tipos de organismos só em locais com

determinadas condições ecológicas, o que poderia influenciar a distribuição geográfica das espécies de Drosophila.

Há pois problemas variados, dos quais alguns foram apontados, cuja análise tornar-se-á mais objetiva e percuciente se consideradas as relações Drosophila - leveduras.

Outra perspectiva de trabalho são as relações, em nível molecular, entre espécies de leveduras e espécies de Drosophila, quanto a ácidos aminados das proteínas e bases nitrogenadas do DNA.

Como será mostrado na revisão bibliográfica, a despeito da importância do assunto, há poucos trabalhos na literatura relacionando Drosophila e leveduras. Com exceção dos trabalhos de El-Helw e Ali (1970 e 1973) e Ali e El-Helw (1974), a maioria data de 20 anos atrás.

No Brasil inclusive, apesar de uma escola de genética bastante desenvolvida e fortemente calcada sobre Drosophila, com exceção dos trabalhos de Cunha (1957) o problema Drosophila - leveduras é mencionado apenas em Bortolozzi et alii (1976).

Para a realização do presente trabalho foi necessária a instalação de um laboratório na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP, o qual foi financiado em grande parte pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, dentro do Programa Integrado de Genética e um estreito relacionamento com

o Departamento de Microbiologia, do mesmo estabelecimento.

É no contexto do quadro acima e tendo em vista os conhecimentos sobre Drosophila - leveduras, recaptula dos na revisão bibliográfica, que se insere este trabalho. É uma retomada dessa linha de pesquisa, com caráter predomi nantemente exploratório.

Os objetivos são, de um lado, o desenvolvi mento de técnicas de trabalho para a abordagem do problema nas condições controladas do laboratório, de modo a possibi litar o passo de ligação com os eventos na natureza e, de outro lado, o conhecimento de alguns aspectos específicos do problema.

As técnicas desenvolvidas referem-se à este rilização do trato digestivo das moscas e à idealização de uma caixa para estudo da atração. Os aspectos específicos referem-se à atração e à produtividade de 5 espécies de Drosophila em 44 espécies de levedura.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Patterson e Wagner (1943) foram praticamente os primeiros a referir às espécies associadas com habitações humanas como "domésticas", e denominaram "selvagens" aquelas que não estão associadas ao homem. Mostraram que a drosofilofauna de ambientes domésticos compõe-se de espécies que são, em sua maioria, geralmente cosmopolitas. Posteriormente Pavan (1957) chegou às mesmas conclusões fazendo coletas no interior do Estado de São Paulo.

Pelo fato das espécies domésticas serem cosmopolitas, devem existir recursos semelhantes nos diversos ambientes explorados pelas moscas. Assim, o cultivo de vegetais, restos de alimentos, poderiam ser recursos exploráveis de imediato. A destruição de ambientes naturais beneficiaria as espécies introduzidas, as quais superariam as locais na exploração dos nichos ecológicos recém-criados, nos quais as espécies endêmicas não estão adaptadas.

Exemplo de introdução de uma espécie em um

país foi mostrado por Carson e Wasserman (1965), que descreveram a associação entre D. buzzati e o vegetal Ondira sp; nos locais onde foi introduzido o vegetal (Austrália e África) os autores assinalaram a presença da mosca. Brncic (1957) registrou a presença de D. ananassae no Chile, em um mercado de Santiago onde havia frutos importados. Pipkin (1953) mostrou a existência de apenas quatro espécies de Drosophila (D. ananassae, D. hypocausta, D. anuda e D. melanogaster) em Moen Island e em mais três ilhas do atol Truk, atribuindo aos nativos a dispersão das espécies, os quais visitam as ilhas à procura de alimento.

Há uma grande escassez de dados concernentes aos locais de criação das espécies de Drosophila na natureza. Frota-Pessoa (1952), Heed (1957), Wheeler et alii (1962) e Pipkin (1964) informaram que algumas espécies utilizam as flores como alimento e local de desenvolvimento. Posteriormente, Pipkin et alii (1966) mostraram que certas moscas usam flores de diversas espécies, enquanto outras são especializadas em flores de uma espécie vegetal somente; informaram ainda, que aquelas que não são específicas de flores, como as que se alimentam no chão ou em cogumelos, podem também explorar flores. Especialmente detalhados são os trabalhos de Brncic (1966) sobre as relações entre D. flavopilosa e a planta Cestrum parquii, em cujas flores as fêmeas depositam ovos e as larvas se desenvolvem.

O sub-gênero Hirtodrosophila é constituído

por mais de 30 espécies, todas elas dependentes de cogumelos como locais de alimentação, reprodução e desenvolvimento (Mourão et alii 1965 e 1967), para completarem seu ciclo biológico.

Pavan (1957) e posteriormente Mourão (1966), descreveram a atração preferencial apresentada por espécies de Drosophila por determinados frutos cultivados. Pipkin (1965) verificou que algumas espécies de Drosophila preferem frutos nativos aos cultivados, para se desenvolver, mas muitas espécies mostram que sua alimentação pode ser conseguida em diversos locais.

Flutuações no tamanho de populações de Drosophila na natureza, descritas por Patterson (1943), próximo à Austin (EUA), mostraram que a disponibilidade de alimento é um importante fator que determina variações no número de indivíduos. Deste modo, as espécies que se desenvolvem em cactos são mais abundantes quando do amadurecimento dos frutos. Vários são os fatores que podem causar flutuações nos números das populações, entre os quais as variações climáticas são um agente importante.

Dobzhansky e Pavan (1950) mostraram que flutuações das espécies tropicais brasileiras são causadas principalmente por variações ocorridas nos períodos úmido e seco. Nas florestas costeiras e em partes da bacia Amazônica, onde a temperatura e umidade apresentam valores altos durante todo o ano, as variações na abundância das espécies de

Drosophila são devidas a períodos de frutificação de grande variedade de vegetais.

Variações estacionais nas frequências de espécies de Drosophila em diferentes altitudes, nas montanhas do Líbano, foram descritas por Pipkin (1952) que mostrou ser a temperatura um poderoso agente seletivo que reduz o tamanho das populações.

Mather (1956), coletando na região de Queensland (Austrália), mostrou que as espécies apresentavam nítidas preferências estacionais e que a precipitação pluviométrica durante o ano, como também períodos de frutificação de vegetais, são fatores importantes que atuam modificando os números de indivíduos.

Pipkin (1965), estudando flutuações de Drosophila no Panamá, em uma região onde as variações de temperatura são praticamente nulas durante todo o ano, verificou que as espécies apresentavam padrões diferentes de comportamento, quanto à ocorrência em maior ou menor abundância, dependendo da época do ano, seca ou úmida. Salientou também a importância da frutificação dos vegetais, nas expansões apresentadas pelas populações. Mourão (1966) encontrou concordância de algumas espécies que apresentaram expansão na estação úmida ou na estação seca, concomitantemente, em duas matas ecologicamente distintas.

Bélo (1973) e Bélo e Gallo (1977) estudaram as flutuações de espécies de Drosophila de habitat doméstico.

co durante o período de um ano, utilizando iscas de banana fermentada naturalmente. Verificaram que as espécies mais abundantes mostraram flutuações estacionais e apresentaram diferentes padrões de comportamento diurno.

Pavan (1957), referindo-se a flutuações de espécies de Drosophila de regiões tropicais e temperadas, observa: "entre nós, provavelmente mais que nas zonas temperadas, as populações de Drosophila são sensíveis às variações ambientais, graças ao grande número de espécies que normalmente entram em associações naturais. O maior número de espécies torna o sistema mais complexo e delicado e portanto mais sensível. Os dados referentes às zonas temperadas mostram variações menores que as por nós encontradas".

Os conhecimentos até aqui relacionados refletem a existência de relações entre as espécies de Drosophila e as condições ambientais. Há evidências de preferências por frutos, flores e cogumelos, como nichos para reprodução, desenvolvimento e alimentação. Essas relações devem ser fatores importantes na distribuição geográfica das moscas.

Entretanto, as relações com o ambiente são o reflexo de associações mais íntimas que envolvem espécies de Drosophila e espécies de leveduras.

Dobzhansky (1970) lembra que uma comunidade biológica geralmente inclui várias espécies e muitas ve

zes inúmeras, mantendo relações de dependência mútua mais ou menos íntima. É o que ocorre com as associações hospedeiro-parasita, presa-predador, transportador-simbiote, por exemplo. Segundo Ehrlich e Raven (1964), espécies interdependentes ou ecologicamente relacionadas podem sofrer coevolução, tornando suas interações vantajosas ou pelo menos minimizando os prejuízos que atingem um ou ambos os elementos associados.

O estudo da coevolução das espécies de Dròsophila e leveduras requer conhecimentos preliminares das associações, os quais são relativamente escassos, não ultrapassando 2 a 3 dezenas em um período de 30 anos.

O primeiro trabalho a mostrar que duas espécies de Dròsophila diferiam em suas habilidades para a utilização de espécies de levedura, isoladas dos locais de criação destas moscas e sugerir a possibilidade de que as espécies de Dròsophila diferem com respeito as suas preferências alimentares, foi o de Wagner (1944).

Posteriormente, Wagner (1949) verificou que culturas de laboratório sem levedura, usadas como controle, não possibilitaram o crescimento de larvas de cinco espécies de Dròsophila e em seis meios com diferentes espécies de levedura, a duração do período larval de D. mulleri e D. arizonensis foi semelhante, enquanto D. mojavensis, D. buzzatti e D. aldrichi apresentaram comportamentos diferentes entre si e das duas espécies anteriores. O autor sugeriu que as diferenças nutricionais poderiam atuar como um

tipo de mecanismo de isolamento devido as diferenças apresentadas pelas moscas com relação às espécies de levedura.

Brncic e Briones (1949), estudaram a incidência espontânea de tumores melânicos em uma linhagem selvagem e duas linhagens tumorais de Drosophila melanogaster, em relação a diferentes concentrações de Torulopsis utilis em um meio sintético. Os resultados mostraram que nos meios com alta concentração da levedura a incidência de tumores diminuiu nas três linhagens; a baixa incidência de tumores nos meios com alta concentração do microrganismo não estava relacionada com a redução do período de desenvolvimento da larva, o que foi verificado para a linhagem selvagem. Os autores desconhecem a razão do efeito protetor de Torulopsis utilis.

Buzzati - Traverso (1949) soltou moscas de D. subobscura em uma sala preparada com iscas inoculadas com leveduras, dispostas no chão. Deste modo, pode concluir por nítidas preferências das moscas por espécies de levedura.

A importância dos arranjos Standard (ST) e Chiricahua (CH) existentes nos cromossomos III de D. pseudoobscura, quanto ao valor adaptativo da mosca para exploração de meios suplementares com diferentes espécies de leveduras em caixa de populações foi estudada por Cunha (1951). Mostrou que os blocos gênicos, em condição heterozigótica, apresentaram geralmente uma superioridade sobre os

homozigotos; somente em duas das nove espécies de microrganismos empregados ocorreu uma superioridade da inversão ST em condição homozigótica. Deste modo, demonstrou que o valor adaptativo dos homozigotos, ST e CH e dos heterozigotos ST/CH, variavam dependendo do microrganismo usado como alimento. Afirmou ainda, que as frequências relativas dos arranjos gênicos em populações naturais podem ser selecionadas por fatores nutricionais.

O isolamento de diversas espécies de leveduras do trato digestivo de D. persimilis e D. azteca feito por Cunha et alii (1951), permitiu o seu uso em suspensões, como iscas para atrair Drosophila em região próxima a Mather, em Sierra Nevada na Califórnia, tendo bananas com fermento "Fleischmann" como isca controle. As diferentes espécies de leveduras mostraram atrair as moscas diferentemente; entretanto essa diferenciação não foi qualitativa e todas as moscas foram atraídas para todas as leveduras, em frequências diferentes.

Os termos local de criação e local de alimentação foram introduzidos por Carson (1951). Os locais apresentam diferentes qualidades de atração para diferentes espécies de Drosophila, sendo provavelmente responsáveis pela separação ecológica de espécies simpátricas na natureza. Verificou que exudações de seiva de Quercus kelloggii, contaminadas por microrganismos constituem um importante local natural de criação ou de alimentação para D. pseudoobs

cura e D. persimilis; a separação ecológica dessas espécies parece ser fraca, pois ambas criam e se alimentam nos mesmos fluxos de plantas. Por outro lado, descreveu que exudações de seiva infestadas atraem grande número de moscas, enquanto outras, especialmente aquelas contendo grande número de larvas e pupas, atraem poucas moscas. Isso sugeriu que estas especificidades e o fato de D. azteca ser ausente em coletas nestes locais, são devidos a qualidades microbiológicas do fluxo e não do substrato.

Dudgeon (1954) isolou 130 linhagens de leveduras de 21 espécies de Drosophila coletadas em diferentes regiões dos Estados Unidos da América em diferentes épocas do ano. Destas leveduras, 117 foram identificadas como pertencentes a 7 gêneros: Debaryomyces, Hansenula, Pichia, Saccharomyces, Candida, Kloeckera e Torulopsis. As demais linhagens foram colocadas em 2 grupos da sub-família Cryptococcoideae. Testes de nutrição usando 3 espécies relacionadas do grupo "virilis", D. virilis, D. texana e D. montana, mostraram que a habilidade das moscas variava conforme as espécies de microrganismos. D. montana provou ser a mais sensível as diferenças nutricionais, D. texana exibiu efeitos intermediários entre as duas espécies e D. virilis utilizou maior número de leveduras diferentes, sem variação aparente no seu ciclo normal de vida. Diferenças acentuadas foram encontradas com relação ao aspecto nutricional das leveduras de alguns gêneros: Hansenula e Candida serviram

como meio nutricional para as três espécies de Drosophila; Candida e Torulopsis não apresentaram boas condições para as moscas, enquanto Saccharomyces foi adequado para D. virilis mas não para D. montana.

Experimentos sobre preferências alimentares de espécies de Drosophila, em condições naturais, foram feitos em 4 regiões do Brasil por Dobzhansky e Cunha (1955): Belém e Fordlândia (Estado do Pará), Itambacuri (Estado de Minas Gerais) e Cantareira (Estado de São Paulo). As moscas foram atraídas para iscas de bananas autoclavadas e fermentadas com uma ou outras das quatro linhagens de leveduras, pertencentes às espécies Candida krusei ou Kloeckera apiculata. As espécies representadas nas coletas, mostraram uma clara preferência por uma das linhagens de leveduras; entretanto, nenhuma espécie apresentou uma especialização rígida. As moscas de diferentes espécies foram atraídas pelas várias iscas, exibindo preferências apenas quantitativas.

A microflora dos locais de criação e de ovoposição de Drosophila, na região de Yosemite na Califórnia, foi estudada por Carson et alii (1956), que isolaram das fontes naturais 136 culturas de microrganismos. A maioria dos isolados (110) envolviam 14 espécies de leveduras que foram obtidas de exudação de seiva contaminada de Quercus kelloggii em um local de criação de quatro espécies de Drosophila. As leveduras mais frequentes nestes locais foram:

Hansenula mrakii, Debaryomyces fluxorum, Pichia silvestris e Saccharomyces pastori. Outros 25 isolados foram feitos de outros locais de criação de Drosophila, nos quais Hansenula minuta foi encontrada associada com D. montana e Candida humicola com D. occidentalis e D. pinicola. Foi verificado pelos autores que as leveduras dos locais de criação são diferentes daquelas encontradas no trato intestinal dos imagos da mesma espécie, na mesma região. Desse modo, verificaram que leveduras de larvas e adultos na natureza são diferentes, sendo que os adultos não se alimentam regularmente nos locais de criação.

Phaff et alii (1956) estudaram a ocorrência de espécies de leveduras no trato digestivo de Drosophila. Os gêneros mais comuns foram Saccharomyces, Hanseniaspora e Kloeckera. As espécies comuns foram: Saccharomyces montanus, S. verone, S. cerevisiae, S. drosophilorum, Hanseniaspora valbyensis, H. uvarum, H. osmophila, Kloeckera apiculata e K. magna. De 216 moscas dissecadas, 137 apresentaram leveduras, 79 não tinham leveduras em seus tratos digestivos e somente 15 moscas mostraram bactérias. Na área de Mather na Califórnia, onde D. persimilis, D. pseudoobscura, D. azteca e D. pinicola foram as espécies mais comuns, todas apresentaram a mesma espécie de levedura. Foi notado que em altitudes elevadas as espécies mostraram alguma indicação de diferenças em seus hábitos alimentares.

Dobzhansky et alii (1956) verificaram a ocorrência de 14 espécies de Drosophila na região de Yosemite na Califórnia e que a comunidade se mantém devido a leveduras e outros microrganismos que exploram os fluxos e outros produtos da vegetação que são ricos em carboidratos. Devido a um período longo de seleção a que foi submetida, a comunidade tornou-se diferenciada de tal maneira que minimiza a competição entre os membros. Cada espécie de Drosophila tem suas próprias preferências alimentares, como suas próprias distribuições em relação a altitude. Além disso, nenhuma espécie é super-especializada a ponto de ser monófaga. A seleção natural deve atuar minimizando a competição por alimento, não só entre diferentes espécies de Drosophila, mas também entre larvas e adultos da mesma espécie.

Cunha et alii (1957) analisando o trato digestivo de moscas de matas da Cantareira (SP - Brasil) verificaram que elas se alimentavam de grandes variedades de leveduras, algumas raras, outras muito abundantes e a frequência de ocorrência das várias espécies de leveduras é diferente nas espécies de Drosophila. Experimentos de atração de moscas com diferentes espécies de microrganismos, mostraram que elas são atraídas diferencialmente. Analisando populações de laboratório de D. willistoni, encontraram relações entre inversões cromossômicas e espécies de leveduras empregadas na alimentação das moscas, mostrando o significado adaptativo dos arranjos cromossômicos diferentes, com

valores superiores dos heterozigotos, em relação aos dos homozigotos.

Lindsay (1958) desenvolveu um método para determinar as preferências alimentares de larvas de D. pseudoobscura e D. persimilis e verificou que ambas mostraram divergências nas preferências por quatro espécies de leveduras (Saccharomyces montanus, S. verone, S. cerevisiae e S. drosophilorum). A porcentagem de sobrevivência das larvas nas espécies de leveduras foi determinada e não houve diferenças entre as duas espécies de moscas. A diferença observada foi com respeito ao tempo de aparecimento dos imagos nas diferentes espécies de leveduras. É interessante notar, segundo o autor, que em S. cerevisiae em que a larva de D. pseudoobscura tinha o menor tempo de desenvolvimento, foi o tipo menos solicitado e em S. veronae, em que a larva teve maior tempo de desenvolvimento, foi o tipo mais escolhido.

Bicudo e Richardson (1977) estudaram o tempo de desenvolvimento de D. mulleri, D. arizonensis e os híbridos fêmea mulleri x macho arizonensis. As médias e períodos de emergência, respectivamente, foram para mulleri 17,9 e 16^a - 22^o dias, para arizonensis 19,9 e 18^o - 23^o dias para os híbridos 20,4 e 16^o - 24^o dias. Os autores atribuíram essas diferenças às relações filogenéticas e ecológicas entre as espécies, sendo as ecológicas associadas a substratos larvais existentes nas espécies de cactos ex

ploradas, as quais diferem quanto ao tempo de deterioração.

As preferências alimentares de D. affinis, D. miranda, D. persimilis e D. pseudoobscura por espécies de leveduras foram estudadas por Cooper (1960), na fase de larva e de adulto. Os resultados mostraram que as larvas de cada espécie têm preferências para diferentes espécies de microrganismos, o que também ocorreu com os adultos. Entretanto, foi verificado que as larvas diferiram dos adultos da mesma espécie, na escolha dos seus alimentos. O autor salientou também que a vantagem mais evidente para a separação de nichos ecológicos entre larvas e adultos é a competição intraespecífica; se tal mecanismo é necessário para reduzir a competição intraespecífica, um mecanismo similar poderia ser necessário para reduzir também a competição interespecífica por alimento.

Usando D. pseudoobscura Shehata e Mrak (1951) desenvolveram um método para transportar moscas para o laboratório com o mínimo de destruição das leveduras presentes nos tratos intestinais. Verificaram que os indivíduos capturados e mantidos a 0°C apresentaram maior número de células de leveduras que os demais, sugerindo portanto tal método para transporte de moscas do campo para o laboratório, para exame do seu conteúdo de microrganismos. Muitos trabalhos da literatura, segundo os autores, indicam a importância das leveduras para a nutrição de Drosophila, entretanto não há nenhuma informação indicando

o efeito do mecanismo digestivo. Para isso examinaram esferas fecais eliminadas por moscas. O exame ao microscópio revelou que as células de leveduras eram mais ou menos vazias, que a parede celular não havia sido rompida e que as células são gram-positivas devido a presença de ribonuclease. A coloração revelou que a passagem pelo trato intestinal das moscas tornava as leveduras gram-negativas, indicando a remoção da ribonuclease durante a passagem pelo trato digestivo.

Robertson et alii (1968) estudaram vários aspectos da biologia, nutrição e crescimento da espécie nativa do Havai, D. disticha e verificaram que a ovoposição era induzida por constituintes voláteis existentes em folhas de plantas caídas de Cheirodendron, local em que as moscas completam o seu ciclo. O exame do trato digestivo dos imagos mostrou que as fêmeas geralmente apresentavam bactérias não móveis e leveduras e os machos, bactérias móveis e poucos apresentavam leveduras. Isto sugere, segundo os autores, que machos e fêmeas se alimentam em locais diferentes, um fato que poderia diminuir a competição intraespecífica. As leveduras mais comuns encontradas foram as dos gêneros Candida e Torulopsis. Inspeção microscópica do conteúdo do intestino da larva mostrou que as bactérias são os microrganismos mais comuns, as quais são digeridas juntamente com o conteúdo do material das folhas, indicando que tais nutrientes são assimilados pelas larvas. Assim, as larvas diferem

dos imagos, pois sua flora intestinal é quase inteiramente bacteriológica e leveduras são virtualmente ausentes. Bactérias similares foram isoladas dos tecidos das folhas.

El-Helw e Ali (1970) verificaram que o valor adaptativo de D. melanogaster e D. simulans foi grande mente afetado pelas espécies de leveduras (Saccharomyces cerevisiae e Schizosaccharomyces pombe) inoculadas individualmente em seus meios de cultura. A viabilidade larval e o peso do corpo de D. melanogaster foram os parâmetros mais sensíveis às diferentes leveduras, do que em D. simulans. Nas culturas com larvas das duas espécies a variabilidade foi maior em D. simulans, especialmente em meio com Schizosaccharomyces e alta densidade de larvas. Em Saccharomyces, o número de machos emergidos foi igual para as duas espécies nas várias densidades larvais estudadas. Contudo, a interação entre densidade e espécies de leveduras mostrou a ocorrência de diferenças significativas, permitindo concluir que D. simulans foi mais homeostática que D. melanogaster.

A influência de 3 raças selvagens de Saccharomyces cerevisiae sobre algumas características do valor adaptativo de D. melanogaster e D. simulans foram estudadas por El-Helw e Ali (1973). Larvas das moscas foram colocadas em diferentes densidades em meio sintético suplementado com uma das três raças da levedura. Diferenças altamente significativas foram obtidas para a viabilidade larval, sen

do que D. simulans predominou em duas delas e D. melanogaster na outra, nas três densidades de larvas usadas para cada raça de levedura. Estes resultados mostraram que as diferentes raças de S. cerevisiae diferem em seus componentes nutricionais, sendo verificado também que estas raças foram responsáveis pelo tempo de desenvolvimento das larvas. A proporção sexual não foi afetada em ambas as espécies em diferentes condições ambientais, raças de leveduras e densidades larvais.

Posteriormente, Ali e El-Helw (1974) estudaram as preferências de larvas de D. melanogaster e D. simulans, verificando que a primeira espécie preferiu Candida pelliculosa e a segunda C. pulcherima, enquanto as 2 moscas não mostraram diferenças quanto a C. intermedia. Verificaram que as larvas das linhagens selvagem e vestigial de D. melanogaster apresentaram diferenças em suas preferências alimentares e que a população selvagem foi mais eficiente que a mutante na exploração das leveduras. Estudando a produtividade de quatro casais selvagens e mutantes, mostraram que os selvagens foram produzidos em maior quantidade em espécies de Candida, enquanto que os vestigiais em Saccharomyces cerevisiae.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Espécies de Drosophila

As espécies de Drosophila usadas nos experimentos foram capturadas na cidade de Olímpia, Estado de São Paulo, no mesmo local em que Bélo (1973) realizou estudos de flutuações. As coletas foram feitas sobre iscas de bananas fermentadas naturalmente.

As moscas capturadas foram transportadas para o laboratório em tubos de vidro com meio de cultura a base de trigo-fubá e em seguida identificadas com auxílio de um microscópio estereoscópico. As espécies utilizadas foram D. ananassae (A), D. hydei (H), D. kikkawai (K), D. melanogaster (M) e D. simulans (S). As letras entre parêntesis representam os símbolos que serão usados nas tabelas e figuras, em substituição aos nomes científicos das espécies.

As fêmeas de D. simulans e D. melanogaster

foram identificadas de acordo com a largura da faceta e distribuição da pigmentação do sexto tergito de acordo com Gallo (1973).

Após a identificação das moscas, foram preparadas 6 garrafas para cada espécie, cada uma com 3 fêmeas, cujos descendentes constituíram 6 linhagens para cada espécie.

4.2. Espécies de levedura

As espécies de levedura utilizadas, com exceção de Candida krusei, C. pseudotropicalis, C. tropicalis, C. macedoniensis e C. albicans, existentes no laboratório, foram cedidas pelo Prof. Dr. Jehud Bertolozzi, do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, Campus de Botucatu, UNESP. Bertolozzi et alii (1976) isolaram e identificaram estas leveduras do trato digestivo de moscas coletadas da região de Humaitá (Estado do Amazonas). As identificações foram confirmadas posteriormente pelo Prof. Dr. Pedro Magalhães Lacava do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, usando os sistemas de Kreger-Van Rij (1952) e de Barnette e Pankhurst (1974).

A seguir, em ordem alfabética, estão relacionadas as leveduras usadas nos experimentos, todas capazes de se desenvolver nos meios de cultura de Mittler (1952) e Sabouraud (Difco):

Símbolo	Nome científico
1-CAA	<u>Candida albicans</u>
2-CAK	<u>Candida krusei</u>
3-CAM	<u>Candida macedoniensis</u>
4-CAM	<u>Candida melinii</u>
5-CAM	<u>Candida muscorum</u>
6-CAP	<u>Candida pseudotropicalis</u>
7-CAP	<u>Candida parapsilosis</u>
8-CAT	<u>Candida tropicalis</u>
9-CAT	<u>Candida tenuis</u>
10-CIM	<u>Citeromyces matritensis</u>
11-CRM	<u>Cryptococcus macerans</u>
12-CRA	<u>Cryptococcus albidus</u>
13-DEH	<u>Debaryomyces hanseii</u>
14-ENB	<u>Endomyces bispora</u>
15-HAA	<u>Hansenula anomala</u>
16-HAB	<u>Hansenula beijerinckii</u>
17-HAC	<u>Hansenula canadensis</u>
18-HAC	<u>Hansenula californica</u>
19-HAP	<u>Hansenula polymorpha</u>
20-HAS	<u>Hansenula saturnus</u>
21-HAV	<u>Hanseniaspora valbyensis</u>
22-KHW	<u>Khuyveromyces wickerhamii</u>
23-KLA	<u>Kloeckera africana</u>
24-LEG	<u>Leucosporidium gelidum</u>

25-LES	<u>Leucosporidium scottii</u>
26-LES	<u>Leucosporidium stokesii</u>
27-PIE	<u>Pichia etchellsii</u>
28-PIF	<u>Pichia fermentans</u>
29-PIP	<u>Pichia polymorpha</u>
30-PIV	<u>Pichia vini</u>
31-RHG	<u>Rhodotorula glutinis</u>
32-RHR	<u>Rhodotorula rubra</u>
33-SAI	<u>Saccharomyces italicus</u>
34-SAR	<u>Saccharomyces rouxii</u>
35-SAL	<u>Saccharomyces ludwigii</u>
36-SPJ	<u>Sporidiobolus johnsonii</u>
37-SCS	<u>Schizoblastosporion starkeyi</u>
38-TOC	<u>Torulopsis colliculosa</u>
39-TOD	<u>Torulopsis dattila</u>
40-TOE	<u>Torulopsis erbonii</u>
41-TOP	<u>Torulopsis pinus</u>
42-TRA	<u>Tricosporon aculeatum</u>
43-TRP	<u>Tricosporon pullulans</u>
44-TRV	<u>Trigonopsis variabilis</u>

Os símbolos das leveduras constam de um número correspondente à posição na ordem alfabética e 3 letras. As duas primeiras correspondem às iniciais do gênero e a terceira à inicial da espécie. Esses símbolos serão usados nas tabelas e figuras.

4.3. Caixa para testes de atração

A figura 1 mostra a caixa destinada à experimentos de escolha de leveduras por espécies de Drosophila. Mede 96cm de largura, 97cm de comprimento e 38cm de altura, sendo construída em vidro e madeira; nas laterais há lâminas retangulares de isopor (1), com 12 x 70cm e 4cm de espessura. Em cada lâmina de isopor há três orifícios (2), devidamente espaçados, destinados a fixar os tubos contendo as moscas. As partes laterais são fixadas à caixa com fita adesiva. Na base da caixa são distribuídas 22 garrafas, numeradas de 1 a 11, sendo duas para cada número, as quais conterão a mesma espécie de levedura.

As hastes de 34cm (3), passando por furos existentes na lâmina de madeira da parte superior da caixa, têm em uma extremidade um capuz de plástico (4) que permite fechar as garrafas. O diâmetro de fundo do capuz, é o mesmo da boca da garrafa e menor que o da parte oposta. Na parte superior de cada capuz há duas arruelas de ferro destinadas a dar maior peso ao mesmo, forçando seu ajustamento à boca da garrafa. Elevando-se as hastes e fixando-as com fita adesiva, as garrafas ficam parcialmente abertas, o que exige das moscas uma manobra para alcançar o meio inoculado com levedura. Evidencia-se deste modo a manifestação de preferências alimentares, contrapondo-se a uma ida indiscriminada para a isca.

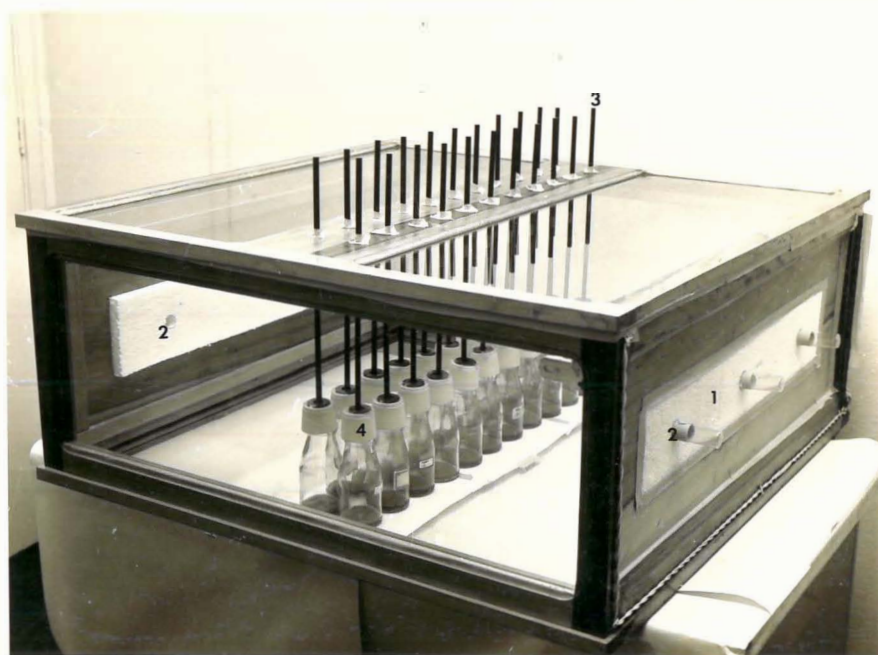
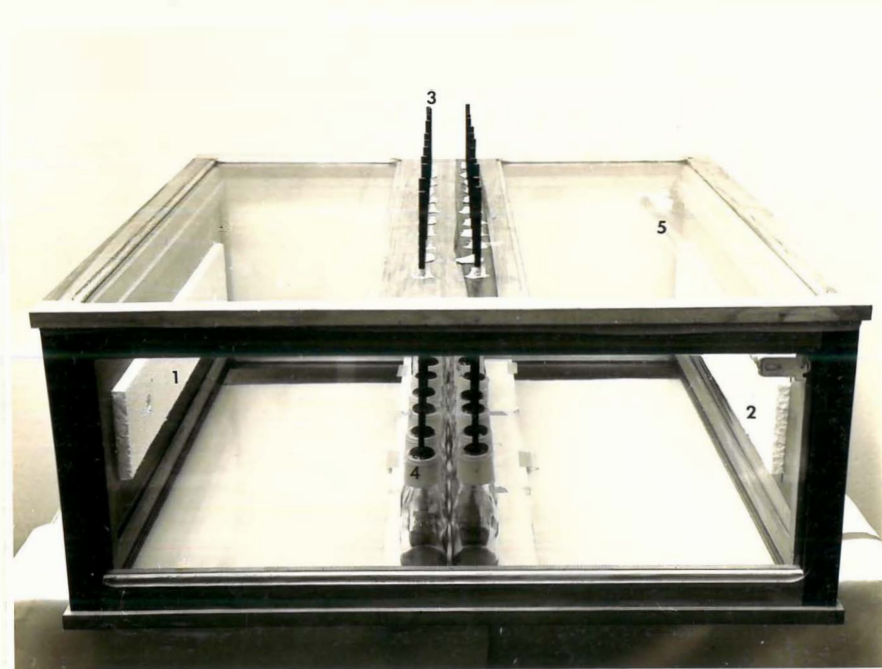


Figura 1: Caixa de atração vista em duas posições: 1=lâminas de isopor; 2=orifícios para colocação dos tubos com moscas; 3=hastes para abertura e fechamento das garrafas; 4=capuzes de plástico; 5=lâmpada ultra-violeta.

Internamente há uma lâmpada ultra-violeta (5) germicida de 30W, para esterilização. A parte superior da caixa é fixada por dobradiças, podendo ser aberta quando se deseja fazer a limpeza da mesma. Em cada teste de escolha foram empregadas 22 garrafas de 1/4 de litro com meio de Mittler (1952) e 11 espécies de leveduras. Cada espécie de levedura foi inoculada em duas garrafas, um dia antes do teste, em quantidade suficiente para desenvolver-se no meio de cultura.

A caixa de atração foi planejada e construída com a colaboração direta do Prof. Dr. Pedro Magalhães Lacava.

4.4. Meios de cultura

Foram empregados nas diferentes etapas do presente trabalho, os seguintes meios de cultura:

4.4.1. Meio de Mittler (1952)

Este meio foi usado nos experimentos de atração e produtividade, tendo a seguinte composição:

Bacto-agar.....	10/g
Dextrose.....	30/g
KH_2PO_4	1/g
$\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$	8/g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2/g

CaCl ₂	0,5/g
NaCl.....	0,5/g
MnSO ₄	0,5/g
MgSO ₄	0,5/g
FeSO ₄	0,5/g
Água destilada.....	1000/ml

O meio teve o seu pH corrigido para 7,0 com HCl.

4.4.2. Meio para esterilização do trato digestivo das moscas

Este meio é o mesmo descrito acima, acrescido dos seguintes elementos:

Caseína.....	8/g
Extrato de leveduras.....	5/g
Nipagin puro.....	5/g

Após a autoclavagem, espera-se que o meio atinja cerca de 45°C, adicionando em seguida, nipagin, e streptomycina (1g) e penicilina (600.000u).

4.4.3. Meio de Sabouraud (Difco)

Este meio foi usado para crescimento e estocagem das espécies de leveduras, tendo a seguinte composição:

Dextrose.....	40/g
Peptona.....	10/g
Água destilada.....	1000/ml

O pH foi corrigido para 7,0 com HCl.

Todos os meios de cultura destinados às leveduras foram autoclavados durante 15 minutos, a uma atmosfera.

4.4.4. Meio de trigo-fubá

Tal meio foi usado para manter as linhagens de moscas, apresentando a seguinte composição:

Água destilada.....	1000/ml
Farinha de trigo.....	100/g
Agar.....	4/g
Fubá.....	75/g
Maizena.....	20/g
Gelatina.....	10/g
Mel.....	25/g
Fermento Fleishmann.....	8/g
Ácido propiônico.....	1/ml
Nipagin(sol. álcool. a 10%).	8/ml

4.5. Técnica para esterilização do trato digestivo das moscas

Todas as moscas foram mantidas em laboratório em meio a base de trigo-fubá. Para a sua utilização nos experimentos foi necessário eliminar os microrganismos existentes em seu trato intestinal, para evitar contaminação.

Para esterilização do trato digestivo, as moscas foram deixadas durante três dias no meio de Mittler modificado (item 4.4.2.).

4.6. Experimentos

4.6.1. Experimentos da esterilização do trato digestivo das moscas

Estes experimentos visaram a obtenção de um procedimento que permitisse a esterilização do trato digestivo das moscas para uso posterior.

Foram feitos testes utilizando nipagin em várias concentrações (1,0, 2,5, 5,0 e 7,0g por litro de meio de cultura), cloranfenicol (10mg/ml), estreptomicina (1g) e penicilina (600.000u). Moscas mantidas em diversas combinações destas substâncias foram examinadas quanto a presença de microrganismo no trato digestivo.

O resultado destes experimentos foi a técnica para esterilização do trato digestivo das moscas descrita anteriormente (item 4.5.). O uso desta técnica foi testada quanto a produtividade das moscas em comparação com grupo controle constituído por moscas não tratadas.

4.6.2. Experimentos de atração

Estes experimentos foram realizados com a finalidade de verificar as preferências alimentares das espécies de Drosophila por espécies de leveduras.

As garrafas com meio de Mittler foram preparadas um dia antes da realização de cada teste. Com uma pipeta foi inoculada em cada duas garrafas uma mesma espécie de levedura, em quantidade suficiente para desenvolvimento durante o período de incubação. Em cada teste foram empregadas 11 espécies de leveduras, completando assim 22 garrafas, que exibiam o código da espécie adicionada e uma numeração com o objetivo de identificar a posição na caixa de atração.

Abaixo são apresentados os 4 grupos de 11 leveduras usadas em cada teste:

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
7-CAP	4-CAM	2-CAT	1-CAA
11-CRM	5-CAM	3-CAM	6-CAP
18-HAC	8-CAT	9-CAT	13-DEH
19-HAP	10-CIM	12-CRA	17-HAC
22-KHW	14-ENB	15-HAA	25-LES
31-RHG	20-HAS	16-HAB	29-PIP
35-SAL	21-HAV	26-LES	30-PIV
36-SPJ	23-KLA	28-PIF	34-SAR
37-SCS	24-LEG	32-RHR	38-TOC

39-TOD	27-PIE	33-SAI	41-TOP
43-TRP	40-TOE	42-TRA	44-TRV

Antes da realização de cada teste, em cada garrafa foi colocada uma fita de papel Rafael de 3,5cm de largura e 19cm de comprimento, previamente tratada com solução alcoólica de nipagin a 10% e esterilizada a 120°C, dobrado em forma de W, com os vértices fixados no meio de cultura.

Após a colocação das garrafas em suas posições, a caixa era fechada e a luz ultra-violeta ligada para esterilizar o ambiente. Os capuzes de plástico impedem a ação germicida dos raios ultra-violeta sobre as leveduras.

Somente uma espécie de Drosophila foi usada por teste, sendo as moscas previamente esterilizadas. Antes de sua introdução na caixa as moscas, em número de 53 casais por linhagem (318 casais no total), eram mantidas em garrafas estéreis e sem meio de cultura por aproximadamente 3 horas. Em seguida transferidas para tubos, os quais, após esterilização das moscas eram fixados à caixa de atração. A luz ultra-violeta era então desligada e as garrafas abertas pelo levantamento das hastes.

Após a recuperação do efeito do éter, foi fixado um período de 3,5 horas para as moscas deslocarem-se para os frascos, atraídas por determinada espécie de levedura. Ao término do período as garrafas eram recolhidas

e as moscas contadas por sexo.

Deste modo foi possível selecionar para cada espécie de Dròsophila as cinco leveduras que mais atraíram as moscas e as cinco que menos atraíram. Estas 10 espécies de leveduras foram empregadas em um novo teste de atração, para confirmação das preferências anteriores.

A fim de que o número de células de cada espécie de levedura a ser inoculada nas garrafas fosse aproximadamente igual para todas as espécies usadas, procedeu-se através de um hematómetro, a uma contagem do número de células. A partir dos números obtidos, determinou-se o volume da suspensão de cada levedura a ser inoculada, conseguindo-se assim números aproximadamente iguais para todas elas (10^6 células/ml).

4.6.3. Coletas na natureza

Todas as coletas foram feitas em latas com 15,7 cm de diâmetro e 18,5 cm de altura, nas quais haviam sido colocadas bananas descascadas, maceradas e autoclavadas. Após o seu resfriamento, foi inoculada em cada recipiente uma espécie de levedura, em grande quantidade, dois dias antes da coleta.

As iscas foram instaladas no local um dia antes da realização da captura e as latas foram sempre colocadas na posição dos vértices de um suposto quadrado, de 80 cm de lado.

A coleta das moscas foi feita com uma rede do tipo convencional para Dròsophila, em cinco horários diferentes: 9,11,14,16 e 18 horas. Os espécimes capturados eram transferidos da rede para um tubo contendo meio de cultura e uma fita de papel absorvente. Nestas condições o material era transportado para o laboratório, para identificação das espécies.

Duas das coletas foram realizadas na cidade de Olímpia, nos dias 29/07/77 e 01/11/77, no mesmo local onde Bêlo (1973) realizou estudos de flutuações e uma coleta na cidade de Jaboticabal, à 20/09/77.

Para escolha das espécies de leveduras, foram considerados os resultados dos testes de atração; os microrganismos usados foram Candida macedoniensis, Pichia vini, Pichia etchellsii e Saccharomyces ludwigii.

4.6.4. Experimentos de produtividade

Após a contagem do número de moscas, nos testes de preferência alimentar, as garrafas eram conservadas em câmaras BOD de fabricação Fanen, à 25°C. Após 8 dias as garrafas foram examinadas, anotando-se os números de larvas e pupas encontrados nos frascos. Para isso eram adicionados 20 ml de água destilada na garrafa e o meio diluído era vertido sobre uma placa de vidro, procedendo-se a contagem de larvas e pupas.

Este experimento permitiu verificar quais

fôram as espécies de leveduras escolhidas pelas moscas, com a produtividade média por fêmea em cada espécie de levedura.

Para cada espécie de Drosophila, em função dos testes de atração e produtividade, foram escolhidas 3 espécies de leveduras para um novo teste de produtividade. O critério para escolha das leveduras foi a relação entre atração e produtividade. As leveduras escolhidas foram:

para D. ananassae: Hansenula anomala, Hanseniaspora valbyensis e Kloeckera apiculata;

para D. hydei: Leucosporidium scottii, Pichia polymorpha e Pichia vini;

para D. kikkawai: Endomyces bispora, Hansenula canadensis e Rhodotorula glutinis;

para D. melanogaster: Pichia vini, Saccharomyces italicus e Torulopsis pinus; e

para D. simulans: Debaryomyces hansenii, Pichia atchellsii e Saccharomyces italicus.

Para cada espécie de levedura foram realizados dois testes, cada um com 12 casais iniciais. Após o período de três dias, os casais foram transferidos para uma nova garrafa, como a anterior, na qual permaneceram por idêntico tempo, sendo ao final eliminados.

A contagem do número de moscas obtidas foi feita em cada dois dias sucessivos, até terminarem os nascimentos. A biomassa produzida foi determinada com o auxílio de balança analítica, em mg x 10^{-3} .

4.6.5. Experimentos de produtividade em Candida

Este experimento foi realizado com a finalidade de se comparar cinco espécies de leveduras de um mesmo gênero quanto à capacidade em fornecer os elementos nutricionais necessários para o completo desenvolvimento das cinco espécies de moscas.

Para cada espécie de levedura foram montados três testes, cada um com 12 casais iniciais; foram feitas duas transferências cada três dias; na terceira garrafa as moscas permaneceram igual período de tempo, sendo finalmente eliminadas.

Para contagem do número de moscas e da produção de biomassa, o procedimento foi realizado como descrito anteriormente.

As espécies de Candida escolhidas foram: C. albicans, C. krusei, C. macedoniensis, C. pseudotropicalis e C. tropicalis.

5. RESULTADOS

5.1. Esterilização do trato digestivo das moscas.

Estes testes foram realizados com a finalidade de procurar um meio de eliminar do trato digestivo das moscas os microrganismos, pois nos ensaios com leveduras não poderia haver o risco de contaminação.

Inicialmente, Lacava e Bêlo (1975) verificaram que uma solução alcoólica do fungicida nipagin a 10%, em diferentes quantidades, em meio de trigo-fubá sem leveduras, não foi eficiente na eliminação de leveduras do trato digestivo de imagos, por esse motivo, no presente trabalho foi usado nipagin puro.

O meio usado foi o de Mittler, ao qual adicionou-se caseína e extrato de leveduras, sendo em seguida autoclavado. A adição destes ingredientes visou a suplementação proteica e vitamínica do meio, já que não foram acrescentadas outras substâncias que poderiam ser metabolizadas pelas moscas.

Após a autoclavagem, quando a temperatura do meio era aproximadamente de 45°C, foi adicionado nipagin puro nas concentrações de 1,0, 2,5, 5,0 e 7,0g por litro de meio de cultura. Para evitar um possível desenvolvimento bacteriano utilizou-se o antibiótico cloranfenicol na concentração de 10 mg/ml de meio.

Para o meio de Mittler, com concentração diferentes de nipagin, preparou-se duas garrafas de 1/4 de litro por concentração, nas quais foram colocados imágos de D. ananassae e D. hydei, durante 3 dias. Após tal período de tempo, as moscas foram sacrificadas e 3 casais de cada espécie, por concentração de nipagin, tiveram o seu trato digestivo retirado com o auxílio de uma agulha (previamente esterelizada) e semeado em placas de Petri, que foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

A análise das placas mostrou que as moscas das duas espécies, provenientes do meio sem nipagin (controles), apresentavam em seus tratos digestivos bactérias e leveduras. As moscas provenientes do meio com concentrações diferentes de nipagin, mostraram possuir somente bactérias.

As bactérias foram identificadas como pertencentes provavelmente a duas espécies do gênero Bacillus. Em teste de resistência, essas bactérias mostraram ser sensíveis a estreptomicina e penicilina, que foram empregadas em substituição ao cloranfenicol, nas concentrações de 1g e 600.000u, respectivamente.

Para verificar se tal tratamento poderia influir no número de indivíduos produzidos, foi realizado um teste com D. hydei, cujos indivíduos permaneceram durante o período de 10 dias em garrafas com meio de Mittler, com 5g de nipagin e os antibióticos referidos. Em seguida, foram preparadas seis garrafas de 1/4 de litro com meio a base de trigo-fubá, sendo que em 3 colocou-se 12 casais que sofreram tratamento de esterilização e nas 3 restantes 12 casais provenientes do estoque. Todos os casais sofreram duas transferências para novas garrafas, cada 72 horas, sendo eliminados no final e em seguida contou-se a progênie.

A produção média correspondente às 9 garrafas do controle, sem tratamento, foi 123 ± 10 e a das garrafas experimentais foi 136 ± 23 . Através do teste "t" de Student verificou-se que não há diferença significativa entre essas médias ($t_{16} = 0,065$, $P < 0,05$).

5.2. Atração

A capacidade de atração das 44 espécies de levedura foi testada na caixa de atração, para as 5 espécies de Drosophila. Conforme descrito em Material e Métodos (item 4.6.2), foram usadas 11 espécies de levedura por vez. Assim, para o estudo das 44 leveduras foram necessários 4 testes por espécie de Drosophila. Para cada espécie foram liberadas na caixa de atração 2544 moscas, sendo 318 casais por teste. Os resultados gerais dos 20 testes, envol

vendo as 44 espécies de levedura e as 5 de moscas, são a apresentadas na tabela 1.

O total capturado nas 44 leveduras foi para D. simulans 57% das moscas soltas (1455 indivíduos), para D. kikkawai 45% (1144), para D. melanogaster 44% (1116), para D. ananassae 38% (958) e para D. hydei 26% (657).

Das 5 espécies de moscas, apenas D. hydei não ocorreu em todas as leveduras, sendo atraída para 42 das 44 espécies de microrganismos.

Os valores de X^2 , constantes da tabela 1, mostram que para D. ananassae, D. kikkawai e D. simulans, machos e fêmeas foram capturados em proporções iguais, Para D. hydei e D. melanogaster predominaram, respectivamente, machos e fêmeas.

As tabelas 2 a 6 contêm as distribuições de moscas das 5 espécies, nas 44 leveduras.

A tabela 2 apresenta os números de moscas capturadas nas 9 espécies de Candida, com um total de 1173 moscas. À vista dos números, constata-se imediatamente que a distribuição não é casual, devendo ser consequência de diferenças específicas na capacidade de atração das leveduras.

Das 9 espécies de Candida, em 3 delas (C. albicans, C. melinii e C. muscorum) o número de moscas foi inferior a 100. Os maiores números ocorreram em C. parapsilosis (213) e C. macedoniensis (184). O número total de exemplares de D. simulans (349) corresponde a aproximadamente 30% do total, cerca de duas vezes o correspondente a D. hydei

Tabela 1: Números totais das 5 espécies capturadas nos testes na caixa de atração e valores de X^2 para a razão sexual 1:1 (**: $P < 0,01$; N: números de leveduras).

<u>Drosophila</u>	Nº de leveduras	Fêmea	Macho	X^2
A	44	503	455	2,406
H	42	294	363	7,246 **
K	44	548	596	2,012
M	44	607	509	8,606 **
S	44	710	745	0,842
TOTAL		2662	2668	

(173) e D. kikkawai (189), com percentuais da ordem de 15%. Para as outras duas espécies as frequências foram da ordem de 20%, com 223 moscas de D. ananassae e 239 de D. melanogaster.

Considerando cada espécie de Drosophila, em relação às 9 espécies de Candida, as distribuições de frequência são muito heterogêneas, as quais devem ter um reflexo de preferências alimentares diferenciais.

Enquanto 30% (66) dos espécimes de D. ananassae procuraram C. tropicalis, as leveduras C. albicans e C. melinii atraíram moscas em números irrisórios, 1 e 3 respectivamente. Quanto a D. hydei, 25% (43) das moscas foram encontradas em C. parapsilosis e apenas 3 indivíduos ocorreram em C. muscorum. Para D. kikkawai as leveduras preferidas foram C. tenuis com 25% (47 moscas), C. krusei com 23% (44) e C. parapsilosis com 20% (36). Nas demais leveduras as frequências são da ordem de 7,5% ou menos, o que corresponde a 14 ou menos moscas. A maior ocorrência de D. melanogaster foi em C. pseudotropicalis, com mais de 25% (64) das moscas atraídas; nas demais leveduras os percentuais variam de 18% em C. tenuis (42) a pouco mais de 1% em C. melinii e C. tropicalis, com 4 indivíduos. Para D. simulans, C. macedoniensis e C. parapsilosis atraíram cada uma cerca de 20% das moscas capturadas, correspondendo aproximadamente a 70 indivíduos; os 60% restantes distribuem-se pelas demais leveduras com percentuais variando de 15% em C. tropicalis (53)

Tabela 2: Números de moscas das 5 espécies de Drosophila, capturadas em espécies de Candida.

Levedura	<u>Drosophila</u>					Total
	A	H	K	M	S	
1-CAA	1	12	6	15	47	81
2-CAK	21	12	44	30	38	145
3-CAM	44	14	14	38	74	184
4-CAM	3	22	12	4	18	59
5-CAM	14	3	10	15	10	52
6-CAP	10	14	11	64	20	119
7-CAP	38	43	36	27	69	213
8-CAT	66	22	9	4	53	154
9-CAT	26	31	47	42	20	166
TOTAL	223	173	189	239	349	1173

a cerca de 3% em C. muscorum (10).

Considerando pois os números observados e a distribuição casualizada das leveduras na caixa de atração, não parece possível descartar a hipótese de que os números de moscas relativos às 9 espécies de Candida refletem associações preferenciais Drosophila-levedura.

Quando se considera os demais gêneros de levedura representados por mais de uma espécie (tabelas 3, 4 e 5), pode-se fazer constatações análogas às das espécies de Candida. Uma análise detalhada, semelhante a feita para o gênero Candida, levará ao acúmulo de observações indicativas de que a distribuição de moscas nas diversas leveduras não é aleatória: há diferenças marcantes para uma espécie de mosca em relação ao conjunto de levedura, como também quando se considera as frequências das 5 espécies de Drosophila em uma determinada levedura.

Entretanto, alguns aspectos merecem ser destacados, como situações muito significativas da não aleatoriedade que os números evidenciam.

Assim, por exemplo, 82% (75) dos 92 exemplares de D. hydei encontrados nas 6 espécies do gênero Hansenula, ocorreram em H. polymorpha. Das 113 moscas que ocorreram em H. canadensis, 66% (75) correspondem a D. kikkawai. Quase 35% (282) das 837 moscas capturadas em leveduras do gênero Hansenula correspondem a D. kikkawai e destas, quase 60% ocorreram em H. canadensis (75) e H. saturnus (87).

Tabela 3: Números de moscas das 5 espécies de Drosophila, capturadas em espécies de Hansenula.

Levedura	<u>Drosophila</u>					Total
	A	H	K	M	S	
15-HAA	12	2	12	33	27	86
16-HAB	2	4	48	15	19	88
17-HAC	5	2	75	18	13	113
18-HAC	19	9	23	6	36	93
19-HAP	23	75	37	25	61	221
20-HAS	32	-	87	68	49	236
TOTAL	93	92	282	165	205	837

Na tabela 4 foram agrupadas leveduras pertencentes aos gêneros Pichia, Torulopsis e Leucosporidium. Em Pichia a levedura mais atrativa foi P. vini, com 282 (42%) moscas; destas, 42% foram de D. kikkawai (119) e 26% de D. melanogaster (73), distribuindo-se os 32% restantes entre as outras 3 espécies. Já em P. fermentans, D. ananassae representou 5% dos indivíduos atraídos, enquanto as demais moscas ocorreram em quantidades aproximadamente iguais, da ordem de pouco mais de 20%.

Considerados os 3 gêneros, a levedura mais atrativa para D. ananassae foi P. etchellsii com 69 moscas (63%) e as menos atrativas foram P. polymorpha e P. fermentans, com 6 (5%) e 4 (4%) moscas, respectivamente.

Dos 3 gêneros representados na tabela 4, Torulopsis foi o que atraiu maior número de moscas (349); as espécies mais representadas nestas leveduras foram D. melanogaster (102) e D. simulans (111), correspondendo cada uma cerca de 30%. Em T. colliculosa, D. melanogaster apresentou 57 indivíduos, cerca de 67% do total. Das 86 moscas capturadas em T. dattila, D. melanogaster foi a menos frequente, com 6 indivíduos; as demais espécies ocorreram com frequências aproximadamente iguais, em torno de 20 exemplares.

Entre as espécies do gênero Leucosporidium, a especificidade das associações também é evidente. D. simulans, por exemplo, é a espécie predominante em L. scotti (43 moscas) e L. stokesii (71 moscas). Por outro lado, D.

Tabela 4: Números de moscas das 5 espécies de Drosophila, capturadas em espécies de Leucosporidium, Pichia e Torulopsis.

Levedura	<u>Drosophila</u>					Total
	A	H	K	M	S	
24-LEG	5	4	17	7	9	42
25-LES	11	27	17	2	71	128
26-LES	5	1	38	30	43	117
TOTAL	21	32	72	39	123	287
27-PIE	69	9	19	35	39	171
28-PIF	6	22	24	31	35	118
29-PIP	4	3	11	72	18	108
30-PIV	31	21	119	73	38	282
TOTAL	110	55	173	211	130	679
38-T0C	1	3	9	57	25	85
39-T0D	22	20	20	6	18	86
40-T0E	5	15	4	21	33	78
41-T0P	18	3	16	18	45	100
TOTAL	46	41	49	102	111	349

ananassae e D. hydei ocorreram com frequências mais altas em L. stokesii com respectivamente, 11 e 27 moscas e D. melanogaster manifestou nítida preferência por L. scotti que atraiu 30 dos 39 exemplares capturados.

A tabela 5 refere-se aos gêneros Saccharomyces, Cryptococcus, Tricosporon e Rhodotorula. D. simulans representou 43% (60) dos indivíduos atraídos em S. italicus e D. ananassae correspondeu a 53% (56) em S. rouxii. Em R. glutinis D. ananassae representou 60% (129) das moscas atraídas e D. kikkawai 50% (46) de R. rubra.

A tabela 6 contém os resultados obtidos com 10 microrganismos representantes de 10 gêneros. Destes, os que apresentaram maior capacidade de atração foram Hanseniaspora valbyensis, Kloeckera africana e Saccharomyces ludwigii, com respectivamente 140, 258 e 232 moscas, mais que metade do total dos 10 gêneros. Considerados os totais das 5 espécies de Drosophila, excluída D. simulans, os números de moscas são próximos de 200. Entretanto são nítidas as diferenças relativas à distribuição de tais quantidades de moscas de cada espécie pelas 10 leveduras. As preferências mais marcantes foram de D. simulans em relação a K. africana (125 moscas) e D. hydei (73) e D. melanogaster (81) em relação a Saccharomyces ludwigii.

O número total de indivíduos das espécies de Drosophila atraídas para os microrganismos de determinados gêneros, foram muitas vezes semelhantes. Assim, para as leveduras

Tabela 5: Números de moscas das 5 espécies de Drosophila, capturadas em espécies de Cryptococcus, Rhodotorula, Saccharomyces e Tricosporon.

Levedura	<u>Drosophila</u>					Total
	A	H	K	M	S	
12-CRA	12	27	5	36	27	107
11-CRM	31	1	1	8	19	60
TOTAL	43	28	6	44	46	167
31-RHG	129	-	49	11	25	214
32-RHR	14	2	46	10	20	92
TOTAL	143	2	95	21	45	306
33-SAI	9	2	32	36	60	139
34-SAR	56	1	9	7	32	105
TOTAL	65	3	41	43	92	244
42-TRA	9	17	27	37	26	116
43-TRP	8	5	16	3	16	48
TOTAL	17	22	43	40	42	164

Tabela 6: Números de moscas das 5 espécies de Drosophila, capturadas em leveduras pertencentes a 10 gêneros.

Levedura	<u>Drosophila</u>					Total
	A	H	K	M	S	
10-CIM	8	3	13	21	33	78
13-DEH	7	3	15	17	7	49
14-ENB	40	20	6	5	12	83
21-HAV	46	21	18	17	38	140
22-KHW	14	6	15	7	14	56
23-KLA	32	49	37	15	125	258
35-SAL	16	73	33	81	29	232
37-SCS	17	14	16	13	24	84
36-SPJ	7	6	7	16	11	47
44-TRV	10	14	34	20	19	97
TOTAL	197	209	194	212	312	1124

duras do gênero Candida, D. kikkawai e D. hydei apresentaram números totais aproximadamente iguais, o mesmo ocorrendo para D. ananassae, D. melanogaster e D. simulans (tabela 2). Para as leveduras do gênero Hansenula (tabela 3) os números totais de D. ananassae e D. hydei foram iguais, o que também pode ser observado para D. kikkawai, D. melanogaster e D. simulans do gênero Tricosporon (tabela 5). Apesar do experimento não ter sido realizado em condições de competição, isto é, liberação simultânea das 5 espécies de moscas num mesmo teste de escolha, pode ser observado, nos casos das incidências acima, que as distribuições das frequências de moscas nas espécies de leveduras dos gêneros que atraíram números semelhantes de indivíduos, são muito diferentes.

Por meio de testes de X^2 de homogeneidade 2×44 , foram comparadas duas à duas as distribuições das 5 espécies de Drosophila nas 44 espécies de leveduras. Em todos os casos a homogeneidade é rejeitada, com valores de X^2 superiores a 63,7 ($P= 0,01$, com 40 G.L.).

Tomando-se as frequências de cada espécie de Drosophila nas 44 leveduras (tabelas 2 a 6), torna-se possível diferenciar leveduras mais atrativas, menos atrativas e intermediárias.

Na tabela 7 estão relacionadas para cada espécie de Drosophila as 5 leveduras mais atrativas, as 5 intermediárias e as 5 menos atrativas. Pode-se verificar que uma dada levedura pode ser ótima para uma espécie, intermediária

Tabela 7: Números de moscas, das 5 espécies de Drosophila capturadas nas 5 leveduras menos favoráveis (-), nas 5 intermediárias(+/-) e nas 5 mais favoráveis (+). 58

<u>Drosophila</u>	Leveduras					
	-	Nº	+/-	Nº	+	Nº
A	1-CAA	1	5-CAM	14	8-CAT	66
	4-CAM	3	15-HAA	12	21-HAV	46
	16-HAB	2	22-KHW	14	27-PIE	69
	29-PIP	4	32-RHR	14	31-RHG	129
	38-TOC	1	35-SAL	16	34-SAR	56
H	11-CRM	1	1-CAA	12	7-CAP	43
	20-HAS	0	2-CAK	12	9-CAT	31
	26-LES	1	18-HAC	9	19-HAP	75
	31-RHG	0	27-PIE	9	23-KLA	49
	34-SAR	1	44-TRV	14	35-SAL	73
K	1-CAA	6	21-HAV	18	16-HAB	48
	11-CRM	1	24-LEG	17	17-HAC	75
	12-CRA	5	25-LES	17	20-HAS	87
	14-ENB	6	39-TOD	20	30-PIV	119
	40-TOE	4	41-TOP	16	31-RHG	49
M	5-CAM	15	10-CIM	21	6-CAP	64
	8-CAT	4	17-HAC	18	20-HAS	68
	14-ENB	5	21-HAV	17	29-PIP	72
	25-LES	2	41-TOP	18	30-PIV	73
	43-TRP	3	44-TRV	20	35-SAL	81
S	5-CAM	10	10-CIM	33	3-CAM	74
	13-DEH	7	12-CRA	27	7-CAP	69
	14-ENB	12	15-HAA	27	23-KLA	125
	24-LEG	9	35-SAL	29	25-LES	71
	36-SPJ	11	42-TRA	26	33-SAI	60

para uma outra e ruim para uma terceira espécie de mosca, como por exemplo, Leucosporidium scottii. Pode também haver coincidência quanto a uma dada levedura ser ótima para duas espécies de Drosophila como são os casos de Hansenula saturnus e Kloeckera africana.

A tabela 7 contém ainda os números de moscas capturadas em cada levedura. Para cada uma das 5 espécies de Drosophila, os totais capturados nas 5 leveduras menos atrativas, calculados como percentuais dos respectivos totais, variam de 0,5 (D. hydei) a 3% (D. melanogaster e D. simulans). Do mesmo modo, para as 5 leveduras intermediárias os percentuais também variam pouco, de 7% (D. ananassae) e 10% (D. simulans).

Entretanto, quando consideradas as leveduras preferidas, as variações são acentuadas. Para D. hydei, do total de moscas capturadas, 41% ocorreram nas leveduras mais favoráveis. Para D. ananassae o percentual é 38; para D. kikkawai e D. melanogaster as moscas que se dirigiram para as leveduras mais favoráveis correspondem a 33% e 32% respectivamente. D. simulans, conforme se vê na tabela 1, foi a espécie capturada em maior número, com 1455 moscas. Contudo as 399 moscas que ocorreram nas 5 leveduras preferidas correspondem a apenas 27% do total.

Para uma visão global de todos os resultados dos 20 testes, envolvendo as 5 espécies de Drosophila e as 44 de leveduras, foi preparada a tabela 8. Nesta, as levedu

Tabela 8: Números totais de moscas atraídas pelas 44 espécies de leveduras, nos testes na caixa de atração (explicações no texto)

Levedura	Nº	%	<i>Drosophila</i>				
			A	H	K	M	S
30-PIV	282	100,0	10,99	7,44	42,20	25,89	13,48
23-KLA	258	91,5	11,35	17,38	13,12	5,32	44,33
20-HAS	236	83,7	11,35		30,86	24,12	17,38
35-SAL	232	82,3	5,68	25,90	11,71	28,73	10,29
19-HAP	221	78,4	8,16	26,61	13,12	8,87	21,64
31-RHG	214	75,9	45,75		17,38	3,90	8,87
7-CAP	213	75,5	13,47	15,24	12,76	9,57	24,46
3-CAM	184	65,2	15,59	4,96	4,96	13,46	26,22
27-PIE	171	60,6	24,45	3,19	6,73	12,40	13,82
9-CAT	166	58,9	9,22	11,00	16,68	14,90	7,10
8-CAT	154	54,6	23,40	7,80	3,19	1,42	18,79
2-CAK	145	51,4	7,44	4,25	15,60	10,63	13,47
21-HAV	140	49,6	16,30	7,44	6,38	6,02	13,46
33-SAI	139	49,3	3,19	0,71	11,35	12,77	21,28
25-LES	128	45,4	3,90	9,58	6,03	0,71	25,18
6-CAP	119	42,2	3,55	4,96	3,90	22,70	7,09
28-PIF	118	41,8	2,12	7,79	8,50	10,98	12,40
26-LES	117	41,5	1,77	0,35	13,48	10,64	15,25
42-TRA	116	41,1	3,19	6,02	9,57	13,11	9,21
17-HAC	113	40,1	1,77	0,71	26,62	6,39	4,61
29-PIP	108	38,3	1,42	1,06	3,90	25,53	6,38
12-CRA	107	37,9	4,25	9,56	1,77	12,75	9,56
34-SAR	105	37,2	19,84	0,35	3,19	2,48	11,34
41-TOP	100	35,5	6,39	1,06	5,68	6,39	15,98
44-TRV	97	34,4	3,55	4,96	12,06	7,09	6,74
18-HAC	93	33,0	6,74	3,20	8,16	2,13	12,77
32-RHR	92	32,6	4,96	0,71	16,30	3,54	7,09
16-HAB	88	31,2	0,71	1,42	17,02	5,32	6,74
15-HAA	86	30,5	4,26	0,71	4,26	11,70	9,58
39-TOD	86	30,5	7,80	7,09	7,09	2,13	6,38
38-TOC	85	30,1	0,35	1,06	3,19	20,18	5,31
37-SCS	84	29,8	6,03	4,97	5,68	4,61	8,51
14-ENB	83	29,4	14,17	7,08	2,12	1,77	4,25
1-CAA	81	28,7	0,35	4,25	2,12	5,31	16,65
40-TOE	78	27,7	1,78	5,33	1,42	7,46	11,72
10-CIM	78	27,7	2,84	1,06	4,62	7,46	11,72
11-CRM	60	21,3	11,00	0,36	0,36	2,84	6,74
4-CAM	59	20,9	1,06	7,79	4,25	1,42	6,38
22-KHW	56	19,9	4,97	2,13	5,33	2,49	4,97
5-CAM	52	18,4	4,95	1,06	3,54	5,31	3,54
13-DEH	49	17,4	2,48	1,06	5,33	6,04	2,48
43-TRP	48	17,0	2,83	1,77	5,67	1,06	5,67
36-SPJ	47	16,7	2,49	2,13	2,49	5,68	3,91
24-LEG	42	14,9	1,77	1,42	6,03	2,48	3,19
Total relativo		1890,0	339,70	233,00	405,70	395,70	515,90
absoluto 5330			958	657	1144	1116	1455

ras estão relacionadas em ordem decrescente quanto aos números de moscas atraídas. Assim, as 282 moscas atraídas por Pichia vini foram tomadas como 100% e os números de moscas atraídas pelas outras espécies de leveduras estão expressos como percentuais de 282. Para cada levedura, o número de moscas de cada espécie está calculado como percentual do respectivo percentual de 282.

Embora os testes de atração tenham sido feitos na ausência de competição, isto é, expondo as leveduras para cada espécie de Drosophila separadamente, tem-se uma indicação da preferência relativa das 5 espécies de Drosophila em relação a cada espécie de levedura. Verifica-se que D. simulans predominou em 14 espécies de microrganismo, D. kikkawai em 10, D. melanogaster em 9, D. ananassae em 8 e D. hydei em 2 leveduras. Em Tricosporon pullulans, D. kikkawai e D. simulans, foram igualmente abundantes, predominando em relação às demais. A levedura que atraiu maior número de indivíduos foi Pichia vini, na qual, predominou D. kikkawai. Leucosporidium gelidum foi a levedura menos atrativa e nesta predominou também D. kikkawai, com frequência equivalente ao dobro de D. simulans, a segunda espécie mais frequente.

As tabelas 9, 10 e 11 possibilitam um exame comparativo das 5 espécies de Drosophila, respectivamente em relação as leveduras menos favoráveis, mais favoráveis e as intermediárias, tendo sido construídas a partir da tabela

8. Na tabela 9, por exemplo, cada número da diagonal corresponde a soma dos percentuais observados para cada espécie de mosca, nas 5 leveduras menos favoráveis. Os números de cada horizontal, excluído o da diagonal, são às somas das frequências das demais espécies nas leveduras correspondentes à espécie de mosca da diagonal. Por outro lado, em cada vertical, excluído o número da diagonal, os demais correspondem à incidência dessa espécie de mosca nas leveduras menos favoráveis das demais. Assim, o número 3,89 corresponde à soma das percentuais de D. ananassae nas suas leveduras menos favoráveis; o número 15,58 corresponde à soma dos percentuais de D. hydei nas leveduras menos favoráveis de D. ananassae; o número 89,71 corresponde à soma dos percentuais de D. ananassae nas leveduras menos favoráveis de D. hydei. As tabelas 10 e 11 devem ser lidas do mesmo modo, respectivamente para as leveduras mais favoráveis e intermediárias. Na tabela 9, referente às leveduras menos favoráveis, alguns fatos podem ser destacados.

De um modo geral 4 espécies de Drosophila são atraídas em maior número para as leveduras menos favoráveis da quinta espécie. Exemplificando, para primeira horizontal o valor de D. ananassae é 3,89 enquanto o das demais espécies são muito maiores, superiores a única exceção é a frequência de D. hydei (12,75), menor que a de D. simulans (17,37) nas leveduras menos favoráveis desta espécie. Por outro lado, qualquer espécie de Drosophila foi atraída nas

Tabela 9: Frequências relativas de moscas capturadas nas 5 leveduras menos favoráveis de cada espécie de Drosophila.

	A	H	K	M	S
A	3,89	15,58	30,48	57,76	41,43
H	89,71	1,06	55,27	43,98	59,58
K	31,55	26,58	7,79	30,13	48,92
M	24,36	34,02	21,26	6,38	60,27
S	25,86	12,75	19,51	21,28	17,37

leveduras menos favoráveis das demais em números sempre maiores que em suas próprias leveduras desfavoráveis. Este fato parece evidenciar uma capacidade de procura de fontes alimentares nas quais uma das espécies ocorre em frequências muito baixas. Exemplificando, as frequências de D. ananassae são maiores nas leveduras desfavoráveis das outras 4 espécies, que nas suas próprias.

Constata-se pois que as leveduras menos favoráveis de uma espécie de mosca, em geral foram capazes de atrair as outras espécies em números maiores. Essa desproporção é muito acentuada para as leveduras de D. hydei, as quais atraíram D. ananassae em número cerca de 85 vezes maior. Entretanto as leveduras menos favoráveis de D. simulans atraíram as 5 espécies em números aproximadamente iguais. Esses fatos parecem comportar a interpretação de que as leveduras menos favoráveis de D. simulans não são discriminadoras das outras 4 espécies de Drosophila.

Como mostra a tabela 10, todas as 4 espécies de Drosophila foram atraídas em frequências menores que o valor apresentado pela quinta espécie, em suas leveduras mais favoráveis; faz exceção D. simulans, com o valor 107,82 nas leveduras mais favoráveis de D. hydei.

A situação é semelhante para as leveduras prediletas de D. ananassae e D. simulans, nas quais as demais espécies ocorrem em frequências bem menores. Para as leveduras favoritas de D. hydei a situação é diferente: as outras

Tabela 10: Frequências relativas de moscas capturadas nas 5 leveduras mais favoráveis de cada espécie de Drôso phila.

	A	H	K	M	S
A	129,74	18,78	36,87	26,22	66,28
H	47,88	96,13	67,39	67,39	107,82
K	70,57	9,57	134,08	65,62	51,08
M	32,99	39,36	92,57	126,97	54,62
S	57,50	47,87	48,22	41,83	141,47

4 espécies de moscas, exceto D. simulans, ocorrem em frequências inferiores porém também altas.

De um modo geral as leveduras preferidas de qualquer das 5 espécies de Drosophila atraem satisfatoriamente as demais. Em outras palavras excluída a incidência de D. hydei (9,57) nas leveduras de D. kikkawai e as de D. hydei e D. melanogaster (26,27) nas de D. ananassae todas as demais frequências são superiores a 30%. Este fato orienta para a idéia de que as leveduras favoráveis para uma espécie de mosca, em geral atraem satisfatoriamente as demais.

Por outro lado, analisando-se as colunas, constata-se que as frequências de qualquer das 5 espécies de Drosophila são menores nas leveduras prediletas das demais, que nas suas próprias, evidenciando-se assim uma preferência clara.

Com respeito as frequências dos indivíduos atraídos para as leveduras intermediárias (tabela 11), observa-se uma situação diferente.

Nas leveduras intermediárias de D. ananassae, as demais espécies de levedura apresentaram frequências superiores a da própria D. ananassae. O mesmo se observa nas leveduras intermediárias de D. hydei. Nas leveduras intermediárias de cada uma das outras 3 espécies, as demais apresentam-se com frequências superiores ou inferiores a da espécie considerada.

Isso parece sugerir que, em condições de ex

Tabela 11: Frequências relativas de moscas capturadas nas 5 leveduras intermediárias de cada espécie de Drosophila.

	A	H	K	M	S
A	24,82	30,51	41,14	51,77	35,47
H	42,53	19,85	44,67	37,56	63,45
K	36,16	26,59	31,21	17,73	64,19
M	30,85	15,23	55,36	33,35	52,51
S	20,22	43,25	31,93	73,75	50,36

posição simultânea a mais de uma espécie de mosca, a competição deverá ser mais intensa nas leveduras intermediárias que nas espécies menos e mais favoráveis. Parece também que as leveduras intermediárias são as menos discriminadoras em comparação com as menos favoráveis e mais favoráveis.

A figura 2 mostra a distribuição das frequências de leveduras em relação aos números de moscas atraídas. A tendência geral, para as 5 espécies de Drosophila, foi um maior número de leveduras atraindo moscas em números baixos, diminuindo progressivamente o número de leveduras capazes de atrair números elevados de moscas. Apenas 3 leveduras atraíram exemplares de D. simulans em número igual ou inferior a 10, enquanto para as outras 4 espécies, essas leveduras correspondem a 15 ou mais espécies.

A figura 2 permite constatar ainda, para as 5 espécies de Drosophila, que em geral são poucas as espécies de leveduras que se mostraram capazes de atrair números elevados de moscas. Como em cada teste de atração foram liberados 636 moscas (318 casais), para os quatro testes o total de moscas liberadas é 2544; os números de leveduras capazes de atrair números de moscas superiores a 50, isto é, 2% deste total, variaram de 2 para D. hydei a 8 para D. simulans.

A figura 3 mostra as ogivas de porcentagens acumuladas de moscas atraídas nas 44 espécies de levedura, progressivamente da mais atrativa para a menos atrativa. Constata-se que as ogivas correspondentes a D. kikkawai e D. melanogaster são muito parecidas entre si, com disposição in

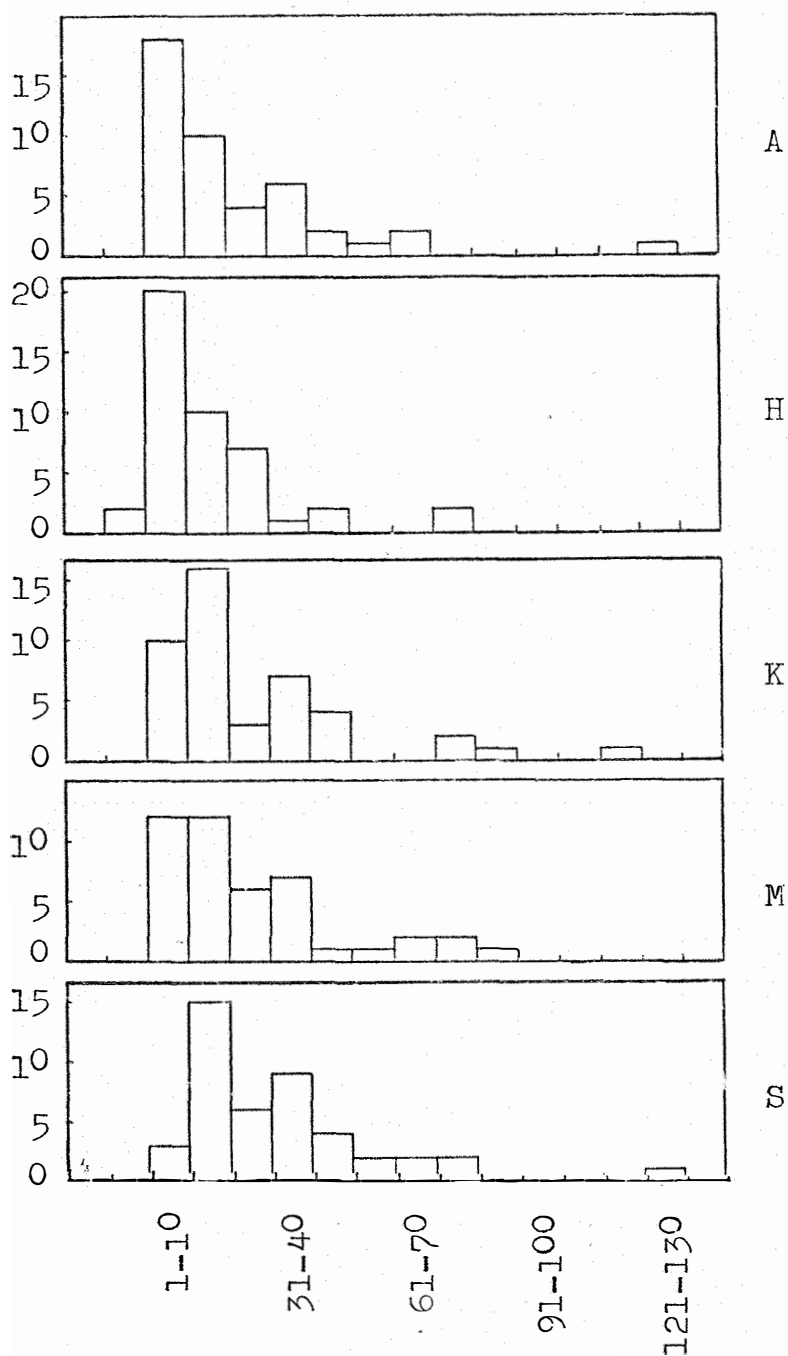


Figura 2 - Distribuição, para as 5 espécies de Dròsòphila, das frequências de moscas capturadas nas 44 leveduras. Ordenada: número de leveduras. Abscissa: número de moscas.

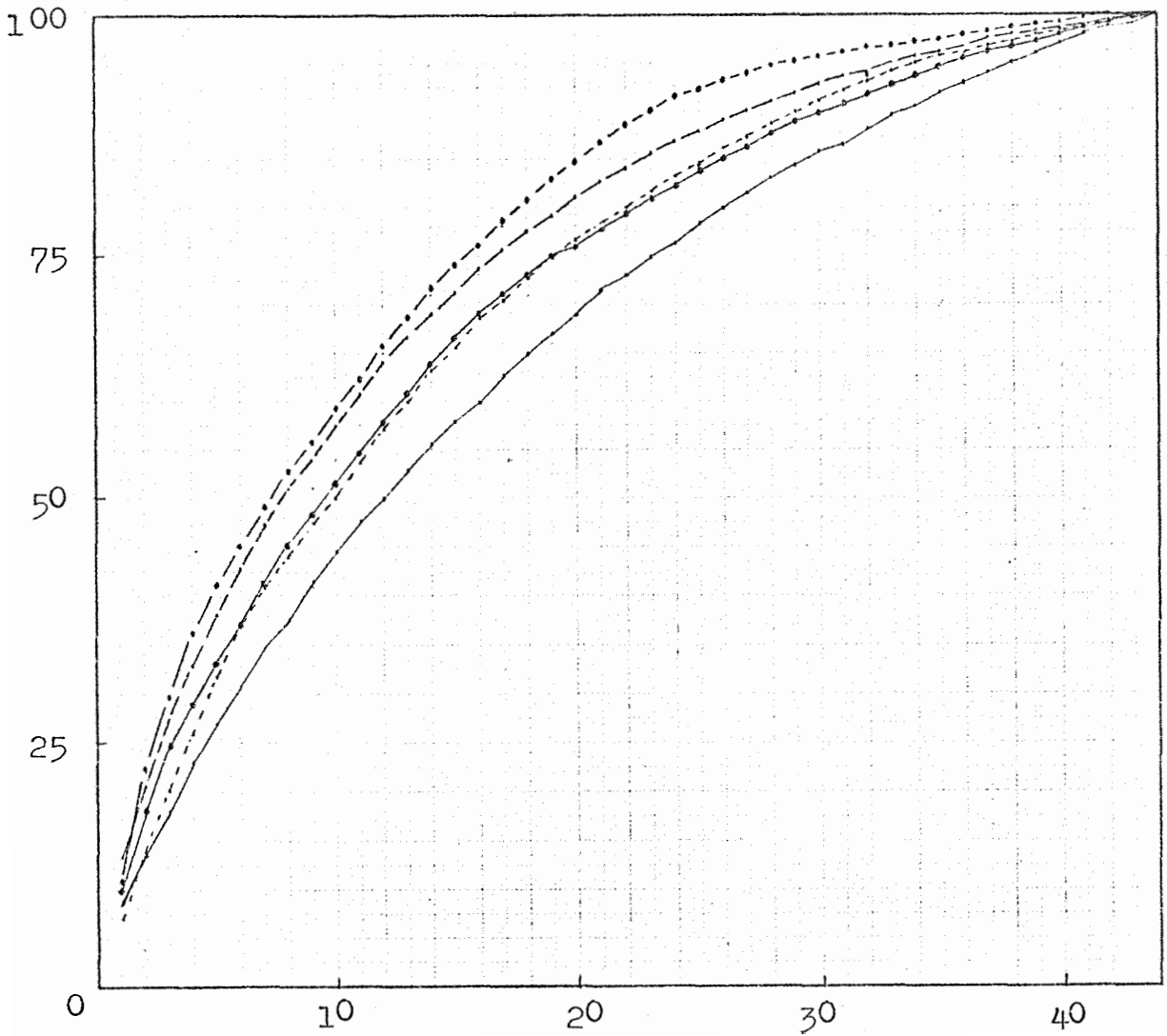


Figura 3: Ogivas das 5 espécies de *Drosophila* capturadas nas leveduras, com os valores adicionados em ordem de crescente dos percentuais. Ordenada: percentagem. Abscissa: número de leveduras.

(*D. ananassae*: — — — ; *D. hydei*: · — · — · — · — ; *D. kikkawai*: — · — · — · — · — · — ; *D. melanogaster*: · — · — · — · — · — · — ; *D. simulans*: —————).

intermediária entre a de D. simulans de um lado e as de D. hydei e D. ananassae de outro.

Em relação às 22 primeiras leveduras, enquanto a frequência acumulada de D. hydei é quase 90%, a de D. simulans está pouco acima de 70%. Para D. melanogaster e D. kikkawai o percentual atingido é 80% e para D. ananassae cerca de 85%. As frequências acumuladas atingem 50% aproximadamente, com 7 leveduras de D. hydei, 8 em D. kikkawai e D. melanogaster, 10 em D. ananassae e 12 em D. simulans. Esses dois tipos de observações mostram, em síntese, que D. hydei se concentrou em um número menor de leveduras, ocorrendo o oposto com D. simulans, isto é, a um mesmo número de leveduras corresponde uma concentração menor de moscas. Para as outras 3 espécies a situação é intermediária.

Os resultados obtidos nos testes de atração (tabelas 2 a 6), também permitem verificar a possibilidade de uma atração diferencial dos 2 sexos em cada levedura. Essa hipótese foi testada em cada caso, por meio de χ^2 de igualdade para a proporção 1:1.

Das 220 proporções sexuais analisadas (44 por espécie de Drosophila), apenas 11 mostraram desvios significativos, (tabela 12) sendo 3 referentes a D. ananassae, 4 a D. hydei, 1 a D. melanogaster e 3 a D. simulans. Em 4 casos (1 de D. simulans e 3 de D. ananassae), predominaram machos, nos demais predominaram fêmeas. Embora os números de moscas sejam baixos na maioria dos casos, esses resultados, tomados como uma indicação preliminar de atração dife

Tabela 12: Razões de sexo diferentes de 1:1 nos experimentos na caixa de atração (*:P<0,05; **:P<0,01).

<u>Drosophila</u>	Levedura	Fêmea	Macho	χ^2	
A	19-HAP	5	18	7,34	**
	33-SAI	2	7	9,00	**
	40-TOE	-	5	5,00	*
H	1-CAA	10	2	5,34	*
	8-CAT	16	6	4,54	*
	23-KLA	33	16	5,90	*
	25-LES	21	6	8,34	**
M	27-PIE	24	11	4,82	*
S	23-KLA	49	76	5,84	*
	25-LES	46	25	6,20	*
	31-RHG	20	5	9,00	**

rencial em relação ao sexo, podem ser considerados uma hipótese de trabalho.

As 5 leveduras mais favoráveis e as 5 menos favoráveis, para cada espécie de Drosophila (tabela 8), foram utilizadas simultaneamente em novo teste de atração. Como a caixa comporta 22 garrafas, cada uma das 10 leveduras foi inoculada em duas garrafas, ficando as duas restantes sem microrganismos. Com esse novo teste pretendeu-se procurar uma confirmação das preferências observadas nos testes anteriores, agora em associações diferentes das mesmas leveduras.

As tabelas 13 a 17 mostram, em números absolutos e em porcentagem, das moscas atraídas para as mesmas leveduras nos dois experimentos. As 5 primeiras representam as espécies mais atrativas para cada espécie de Drosophila e as 5 últimas as menos atrativas. Apesar das condições não serem as mesmas nos dois experimentos, com respeito ao agrupamento das espécies de levedura e a disposição das mesmas na caixa, ou seja, das espécies de microrganismo vizinhos, verificou-se uma concordância muito acentuada dos dois experimentos.

As espécies de moscas que apresentaram indivíduos atraídos para garrafas com meio da cultura isento de leveduras foram D. ananassae, D. hydei e D. kikkawai, porém em números muito baixos. Estes dados estão indicando portanto, que para essas 5 espécies de Drosophila há necessidade de atrativos especiais, como leveduras.

Tabela 13: Números de moscas de D. ananassae captura das nas 5 leveduras mais favoráveis e nas 5 menos favoráveis, em 2 experimentos.

Leveduras	1º Experimento		2º Experimento	
	Nº	%	Nº	%
31-RHG	129	34,2	24	8,8
27-PIE	69	18,3	118	43,4
8-CAT	66	17,8	24	8,8
34-SAR	56	14,8	27	10,0
21-HAV	46	12,2	33	12,1
38-TOC	1	0,3	12	4,4
1-CAA	1	0,3	3	1,1
16-HAB	2	0,5	20	7,4
4-CAM	3	0,8	2	0,7
29-PIP	4	1,1	9	3,3
TOTAL	377	100	272	100
sem levedura	-	-	3	-

Tabela 14: Números de moscas de D. hydei capturadas nas 5 leveduras mais favoráveis e nas 5 menos favoráveis, em 2 experimentos.

Levedura	1º Experimento		2º Experimento	
	Nº	%	Nº	%
19-HAP	75	27,4	8	7,8
35-SAL	73	26,6	14	13,7
23-KLA	49	17,8	22	21,6
7-CAP	43	15,7	12	11,8
9-CAT	31	11,3	31	30,4
31-RHG	0	0	0	0
20-HAS	0	0	5	4,9
11-CRM	1	0,4	2	2,0
26-LES	1	0,4	4	3,9
34-SAR	1	0,4	4	3,9
TOTAL	274	100	102	100
sem levedura	-	-	2	-

Tabela 15: Números de moscas de D. kikkawai capturadas nas 5 leveduras mais favoráveis e nas 5 menos favoráveis, em 2 experimentos.

Levedura	1º Experimento		2º Experimento	
	Nº	%	Nº	%
30-PIV	119	29,8	64	18,1
20-HAS	87	21,8	58	16,4
17-HAC	75	18,8	26	7,4
31-REG	49	12,2	56	15,8
16-HAB	48	12,0	47	13,3
11-CRM	1	0,2	10	2,8
40-TOE	4	1,0	22	6,2
12-CRA	5	1,2	33	9,3
14-ENB	6	1,5	18	5,1
1-CAA	6	1,5	20	5,6
TOTAL	400	100	354	100
sem levedura	-	-	7	-

Tabela 16: Números de moscas de D. melanogaster capturadas nas 5 leveduras mais favoráveis e nas 5 menos favoráveis, em 2 experimentos.

Levedura	1º Experimento		2º Experimento	
	Nº	%	Nº	%
35-SAL	81	22,0	111	25,0
30-PIV	73	19,8	71	16,0
29-PIP	72	19,6	63	14,2
6-CAP	64	17,4	119	26,9
38-TOC	57	15,5	34	7,7
25-LES	2	0,6	20	4,5
43-TRP	3	0,8	7	1,6
8-CAT	4	1,2	8	1,8
14-ENB	5	1,5	7	1,6
18-HAC	6	1,6	3	0,7
TOTAL	367	100	443	100
sem levedura	-	-	0	-

Tabela 17: Números de moscas de D. simulans capturadas nas 5 leveduras mais favoráveis e nas 5 menos favoráveis, em 2 experimentos.

Levedura	1º Experimento		2º Experimento	
	Nº	%	Nº	%
23-KLA	125	27,6	25	4,5
3-CAM	74	13,3	141	25,8
25-LES	71	15,6	50	9,2
7-CAP	69	15,2	150	27,5
33-SAI	60	13,2	62	11,4
24-LEG	9	2,0	11	2,0
5-CAM	10	2,3	10	1,8
36-SPJ	11	2,4	7	1,2
14-ENB	12	2,6	79	14,4
17-HAC	13	2,9	12	2,2
TOTAL	454	100	547	100
sem levedura	-	-	0	-

Considerando-se os percentuais relativos as leveduras menos procuradas pelas moscas, os valores são na sua grande maioria baixos nos 2 experimentos, não ultrapassando 5%. Do mesmo modo, são elevados os percentuais relativos às leveduras mais procuradas. Entretanto, algumas exceções devem ser registradas, quanto as frequências observadas no 2º experimento. As mais marcantes são a frequência 7,4% de D. ananassae em Hansenula beijerinckii, 7,8% de D. hydei em Hansenula polymorpha, 9,3% de D. kikkawai em Cryptococcus albicus e para D. simulans, 4,5% em Kloeckera africana e 14,4% em Endomycopsis bispora. A explicação para estes resultados discordantes talvez possam ser as associações diferentes das leveduras nos dois experimentos.

Todavia o número de concordâncias entre os resultados dos 2 experimentos é muito elevado para se admitir uma distribuição casual das moscas. De um modo geral, as preferências das 5 espécies de Drosophila recaíram sobre as mesmas leveduras nos dois experimentos. Destacam-se sobremaneira as concordâncias, mostrando na maioria dos casos que a preferência ou rejeição de uma levedura parece não depender, via de regra, das demais leveduras presentes no ambiente.

A figura 4 apresenta graficamente as somas dos percentuais de moscas encontradas nas 5 leveduras preferidas dos 2 experimentos. As barras mostram que nas leveduras mais atrativas, foram capturados nos dois experimentos, mais de 75% das moscas, com exceção de D. kikkawai, no 2º ex

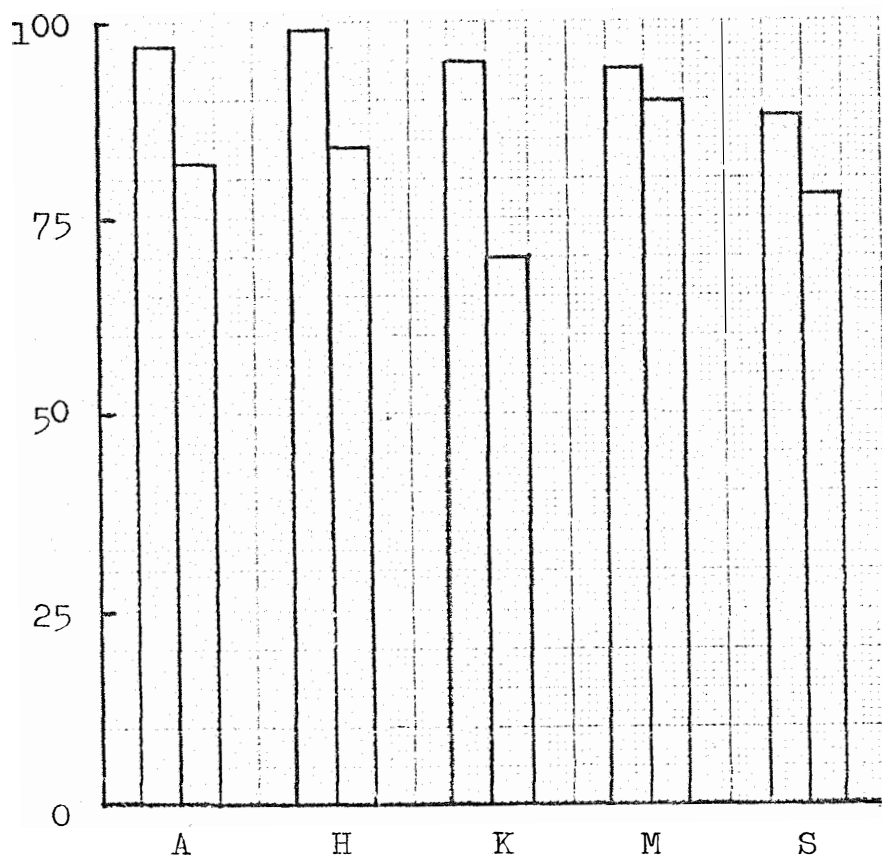


Figura 4 - Percentuais (ordenada) de m^{Os} cas das 5 espécies de Drosophila (abscissa), capturadas nas 5 leveduras mais favoráveis, em 2 experimentos (à esquerda= 1º experimento; à direita= 2º experimento).

perimento, com 70%.

Coincidentemente todas espécies de Drosophila mostraram uma queda no número total de moscas capturadas nas 5 leveduras mais atrativas, no 2º experimento em relação ao primeiro; entretanto, isso não foi acentuado a ponto de obscurecer a demonstração das preferências das moscas pelas espécies de levedura.

5.3. Coletas na natureza

Com o objetivo de confrontar o comportamento de moscas em relação às leveduras, nas condições controladas do laboratório com comportamento em populações naturais, foram programadas 3 coletas na natureza, sendo uma em Jaboticabal (20/09/77) e duas em Olímpia (29/07/77) e (01/11/77).

Foram escolhidas 4 leveduras: Pichia vini, Saccharomyces ludwigii, Candida macedoniensis e Pichia etchellsii. Essas leveduras, conforme se vê na tabela 8, estão situadas entre as 10 primeiras quanto ao número de moscas atraídas na caixa. À vista dos resultados obtidos na caixa poder-se-ia esperar que, quando essas leveduras fossem expostas simultaneamente na natureza, D. ananassae fosse a traída em maior número para Pichia etchellsii, D. hydei para Saccharomyces ludwigii, D. kikkawai para Pichia vini, D. melanogaster para Pichia vini e Saccharomyces ludwigii e D. simulans para Candida macedoniensis. Por outro lado, em Pichia vini deveriam predominar D. kikkawai e D. melanogaster.

ter ; as espécies esperadas como predominantes em C. macedo-
niensis e P. etchellsii eram D. simulans e D. ananassae, res
pectivamente.

Conforme foi descrito em Material e Métodos ,
iscas das 4 espécies de levedura foram dispostas nos 4 vér
tices de um quadrado de cerca de 80 cm de lado. A proximida
de das 4 leveduras deveria determinar uma distribuição ca
sual das moscas, na ausência de atração diferencial. Desse
modo, as condições na natureza foram extremamente diversas
das condições na caixa de atração, principalmente pela im
possibilidade de assepsia permanente das iscas e pela exis
tência de moscas de diferentes espécies, em frequências des
conhecidas. Mesmo assim, esse procedimento experimental, em
bora com limitações, afigurou-se como eficiente e prático pa
ra teste preliminar que permitisse verificar a validade dos
resultados de laboratório, em ambiente natural.

A tabela 18 mostra os números de indivíduos a
traídos para as 4 espécies de levedura, nas 3 coletas reali
zadas na natureza (N_1 e N_2 em Olímpia e N_3 em Jaboticabal) e,
para confronto, são apresentados também os números de moscas
capturadas nos ensaios com a caixa de atração (IA). Os dados
desta tabela estão representados graficamente na figura 5.
As barras de cada gráfico somam 100% e correspondem às fre
quências da espécie em cada uma das 4 leveduras.

Não se verifica uma concordância absoluta en
tre os resultados na natureza e os esperados com base no o
corrido na caixa de atração. Entretanto algumas concordâncias

Tabela 18: Números de moscas das 5 espécies atraídas em 4 espécies de leveduras em um experimento de laboratório (LA) e 3 na natureza (N_1 , N_2 e N_3).

<u>Drosophila</u>		Levedura				Total
		3-CAM	27-PIE	30-PIV	35-SAL	
A	LA	44	94	31	16	185
	N_1	13	35	15	12	75
	N_2	-	12	6	6	24
	N_3	7	15	4	-	26
H	LA	14	9	21	44	88
	N_1	20	11	21	2	54
	N_2	1	2	1	1	5
	N_3	2	1	2	-	5
K	LA	14	19	91	33	157
	N_1	-	-	6	-	6
	N_2	-	1	-	-	1
	N_3	1	1	1	-	3
M	LA	38	35	72	96	241
	N_1	26	6	74	47	153
	N_2	-	12	11	12	35
	N_3	1	6	13	-	20
S	LA	108	39	38	29	214
	N_1	282	341	854	426	1903
	N_2	19	215	102	75	411
	N_3	121	228	120	10	479
TOTAL		711	1082	1483	809	4085

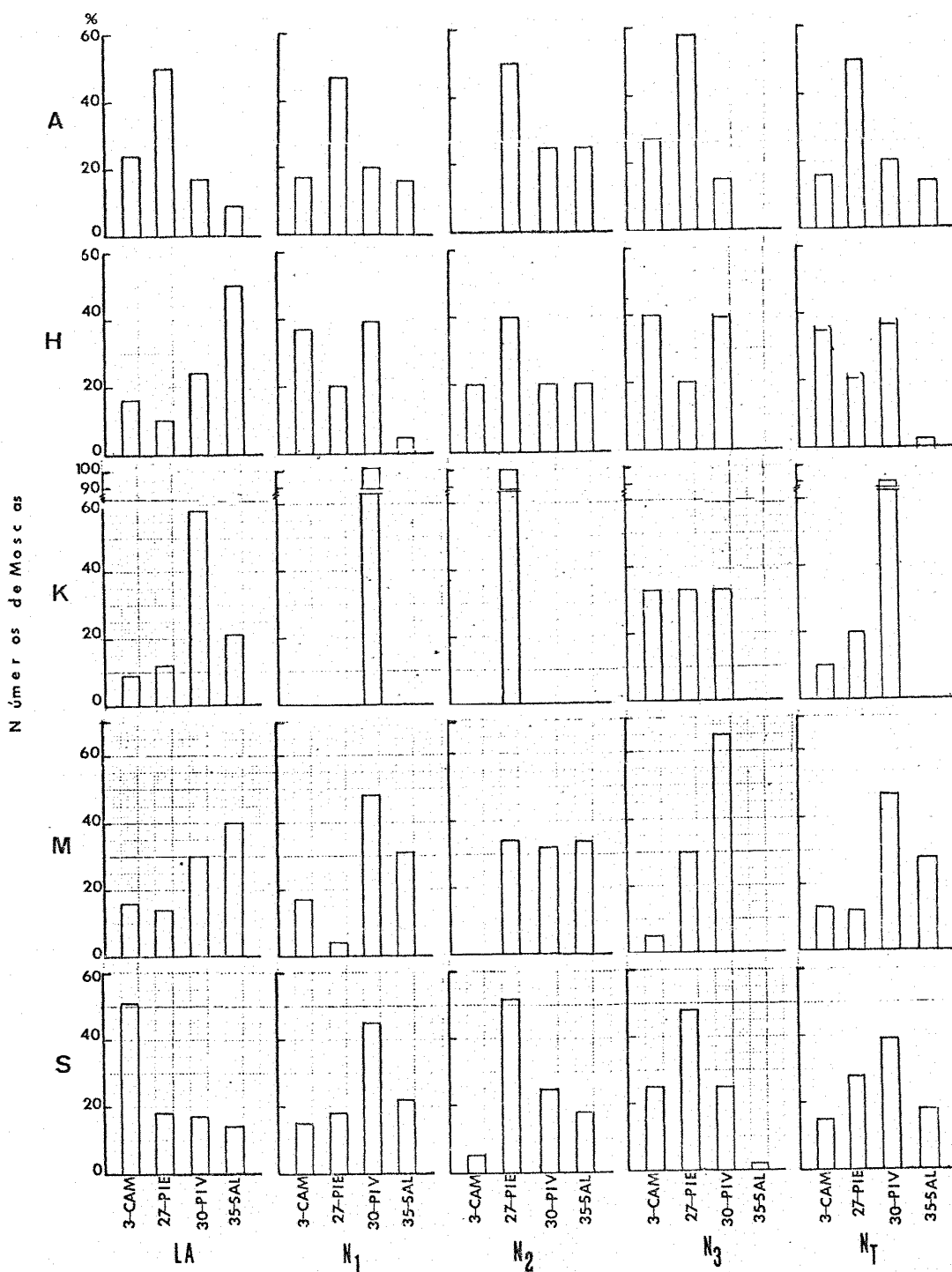


Figura 5 - Frequências percentuais (Ordenada) das 5 espécies de *Drosophila*, em 4 espécies de levedura (abscissa), em um experimento de laboratório (LA) e 3 experimentos na natureza (N₁, N₂ e N₃; N_T = total da natureza).

são relevantes e devem ser destacadas.

Como era esperado, nas 3 coletas da natureza, Pichia etchellsii foi a levedura que atraiu maior número de exemplares de D. ananassae. Embora o número de moscas de D. kikkawai capturadas tenha sido muito pequeno, essa espécie predominou em Pichia vini, como também era esperado.

Quanto a D. melanogaster, os resultados não parecem suficientes para contradizer as expectativas. Na primeira coleta realizada em Olímpia (N_1) a espécie predominou em Pichia vini e Saccharomyces ludwigii; na segunda (N_2), os números de moscas atraídas para essas duas leveduras foram semelhantes ao de Pichia etchellsii. Na coleta de Jaboticabal (N_3) houve predominância em Pichia vini. No total das 3 coletas da natureza (N_T) a predominância da espécie é marcante em Pichia vini e Saccharomyces ludwigii, também como era esperado.

Em todas as coletas na natureza a espécie predominante foi D. simulans. O número elevado de moscas pode ter mascarado a caracterização da atração diferencial exercida pelas espécies de microrganismo, não ocorrendo o esperado, isto é, maior incidência em Candida macedoniensis. Entretanto no experimento de laboratório, D. simulans ocorreu com frequência aproximadamente iguais e relativamente altas em Pichia etchellsii, Pichia vini e Saccharomyces ludwigii: nas duas coletas realizadas em Olímpia (N_1 e N_2), D. simulans ocorreu em números elevados nessas 3 leveduras, bem como no total das 3 coletas da natureza (N_T). Apenas na segun

da coleta realizada em Olímpia (N₂) foi acentuadamente baixo o número de exemplares em Candida macedoniensis, com 19 moscas.

Excluída D. simulans, a espécie mais comum na natureza foi D. ananassae, predominando em Pichia etchellsii com 62 moscas nas 3 coletas contra um total de 40 para D. hydei, D. kikkawai e D. melanogaster. Excluída ainda D. simulans, D. melanogaster foi a espécie predominante, em Pichia vini, com 98 indivíduos, seguida por D. ananassae com 25 e D. hydei mais D. kikkawai com 31. Em Saccharomyces ludwigii, D. melanogaster também foi a espécie predominante, com 59 indivíduos excluindo-se de novo D. simulans. Esses resultados são perfeitamente compatíveis com as expectativas referidas anteriormente.

Quanto a D. hydei, não há concordância clara entre os resultados de laboratório e da natureza. Predominando no laboratório em Saccharomyces ludwigii, foi extremamente rara nesta levedura na natureza, correspondendo no total das 3 coletas a apenas 3 moscas. As outras 3 leveduras atraíram no laboratório 50% do total (44 em 88 moscas) e na natureza 96% (61 em 64 moscas).

Concordando ainda com os resultados de laboratório, Pichia vini (veja tabela 8) foi a levedura mais atrativa, propiciando a captura de 886 moscas, o que corresponde a 28% do total das 5 espécies (3200). Como é sabido, por trabalhos de diversos autores, ocorrem flutuações tempo

rais nas populações naturais de Drosophila, correspondendo a variações do tamanho populacional e das frequências das diferentes espécies. Por essa razão, os resultados obtidos nestas 3 coletas tornam recomendável o estudo de variações temporais e espaciais das populações naturais, utilizando iscas com leveduras conhecidas, conforme foi destacado na introdução deste trabalho.

5.4. Produtividade

Conforme encontra-se mencionado na Revisão de Literatura, devem ser distinguidos na natureza locais de criação (reprodução e desenvolvimento) e de nutrição (cf. Carson, 1951). A procura de leveduras pelas moscas pode estar relacionada com o encontro de fêmeas e machos para o acasalamento, com a ovoposição e o desenvolvimento e com a alimentação, não havendo necessariamente coincidências dessas funções para um mesmo local.

O estudo da produtividade das espécies de Drosophila, nos meios com diferentes leveduras, tem interesse como uma tentativa de determinação dos locais de ovoposição e desenvolvimento das moscas. A produtividade foi estudada contando-se os números de larvas e pupas produzidas nos meios com cada espécie de levedura, após um período de tempo, fixado em 8 dias.

A tabela 19 mostra para cada espécie de Drosophila, o número de leveduras em que ocorreu descendência

Tabela 19: Números de larvas + pupas das 5 espécies e produtividade média, por fêmea e por levedura.

<u>Drosophila</u>	Larvas + pupas	Fêmea		Levedura	
		N	Média	N	Média
A	603	382	1,58	23	26,22
H	125	213	0,59	14	8,93
K	396	502	0,79	32	12,38
M	2168	565	3,84	35	61,94
S	3131	682	4,59	41	76,37

(larvas e pupas), o número de fêmeas atraídas para essas leveduras e a produtividade total, por fêmea e por levedura.

D. simulans foi a espécie que se desenvolveu no maior número de leveduras (41) e D. hydei no menor (14). Igualmente essas duas espécies tiveram respectivamente a maior e a menor produtividades, tanto por fêmea (4,59 e 0,59) como por levedura (76,37 e 8,93); os valores de D. simulans são cerca de 8 vezes os de D. hydei. Para as outras 3 espécies, os valores foram intermediários. D. melanogaster, desenvolvendo-se em 35 leveduras, foi a segunda espécie mais produtiva, com quase 4 descendentes por fêmea e 60 por levedura.

A produtividade de D. ananassae (603), foi cerca de 1,5 vez maior que a de D. kikkawai (396) e quanto à produtividade média por fêmea, a de D. ananassae (1,58) foi o dobro da de D. kikkawai (0,79); quanto a produtividade por levedura a de D. ananassae (26,22) superou em mais que o dobro a de D. kikkawai (12,38). Enquanto esses resultados de D. kikkawai referem-se a 32 leveduras e cerca de 500 fêmeas, os de D. ananassae resultaram da ovoposição de pouco menos que 400 fêmeas em apenas 23 leveduras.

As espécies mais produtivas foram D. simulans e D. melanogaster, com respectivamente 49% (3131) e 34% (2168) do total.

As tabelas 20 a 24 são análogas das tabelas 2 a 6, porém referentes aos números de larvas e pupas que

se desenvolveram a partir das fêmeas capturadas nos testes de atração.

As constatações referentes à produtividade são da mesma natureza que as referentes a capacidade de atração das leveduras, podendo ser resumidas em dois itens: (a) as espécies de Drosophila diferem quanto ao número de larvas e pupas produzidas nos gêneros de leveduras representados por várias espécies; quando os totais de um gênero, referentes a 2 espécies de moscas são próximos, as diferenças se tornam específicas, isto é, produtividades diferentes em diferentes espécies de microrganismo; (b) as espécies de moscas diferem quanto ao número e as espécies de levedura em que se desenvolveram.

A tabela 20 apresenta os números de larvas e pupas das 5 espécies de Drosophila em leveduras do gênero Candida. Com exceção de C. muscorum e C. melinii, com 35 larvas e pupas, nas demais espécies esse número foi superior a 100, atingindo o máximo (321) em C. krusei. Quanto ao total de cada mosca nas 9 espécies de Candida, D. simulans foi a que apresentou maior número, isto é, 652 (47%); a seguir vieram D. melanogaster com 549 (40%), D. ananassae com 128 (9%). D. kikkawai e D. hydei somaram juntas as 4% restantes, com 54 moscas.

Observa-se que D. simulans apresentou cerca de 20% em relação ao total da produtividade em C. albicans (148), em C. krusei (144) e em C. macedoniensis (123), em

Tabela 20: Números de larvas + pupas das 5 espécies de Drosophila, produzidas em espécies de Candida

Levedura	<u>Drosophila</u>					Total
	A	H	K	M	S	
1-CAA	-	-	-	29	148	177
2-CAK	9	7	11	150	144	321
3-CAM	9	-	-	120	123	252
4-CAM	-	-	1	3	31	35
5-CAM	11	1	-	7	16	35
6-CAP	-	-	2	123	11	136
7-CAP	26	9	11	16	47	109
8-CAT	73	2	-	-	54	129
9-CAT	-	5	5	101	78	189
TOTAL	128	24	30	549	652	1383

quanto em C. pseudotropicalis representou apenas 2% (11) do total. D. melanogaster produziu 150 em C. krusei, 120 em C. macedoniensis, 123 em C. pseudotropicalis e 101 em C. tenuis, o que corresponde a mais de 18% do total das larvas e pupas de cada uma dessas leveduras; nas demais, os números foram baixos, inferiores a 30.

D. hydei e D. kikkawai, apresentaram números baixos de larvas e pupas nas espécies de Candida, D. ananassae apresentou em C. tropicalis 56% (73) do número total de indivíduos produzidos nesta espécie de levedura. Nota-se ainda que a produtividade de D. simulans em C. albicans foi 84% (148) do total e de D. melanogaster em C. pseudotropicalis atingiu 90% (123) do total.

A tabela 21 refere-se às leveduras do gênero Hansenula. A levedura mais produtiva foi H. anomala com 29% (233) do total e a menos produtiva foi H. californica com 5,5% (44). A espécie de mosca que apresentou maior número de larvas e pupas foi D. simulans com 48% (383) do total e a menos produtiva foi D. hydei com 2% (19).

D. simulans apresentou maiores produtividades em H. anomala com 48% (112), H. beijerinckii com 58% (76) e H. polymorpha com 84% (101).

Para D. melanogaster a levedura mais favorável foi H. saturnus com uma produtividade correspondente a 55% (119) do total e para D. kikkawai H. canadensis com 95% (54). D. ananassae e D. hydei foram as espécies menos

Tabela 21: Números de larvas + pupas das 5 espécies de Drosophila, produzidas em espécies de Hansenula.

Levedura	<u>Drosophila</u>					Total
	A	H	K	M	S	
13-HAA	32	7	4	78	112	233
16-HAC	-	7	19	29	76	131
17-HAC	-	-	54	-	3	57
18-HAC	2	-	10	-	32	44
19-HAP	10	5	4	-	101	120
20-HAS	27	-	11	119	59	216
TOTAL	71	19	102	226	383	801

produtivas nas leveduras do gênero Hansenula, representando respectivamente 9% (71) e 2% (19) da produtividade total nas 6 espécies de microrganismo .

Nos demais gêneros de levedura pode-se fazer observações análogas, o que levará à constatação de que os números de larvas e pupas produzidas nas espécies de microrganismo não são aleatórios.

Na tabela 22 encontram-se agrupadas espécies de levedura pertencentes aos gêneros Leucosporidium, Pichia e Torulopsis. Em Leucosporidium a levedura mais favorável foi L. stokesii com 86% (202) do total produzido e D. melanogaster (110) com 47% foi a mosca que apresentou maior número de larvas e pupas, neste microrganismo.

O gênero Pichia foi o que produziu maior número de larvas e pupas. As leveduras mais produtivas foram P. etchellsii (347) e P. vini (370). Na primeira predominou D. simulans com 54% (189) e na segunda D. melanogaster com 53% (196).

Em Torulopsis as espécies que apresentaram maior número de larvas e pupas foram também D. simulans com 59% (321) e D. melanogaster com 39% (213).

Dos 101 exemplares de D. ananassae, 90 (89%) ocorreram no gênero Pichia e destes, 67 (74%) ocorreram em P. etchellsii. Quanto a D. hydei e D. kikkawai os números foram no geral baixos (menores que 30) em todas as leveduras em que estas espécies se desenvolveram.

Tabela 22: Números de larvas + pupas das 5 espécies de Drosophila, produzidas em espécies de Leucosporidium, Pichia e Torulopsis.

Levedura	<u>Drosophila</u>					Total
	A	H	K	M	S	
24-LEG	-	-	1	-	-	1
25-LES	7	25	-	-	-	32
26-LES	-	-	22	110	70	202
TOTAL	7	25	23	110	70	235
27-PIE	67	-	12	79	189	347
28-PIF	-	-	7	73	141	221
29-PIP	-	23	11	129	58	221
30-PIV	23	19	29	196	103	370
TOTAL	90	42	59	477	491	1159
38-TOC	-	-	3	136	27	166
39-TOD	2	-	5	-	79	86
40-TOE	-	-	-	7	83	90
41-TOP	2	-	1	70	132	205
TOTAL	4	-	9	213	321	547

Na tabela 23 encontram-se agrupados os gêneros representados por duas espécies de leveduras. O de maior produtividade foi Saccharomyces (522) e o de menor foi Criptomococcus (238). D. simulans apresentou maior número de indivíduos que as demais moscas em Rhodotorula com 43% (131), em Saccharomyces com 51% (265) e em Tricosporon com 68% (179), enquanto D. melanogaster predominou em Cryptococcus, com 56% (134).

Verifica-se que D. ananassae não apresentou descendentes nas leveduras dos gêneros Cryptococcus e Tricosporon (tabela 23) e D. hydei em Rhodotorula e Saccharomyces (tabela 23). Dos 101 exemplares de D. kikkawai, 79 (78%) ocorreram em Rhodotorula glutinis.

Neste trabalho foram usados representantes de 19 gêneros de leveduras, dos quais 10 estão representados por apenas uma espécie. Nas 10 espécies de levedura representantes desses gêneros (tabela 24), D. hydei só deixou descendentes em Kloeckera africana, D. melanogaster em todas as espécies, D. simulans em 9, D. kikkawai em 7 espécies e D. ananassae em 6 leveduras.

Excluída Kloeckera africana para D. simulans, com 158 exemplares, a segunda maior produtividade foi para D. ananassae em Hanseniaspora valbyensis, com 97, o que corresponde a 10% do total produzido nos 10 gêneros. Verifica-se também que D. ananassae e D. melanogaster tiveram produtividades aproximadamente iguais, porém enquanto D. ananassae se desenvolveu em 6 leveduras, D. melanogaster ocorreu

Tabela 23: Números de larvas + pupas das 5 espécies de Drosophila, produzidas em espécies de Cryptococcus, Rhotorula, Saccharomyces e Tricosporon.

Levedura	<u>Drosophila</u>					Total
	A	H	K	M	S	
11-CRM	-	-	-	6	35	41
12-CRA	-	1	1	128	67	197
TOTAL	-	1	1	134	102	238
31-RHG	62	-	79	-	81	222
32-RHR	11	-	4	16	50	81
TOTAL	73	-	83	16	131	303
33-SAI	-	-	-	152	162	314
34-SAR	50	-	13	42	103	208
TOTAL	50	-	13	194	265	522
42-TRA	-	10	-	72	107	189
43-TRP	-	-	4	-	72	76
TOTAL	-	10	4	72	179	265

Tabela 24: Números de larvas + pupas das 5 espécies de Drosophila, produzidas em leveduras pertencentes a 10 gêneros.

Levedura	<u>Drosophila</u>					Total
	A	H	K	M	S	
10-CIM	-	-	2	9	73	84
13-DEH	-	-	2	60	67	129
14-ENB	11	-	25	14	-	50
21-HAV	97	-	7	9	34	147
22-KHW	4	-	-	3	28	35
23-KLA	52	4	9	18	158	241
35-SAL	14	-	1	5	61	81
36-SPJ	-	-	-	3	7	10
37-SCS	2	-	-	6	74	82
44-TRV	-	-	26	50	35	111
TOTAL	180	4	72	177	537	970

nas 10.

Os experimentos de atração foram realizados em ausência de competição, como já foi mencionado. Em consequência a produtividade também foi estudada nessas condições. A tabela 25, construída como a tabela 8, mostra a ordenação decrescente das espécies de levedura quanto ao número de larvas e pupas produzidas. Assim, as 370 larvas e pupas produzidas em Pichia vini foram tomadas como 100% e os números correspondentes às demais leveduras estão expressos como percentuais de 370. Para cada levedura, os números de descendentes de cada espécie de Drosophila estão calculados como percentuais dos respectivos percentuais de 370.

Considerando as 44 espécies de microrganismo, D. simulans deixou maior número de descendentes em relação às demais moscas, em 28 leveduras, D. melanogaster em 10, D. kikkawai em 3, D. ananassae em duas e D. hydei em uma levedura. As espécies de levedura nas quais ocorreram maiores números de descendentes foram Hanseniaspora valbyensis para D. ananassae, Pichia vini para D. hydei e D. melanogaster, Rhodotorula glutinis para D. kikkawai e Pichia etchellsii para D. simulans. Assim, D. hydei e D. melanogaster apresentaram um maior número de indivíduos na mesma espécie de levedura, enquanto D. simulans em uma espécie diferente mas do mesmo gênero.

Comparando-se as ordenações das leveduras nas tabelas 8 e 25, verifica-se que das 10 mais atrativas, 5 en

Tabela 25: Números totais de larvas + pupas desenvolvidas nas 44 espécies de leveduras (explicações no texto)

Levedura	Nº	%	Drosophila				
			A	H	K	M	S
30-PIV	370	100,0	6,22	5,16	7,84	52,95	27,83
27-PIE	347	93,8	18,11		3,24	21,36	51,09
2-CAK	321	86,8	2,43	1,89	2,97	40,57	38,94
33-SAI	314	84,9				41,10	43,80
3-CAM	252	68,1	2,43			32,43	33,24
23-KLA	241	65,1	14,05	1,09	2,43	4,86	42,67
15-HAA	233	63,0	8,66	1,90	1,08	21,09	30,27
31-RHG	222	60,0	16,76		21,35		21,89
28-PIF	221	59,7			1,89	19,72	38,09
29-PIP	221	59,7		6,23	2,97	34,85	15,65
20-HAS	216	58,4	7,30		2,97	32,17	15,96
34-SAR	208	56,2	13,51		3,51	11,35	27,83
41-TOP	205	55,4	0,54		0,27	18,92	35,67
26-LES	202	54,6			5,94	29,73	18,92
12-CRA	197	53,2		0,27	0,27	34,57	18,09
9-CAT	189	51,1		1,35	1,35	27,31	21,09
42-TRA	189	51,1		2,70		19,47	28,93
1-CAA	177	47,8				7,83	39,97
38-TOC	166	44,9			0,81	36,78	7,31
21-HAV	147	39,7	26,20		1,89	2,43	9,18
6-CAP	136	36,8			0,54	33,28	2,98
16-HAB	131	35,4		1,89	5,13	7,84	20,54
8-CAT	129	34,9	19,75	0,54			14,61
13-DEH	129	34,9			0,54	16,23	18,13
19-HAP	120	32,4	2,70	1,35	1,08		27,27
44-TRV	111	30,0			7,03	13,51	9,46
7-CAP	109	29,4	7,01	2,43	2,97	4,32	12,68
40-TOE	90	24,3				1,89	22,41
39-TOD	86	23,2	0,54		1,35		21,35
10-CIM	84	22,7			0,54	2,43	19,73
37-SCS	82	22,2	0,54			1,62	20,04
32-RHR	81	21,9	2,97		1,08	4,32	13,53
35-SAL	81	21,9	3,78		0,27	1,35	16,50
43-TRP	76	20,5			1,08		19,42
17-HAC	54	14,6			14,60		
14-ENB	50	13,5	2,97		6,74	3,78	
18-HAC	44	11,9	0,54		2,70		8,66
11-CRM	41	11,2				1,64	9,56
4-CAM	35	9,4			0,27	0,80	8,33
5-CAM	35	9,4	2,95	0,27		1,88	4,30
22-KHW	35	9,4	1,07			0,80	7,53
25-LES	32	8,6	1,88	6,72			
36-SPJ	10	2,7				0,81	1,89
24-LEG	1	0,3			0,30		
Total relativo		1735,0	163,00	33,80	107,00	585,90	845,30
absoluto	6420		603	125	396	2168	3128

contram-se entre as 10 de maior produtividade: Pichia vini, P. etchellsii, Candida macedoniensis, Kloeckera africana e Rhodotorula glutinis. Das 10 menos atrativas, 6 encontram-se entre as 10 de menor produtividade: Candida melinii, C. muscorum, Cryptococcus macerans, Khuyveromyces wickerhamii, Leucosporidium gelidum e Sporidiobolus johnsonii. Chamam a atenção Pichia vini e Leucosporidium gelidum, respectivamente a primeira e a última levedura, na ordem de atração (tabela 8) e de produtividade (tabela 25).

A análise da tabela 25, permite verificar que em 5 espécies de microrganismo foram encontrados descendentes das 5 espécies de Drosophila, em 12 microrganismos encontram-se representantes de 4 espécies de moscas em 17 de 3, em 9 de duas espécies de moscas e em apenas 1 microrganismo foi encontrada uma só espécie de mosca.

Tomando os 5 valores mais altos apresentados por cada mosca nas espécies de levedura da tabela 25, pode ser verificado que alguns microrganismos ocorreram em tais grupos para mais de uma espécie de Drosophila. Assim, Kloeckera africana e Pichia etchellsii foram encontradas entre as leveduras de maior produtividade de D. ananassae e D. simulans; Rhodotorula glutinis nos grupos de D. ananassae e D. kikkawai; Pichia vini para D. hydei, D. kikkawai e D. melanogaster; Pichia polymorpha para D. hydei e D. melanogaster, enquanto Saccharomyces italicus e Candida krusei ocorreram nos grupos de D. melanogaster e D. simulans.

Além dessas observações gerais, algumas específicas devem ser ressaltadas. A melhor levedura para o desenvolvimento de D. hydei é Leucosporidium scottii, uma das 10 últimas na tabela 25 e também a sexta levedura mais atrativa de D. hydei. Por outro lado, das 396 larvas e pupas produzidas por D. kikkawai, cerca de 34% ocorreram em duas leveduras, 79 em Rhodotorula glutinis e 54 em Hansenula canadensis. Embora D. ananassae tenha se desenvolvido em 23 leveduras, dos 603 descendentes, 534 (88%) ocorreram apenas em 6 leveduras (Candida tropicalis, Hanseniaspora valbyensis, Kloeckera africana, Pichia etchellsii, Rhodotorula glutinis e Saccharomyces rouxii). A figura 6, construída a semelhança da figura 2 referente a atração, mostra a distribuição das frequências de leveduras em relação aos números de larvas e pupas produzidas.

D. ananassae, D. hydei e D. kikkawai produziram descendentes em número igual ou inferior a 20 em respectivamente 13, 12 e 26 espécies de levedura. Por outro lado, para D. melanogaster e D. simulans foram respectivamente 21 e 37 os números de leveduras com produtividade superior a 20.

Os experimentos realizados permitem um estudo indireto das relações entre a capacidade de atração das leveduras e o desenvolvimento de descendentes. Utilizando os números de fêmeas atraídas em cada levedura e os números respectivos de larvas e pupas produzidas, foram construídos os

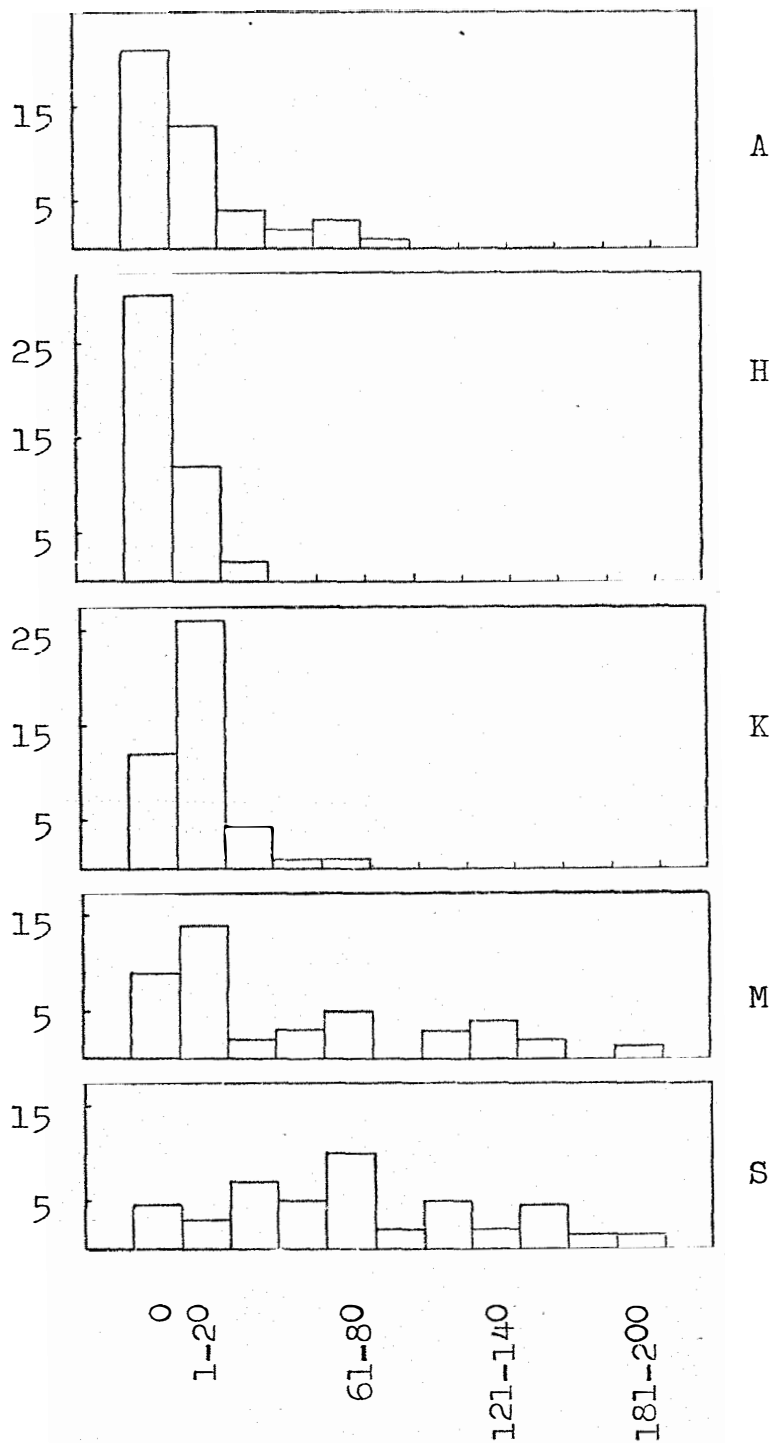


Figura 6: Distribuição, para as 5 espécies de *Drosophila*, das frequências de larvas + pupas produzidas nas 44 leveduras. Ordenada: número de leveduras. Abscissa: número de larvas + pupas.

gráficos de correlação das figuras 7, 8 e 9. Nesses gráficos foram colocados em abscissa os números de fêmeas atraídas em cada levedura e em ordenada os respectivos números de larvas e pupas.

Tomando por base um quadrado hipotético de cotas 25, os pontos nele situados correspondem às espécies de levedura que atraíram um pequeno número de fêmeas e produziram um número também pequeno de larvas e pupas. Para D. ananassae, situam-se nesse quadrado os pontos referentes a 35 espécies de levedura, indicando que apenas para 9 microrganismos o número de fêmeas atraídas e/ou produtividade tem valores superiores a 25. Para D. hydei, D. kikkawai, D. melanogaster e D. simulans localizam-se no quadrado hipotético pontos correspondentes a 41, 37, 22 e 6 espécies de levedura, respectivamente.

Das 9 leveduras de D. ananassae (figura 7) situadas fora do quadrado hipotético, Hansenula anomala corresponde a uma produtividade 32, para um número 8 vezes menor de fêmeas atraídas. Para Rhodotorula rubra produtividade e fêmeas atraídas correspondem a números aproximadamente iguais (cerca de 60). A maior produtividade, com quase 100 descendentes, resultou de pouco mais de 20 fêmeas, em Hanseniaspora valbyensis.

Comparando-se fêmeas atraídas e produtividade de D. hydei (figura 7), Saccharomyces ludwigii, Kloeckera africana e Hansenula polymorpha foram leveduras que atraíram

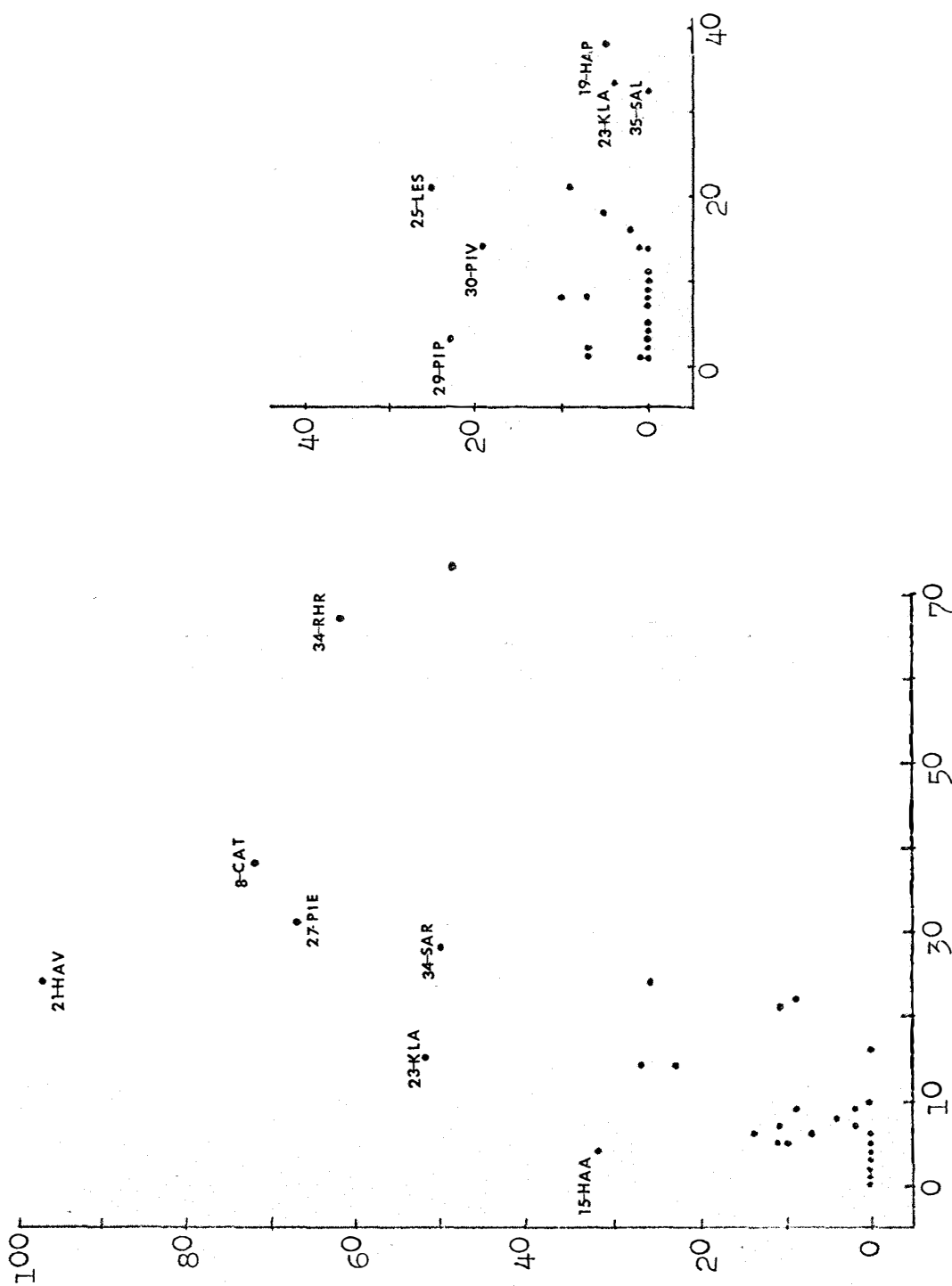


Figura 7: Correlação entre números de fêmeas atraídas (abscissa) e números de larvas + pupas produzidas em 44 espécies de leveduras para *D. ananassae* (esquerda) e *D. hydei* (direita).

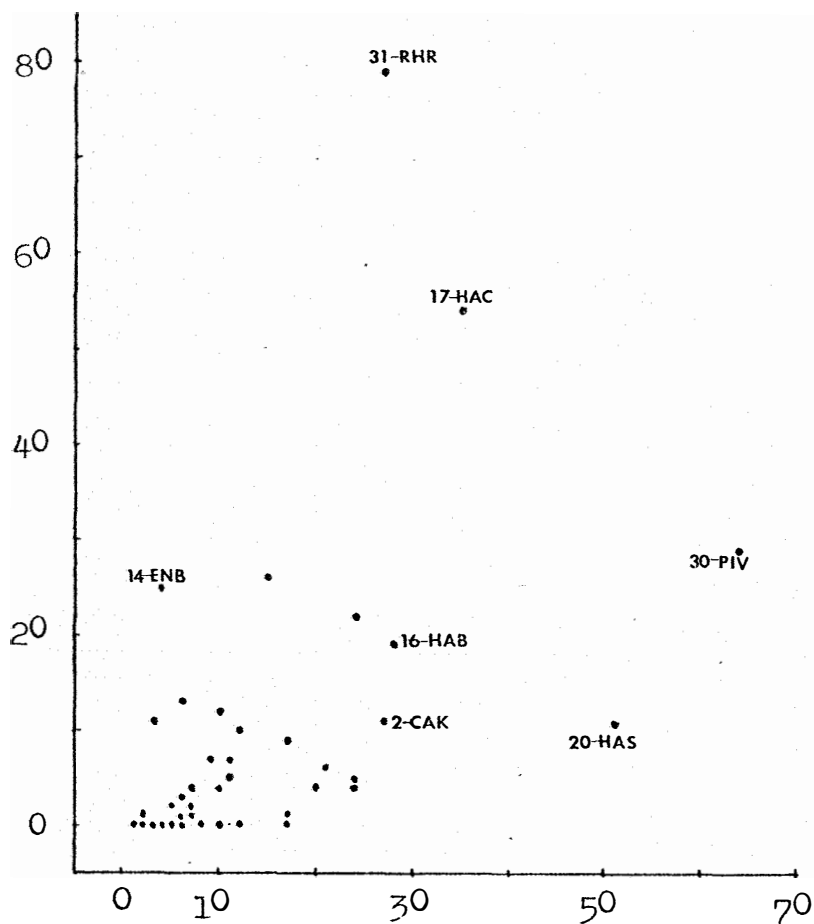


Figura 8: Correlação entre números de fêmeas atraídas (abscissa) e números de larvas + pupas produzidas em 44 espécies de levedura para D. kikkawai.

maior número de fêmeas, mas produziram 5, 4 e zero descendentes, respectivamente. Por outro lado, dentro do quadrado Pichia polymorpha atraiu 3 fêmeas e Leucosporidium scottii 21, as quais produziram respectivamente 23 e 25 descendentes.

Dos pontos fora do quadrado relativos a D. kikkawai (figura 8), em Candida krusei foram atraídas 27 fêmeas, em Hansenula beijerinckii 28 e Rhodotorula rubra 27, com produtividades 11, 19 e 79 respectivamente. Para Hansenula saturnus e Pichia vini foram atraídas mais de 50 fêmeas e as produtividades respectivas foram 11 e 29.

Dos 22 pontos de D. melanogaster (fig. 9), fora do quadrado hipotético, nas leveduras correspondentes a 6 deles (Tricosporon aculeatum, Hansenula anomala, Candida tenuis, Leucosporidium stokesii, Candida macedoniensis e Saccharomyces italicus foram atraídas 20 a 22 fêmeas, porém as respectivas produtividades variaram de 72 a 152. Saccharomyces ludwigii, foi a levedura que atraiu maior número de fêmeas (47) e na qual ocorreu uma das menores produtividades (5).

Quanto a D. simulans (figura 9) no intervalo correspondente a 15-20 fêmeas atraídas, são encontrados pontos correspondentes a 11 leveduras, com produtividade variando de 34 em Hanseniaspora valbyensis a 190 em Pichia etchellsii. Leucosporidium scottii atraiu 46 fêmeas, cuja produtividade foi nula.

Essas observações evidenciam variações acentuadas

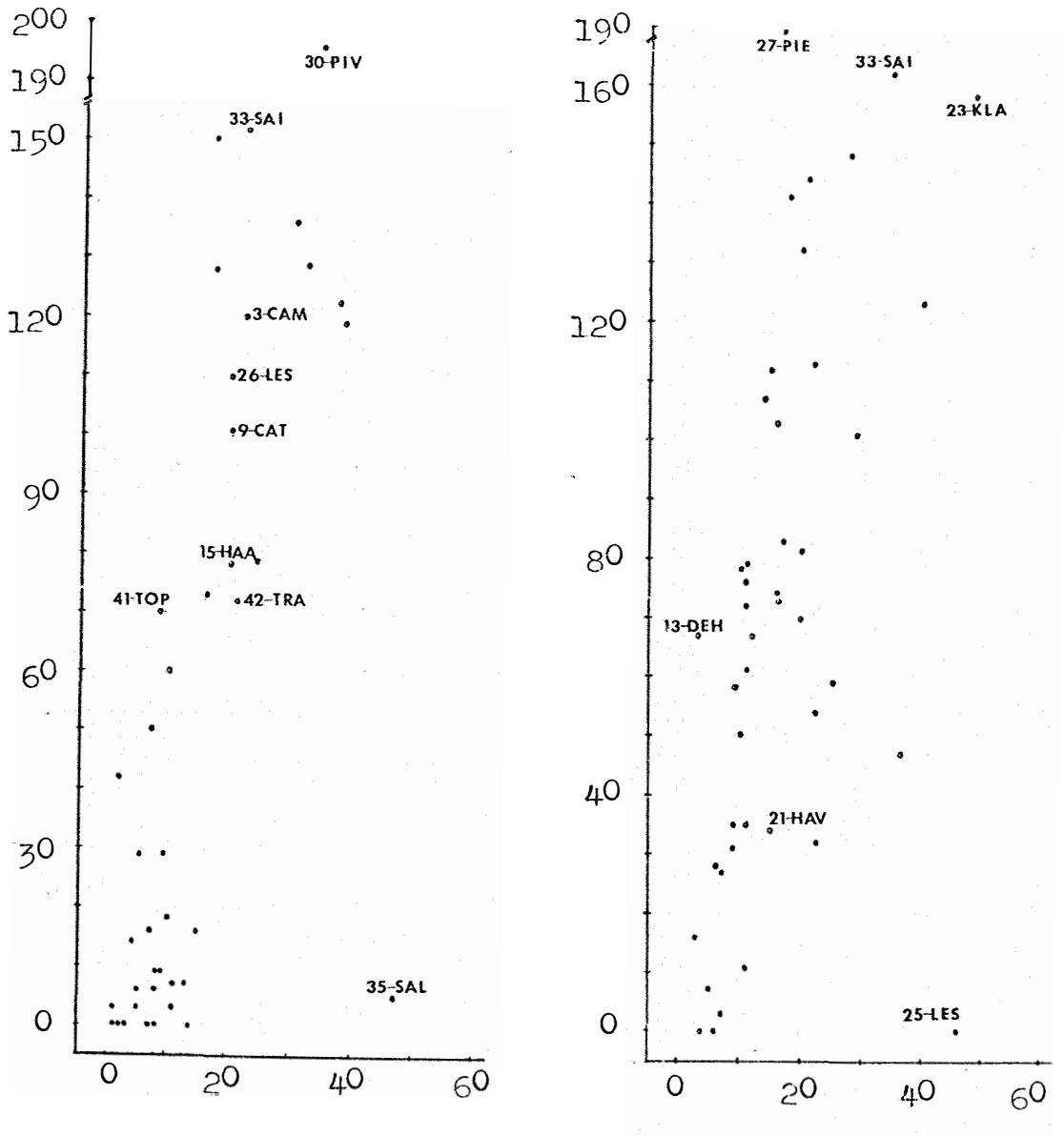


Figura 9: Correlação entre números de fêmeas atraídas (abscissa) e números de larvas + pupas produzidas em 44 espécies de levedura para *D. melanogaster* (esquerda) e *D. simulans* (direita).

adas entre as leveduras quanto à atração e à produtividade, as quais podem estar relacionadas com os locais de nutrição e de criação (acasalamento e desenvolvimento) da natureza. Ao mesmo tempo, essas figuras dão uma indicação da fecundidade das fêmeas, consideradas as leveduras nas quais os ovos foram depositados.

As tabelas 26 a 30 são análogas às tabelas 20 a 24, representando em cada levedura a produção média por fêmea, expressa em números de larvas e pupas.

Examinando-se as 5 tabelas verifica-se que produtividades superiores a 5 descendentes por fêmea ocorreram 18 vezes em D. simulans, 12 em D. melanogaster, 2 em D. hydei e 1 vez apenas em D. ananassae e D. kikkawai. Verifica-se também que D. kikkawai é a espécie que apresenta maior número de médias até 100, descendente por fêmea, o que ocorreu em 25 leveduras. Seguem-se, nas mesmas condições, D. ananassae com 10, D. hydei com 8, D. melanogaster com 7 e D. simulans com apenas 2.

As maiores médias para as 5 espécies de moscas foram 6,25 para D. kikkawai em Endomycopsis bispora, 7,67 para D. hydei em Pichia polymorpha, 8,00 para D. ananassae em Hansenula anomala, 11,12 para D. simulans em Pichia etchellsii e 21,00 para D. melanogaster em Saccharomyces rouxii. Essas 5 leveduras, como se vê na tabela 8, não foram as mais fortemente atrativas para as respectivas espécies de moscas: Endomycopsis bispora é para D. kikkawai a

40ª levedura mais atrativa, Pichia polymorpha a 34ª para D. hydei, Hansenula anomala a 24ª para D. ananassae, Pichia etchellsii a 12ª para D. simulans e Saccharomyces rouxii a 37ª para D. melanogaster.

A tabela 26 refere-se ao gênero Candida, mostrando variações acentuadas entre as 5 espécies de moscas. As maiores médias correspondem a D. melanogaster em C. krusei (8,82), C. macedoniensis (5,45) e C. pseudotropicalis (3,32) e D. simulans em C. muscorum (5,33) e C. tenuis (7,80).

A tabela 27 refere-se ao gênero Hansenula. Em H. anomala, D. ananassae, D. hydei e D. simulans apresentaram valores altos para a produtividade por fêmea, respectivamente 8,00, 7,00 e 7,47.

Consideradas as 44 leveduras, o fato mais comum foi uma espécie de Drosophila apresentar média acentuadamente superior às demais; mais raramente podem ser encontradas duas moscas com valores altos em uma mesma levedura, como D. melanogaster e D. simulans em Candida krusei, com médias 8,82 e 6,86 respectivamente. O único caso de 3 espécies de moscas apresentarem médias altas na mesma levedura é o de H. anomala, já mencionado.

Das produtividades por fêmea resultaram as seguintes médias e erros padrão: $0,94 \pm 0,22$ (N= 32) para D. kikkawai, $1,67 \pm 0,36$ (N= 23) para D. ananassae, $1,78 \pm 0,67$ (N= 14) para D. hydei, $4,15 \pm 0,65$ (N= 35) para D. melanogaster e $4,79 \pm 0,36$ (N= 41) para D. simulans. Uma análise de

Tabela 26: Números médios de larvas + pupas por fêmea, das 5 espécies de Drosophila, produzidas em espécies de Can-
didá.

Levedura	<u>Drosophila</u>				
	A	H	K	M	S
1-CAA	-	-	-	5,80	5,28
2-CAK	1,00	0,88	0,41	8,82	6,86
3-CAM	0,41	-	-	5,45	3,08
4-CAM	-	-	0,17	3,00	3,44
5-CAM	1,57	1,00	-	0,64	5,33
6-CAP	-	-	0,40	3,32	1,00
7-CAP	1,08	0,28	0,52	1,07	1,31
8-CAT	1,92	0,12	-	-	2,45
9-CAT	-	0,28	0,21	5,05	7,80

Tabela 27: Números médios de larvas + pupas por fêmea, das 5 espécies de Drosophila, produzidas em espécies de Hansenula.

Levedura	<u>Drosophila</u>				
	A	H	K	M	S
15-HAA	8,00	7,00	0,57	3,90	7,47
16-HAB	-	3,50	0,68	3,22	6,91
17-HAC	-	-	1,54	-	0,43
18-HAC	0,22	-	0,83	-	1,45
19-HAP	2,00	0,13	0,17	-	3,48
20-HAS	1,93	-	0,22	3,13	2,36

Tabela 28: Números médios de larvas + pupas por fêmea, das 5 espécies de Drosophila, produzidas em espécies de Leucosporidium, Pichia e Torulopsis.

Levedura	<u>Drosophila</u>				
	A	H	K	M	S
24-LEG	-	-	0,14	-	-
25-LES	1,17	1,19	-	-	-
26-LES	-	-	0,92	5,50	3,50
27-PIE	2,16	-	1,20	3,29	11,12
28-PIF	-	-	0,64	4,56	7,83
29-PIP	-	7,67	3,67	4,03	6,44
30-PIV	0,53	1,36	0,45	5,76	4,68
38-TOC	-	-	0,50	4,53	3,86
39-TOD	0,22	-	0,45	-	7,18
40-TOE	-	-	-	0,53	4,88
41-TOP	0,22	-	0,17	8,75	6,60

Tabela 29: Números médios de larvas + pupas por fêmea, das 5 espécies de Drosophila, produzidas em espécies de Cryptococcus, Rhodotorula, Saccharomyces e Tricosporon.

Levedura	<u>Drosophila</u>				
	A	H	K	M	S
11-CRM	-	-	-	1,20	3,18
12-CRA	-	0,07	0,50	7,53	5,58
31-RHG	0,92	-	2,93	-	4,05
32-RHR	2,20	-	0,20	2,28	5,00
33-SAI	-	-	-	6,91	4,63
34-SAR	1,78	-	2,17	21,00	6,44
42-TRA	-	1,25	-	3,42	7,64
43-TRP	-	-	0,40	-	6,54

Tabela 30: Números médios de larvas + pupas por fêmea, das 5 espécies de Drosophila, produzidas em leveduras pertencentes a 10 gêneros.

Levedura	<u>Drosophila</u>				
	A	H	K	M	S
10-CIM	-	-	0,28	1,25	4,56
13-DEH	-	-	0,28	6,00	8,38
14-ENB	0,52	-	6,25	3,50	-
21-HAV	4,04	-	0,78	1,00	2,27
22-KHW	0,50	-	-	0,60	4,67
23-KIA	3,47	0,12	0,53	1,80	3,22
35-SAL	2,33	-	0,06	0,11	5,54
36-SPJ	-	-	-	0,27	1,40
37-SCS	0,22	-	-	0,75	4,62
44-TRV	-	-	1,73	7,14	3,89

variância rejeita a homogeneidade destas distribuições sendo ($F_{4,140} = 14,381$, $P < 0,005$). Aplicado o teste de Tukey para detecção das diferenças significativas ($W_{0,01} = 2,03$), as médias de D. ananassae, D. hydei e D. kikkawai não diferem entre si mas diferem de D. melanogaster e D. simulans, entre as quais a diferença não é significativa.

A tabela 31 contém os valores dos coeficientes de correlação entre a produtividade total (tabelas 20 a 24) e a produtividade por fêmea (tabelas 26 a 30) para as 5 espécies de moscas. Todos os coeficientes são positivos, não sendo significativo apenas o referente a D. hydei. Entretanto, essas correlações estão longe de serem perfeitas, o maior coeficiente foi 0,585 para D. simulans. Isto se deve ao fato de existirem casos de uma produtividade média por fêmea alta, ser resultante de um pequeno número de moscas, indicando uma fraca atração de levedura; por outro lado, em outros casos, um número elevado de fêmeas foi atraído, resultando numa produtividade total baixa em consequência de uma produtividade por fêmea também baixa. O estudo das relações entre a capacidade de atração de uma levedura com a produtividade total e a produtividade média por fêmea, parece ser um caminho adequado para permitir a discriminação das funções de um local, quanto à nutrição e à criação de moscas.

Um segundo teste de produtividade, foi feito utilizando 3 leveduras para cada espécie de Drosophila. As leveduras escolhidas, assinaladas nas figuras 7 a 9, fo

Tabela 31: Coeficientes de correlação entre produtividade total e produtividade média por fêmea, para as cinco espécies de Drosophila (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$).

Espécies	gl.		t(bicaudal)
A	21	0,453	2,328 *
H	12	0,422	1,612
K	30	0,495	3,120 **
M	33	0,408	2,567 *
S	39	0,585	4,504 **

ram: Hansenula anomala, Hanseniaspora valbyensis e Kloeckera africana para D. ananassae; Leucosporidium scottii, Pichia vini para D. hydei; Endomycopsis bispora, Hansenula canadensis e Rhodotorula glutinis para D. kikkawai; Pichia vini, Saccharomyces italicus e Torulopsis pinus para D. melanogaster e Debaryomyces hansenii, Pichia etchellsii e Saccharomyces italicus para D. simulans.

A tabela 32 contém os resultados dos 2 experimentos, com os números totais de progênie e as produtividades médias por fêmea.

Os dados mostram que em D. ananassae houve uma correspondência entre os números totais de indivíduos produzidos nos 2 experimentos nas 3 leveduras, mas não para os valores da produção média por fêmea, que foi maior em Hansenula anomala no primeiro experimento (8,00) e em Hanseniaspora valbyensis no segundo (29,08).

Quanto a D. hydei não foi observada nenhuma correspondência entre os 2 experimentos, com respeito à produtividade total. Entretanto, em Pichia polymorpha foi obtida a maior produção média por fêmea, nos 2 experimentos e em Pichia vini o desenvolvimento não ultrapassou a fase larval.

Para D. kikkawai as menores produtividades foram em Endomycopsis bispora nos 2 experimentos (25 e 75), sendo iguais as produtividades por fêmea (6,25).

Quanto a D. melanogaster, as produtividades por fêmeas foram correspondentes nos 2 experimentos, sendo

Tabela 32: Produtividade, em números médios por fêmea, de larvas + pupas (Experimento I) e de moscas (Experimento II), das 5 espécies de Drosophila, em 15 espécies de leveduras.

<u>Drosophila</u>	Levedura	<u>Experimento I</u>		<u>Experimento II</u>	
		Nº	média	Nº	média
A	15-HAA	32	8,00	8	0,67
	21-HAV	97	4,04	349	29,08
	23-KLA	52	3,47	118	9,83
H	25-LES	25	1,19	41	3,42
	29-RIP	19	1,36	0	0
K	14-ENB	25	6,25	75	6,25
	17-HAC	54	1,54	495	41,25
	31-RHG	79	2,93	360	30,00
M	30-PIV	196	5,76	299	24,92
	33-SAI	152	6,91	338	28,17
	41-TOP	70	8,75	557	46,42
S	13-DEH	67	22,33	402	33,50
	27-PIE	189	11,12	313	26,08
	33-SAI	162	4,63	430	35,83

as maiores em Torulopsis pinus (8,75 e 46,42) e as menores em Pichia vini (5,76 e 24,92).

Para D. simulans não se observa nenhuma concordância entre os resultados dos 2 experimentos, porém, excluída Sacharomyces italicus no primeiro experimento, nos demais casos as produtividades por fêmeas foram superiores a 10.

Embora as condições dos 2 experimentos tenham sido diversas, quanto ao número de fêmeas e o tempo de ovoposição, pode-se considerar satisfatória a concordância entre eles. Os números maiores da progênie no segundo experimento, excluídas apenas D. ananassae em Hansenula anomala e D. hydei em Pichia vini, devem ser atribuídos ao maior tempo de ovoposição.

A tabela 33 contém os valores de biomassa relativos ao segundo experimento. Em todos os casos a biomassa individual de fêmeas é superior à dos machos, fazendo exceção D. melanogaster em Saccharomyces italicus. Entretanto, para cada espécie de Drosophila, o valor da biomassa individual de qualquer dos sexos variou em diferentes graus, conforme a levedura.

As diferenças são pequenas, tanto para machos como para fêmeas, na biomassa individual de D. ananassae e D. hydei em todas as leveduras. Entretanto essas diferenças não são paralelas: para D. ananassae, em Hanseniasocra valbyensis ocorreu a menor biomassa de fêmeas (0,477 mg) e a maior de machos (0,383 mg). Em D. kikkawai por outro lado, o

Tabela 33: Número e biomassa (mg) de fêmeas e machos das 5 espécies de Drosophila, produzidas em 15 espécies de leveduras (N = número; BT = biomassa total; BI = biomassa individual).

Droso phila	Levedura	fêmea			macho			total	
		N	BT	BI	N	BT	BI	NT	B
A	15-HAA	5	3	0,600	3	1	0,333	8	4
	21-HAV	174	83	0,477	175	67	0,383	349	150
	23-KLA	47	24	0,511	71	26	0,366	118	50
H	25-LES	18	22	1,222	23	21	0,913	41	43
	29-PIP	63	79	1,254	52	49	0,942	115	128
	30-PIV	-	-	-	-	-	-	-	-
K	14-ENB	48	38	0,792	27	17	0,630	75	55
	17-HAC	263	137	0,520	232	98	0,422	495	235
	31-RHG	211	138	0,654	149	78	0,523	360	216
M	30-PIV	172	122	0,709	127	43	0,339	299	165
	33-SAI	165	151	0,915	173	159	0,919	338	310
	41-TOP	304	169	0,556	253	86	0,340	557	255
S	13-DEH	229	176	0,769	173	127	0,734	402	303
	27-PIE	177	92	0,520	136	51	0,375	313	143
	33-SAI	268	132	0,493	162	57	0,352	430	189

correu uma correspondência entre a biomassa individual dos 2 sexos nas 3 leveduras: em Endomycopsis bispora ocorreram os maiores valores, os intermediários em Hansenula canadensis, e os menores em Rhodotorula glutinis.

São marcantes as diferenças relacionadas com D. melanogaster: o peso individual de machos (0,919 mg) em Saccharomyces italicus é quase o triplo do peso alcançado em Pichia vini (0,339 mg) e Torulopsis pinus (0,340 mg).

A biomassa das fêmeas (0,915 mg) em Saccharomyces italicus é mais que 1,5 vês maior que em Torulopsis pinus (0,556 mg).

Para D. simulans o peso individual de machos foi alto em Debaryomyces hansenii (0,734) e nas duas outras leveduras foi cerca de metade desse valor. Deve-se notar ainda que o peso individual de machos em Debaryomyces hansenii foi superior ao das fêmeas em Pichia etchellsii e Saccharomyces italicus.

A correlação entre número de indivíduos e biomassa total para as 5 espécies de Drosophila, está mostrada nas figuras 10 e 11, respectivamente para o número total de descendentes e os 2 sexos considerados separadamente. Os coeficientes de correlação são todos positivos e altamente significativos, com probabilidade menor que 0,001: $r = 0,855$ ($t_{13} = 6,168$) para o total de descendentes, $r = 0,909$ ($t_{13} = 7,555$) para fêmeas e $r = 0,755$ ($t_{13} = 4,308$) para machos. A melhor correlação é pois a relativa às fêmeas (figura 11).

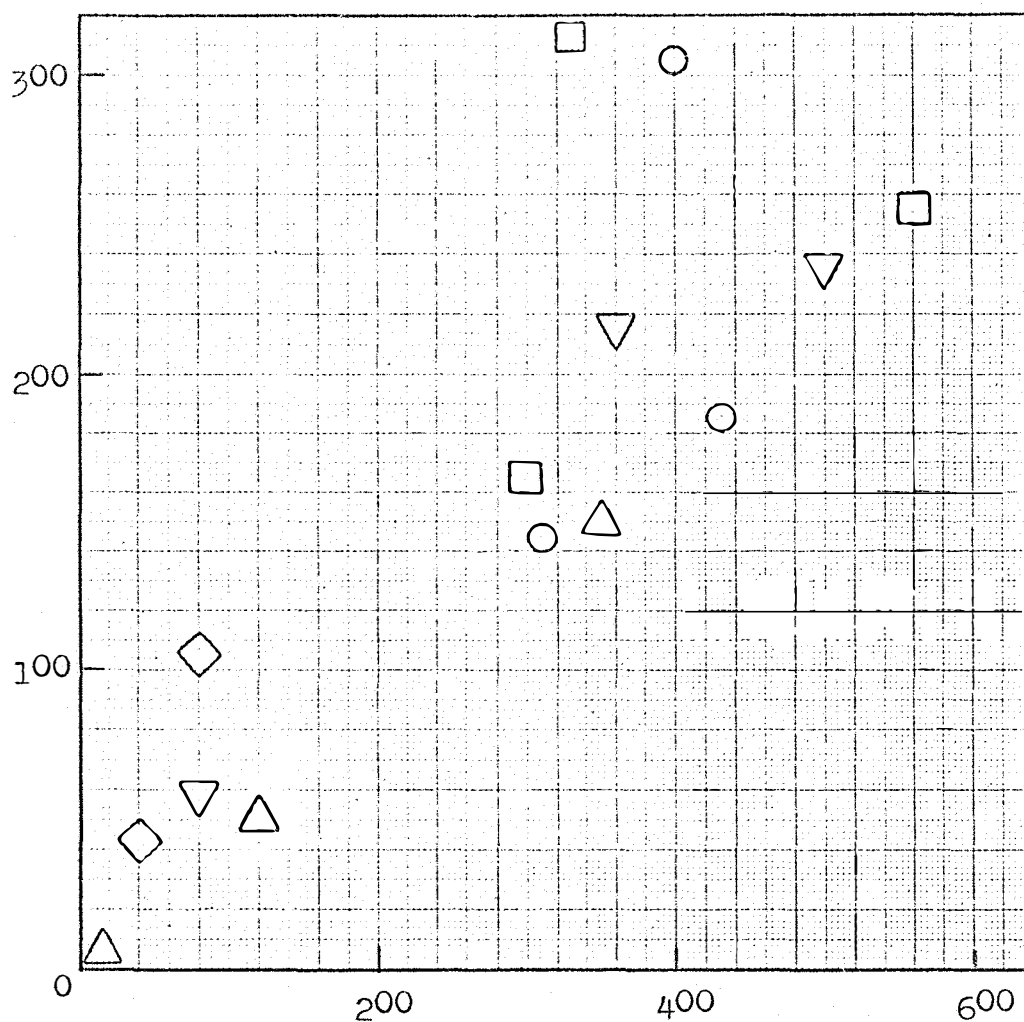


Figura 10 - Correlação entre número (abscissa) e biomassa em mg (ordenada), das 5 espécies de *Drosophila*, em 15 leveduras (△: *D. ananassae*; ◇: *D. hydei*; ▽: *D. kikkawai*; □: *D. melanogaster*; ○: *D. simulans*).

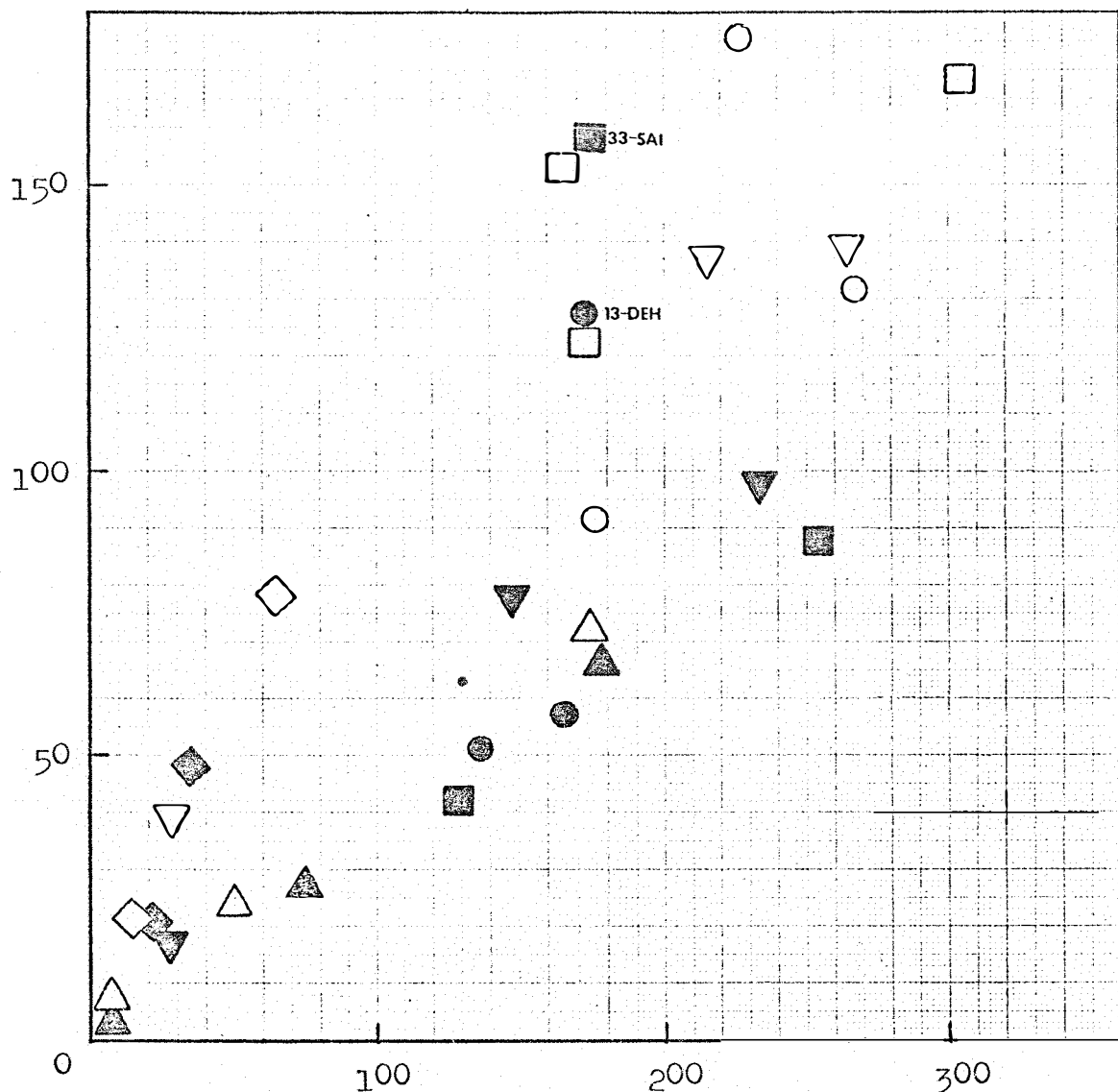


Figura 11: Correlação entre número (abscissa) e biomassa em mg (ordenada) de fêmeas (símbolos brancos) e machos (símbolos pretos), das 5 espécies de *Drosophila* em 15 leveduras (\triangle : *D. ananassae*; \diamond : *D. hydei*; ∇ : *D. kikkawai*; \square : *D. melanogaster*; \circ : *D. simulans*).

Quanto aos machos (fig. 11), o valor mais baixo da correlação deve ser atribuído às relações entre número e biomassa de D. melanogaster em Saccharomyces italicus e de D. simulans em Debaryomyces hansenii, leveduras que, por esses resultados, parecem ser especialmente favoráveis ao ganho de biomassa dessas espécies de moscas.

Quando se analisa as relações entre fêmeas e machos, os coeficientes de correlação são todos positivos e altamente significativos, com probabilidade menor que 0,001: para o número de indivíduos $r = 0,950$ ($t_{13} = 11,384$), para biomassa total $r = 0,844$ ($t_{13} = 5,888$) e para biomassa individual $r = 0,909$ ($t_{13} = 7,555$). Destes resultados deve-se concluir que, no geral, machos e fêmeas das 5 espécies de moscas têm desempenhos correspondentes nas leveduras consideradas.

5.5. Produtividade em Candida

Os testes de produtividade nas espécies de Candida foram realizados com o objetivo de estudar os efeitos de interações Drosophila-levedura na produção de descendentes, considerados quanto ao número e à biomassa.

O gênero Candida foi escolhido por existirem linhagens de espécies não originárias de moscas da natureza. Conforme descrito em Material e Métodos, todas as linhagens de leveduras foram provenientes de moscas coletadas em Humaitá (AM), com exceção de Candida albicans, C. krusei, C. macedoniensis, C. pseudotropicalis e C. tropicalis.

Para cada combinação Drosophila-levedura fo-
ram preparadas 3 garrafas com 12 casais, transferidos 2 ve-
zes cada 72 horas, dando para cada 12 fêmeas 9 dias de ovo-
posição em 3 unidades de alimento.

A tabela 34 contém os valores totais de núme-
ro e biomassa das progênes. As 5 espécies de moscas produ-
ziram descendentes nas 5 espécies de Candida. Entretanto há
diferenças acentuadas, quer considerando-se as moscas, quer
as leveduras. A levedura menos favorável foi C. albicans, na
qual se desenvolveram 738 moscas e a mais favorável foi C.
krusei, com 3109. D. simulans foi a espécie mais produtiva
com 2957 descendentes e D. hydei a menos produtiva, com 172.
A melhor interação foi D. ananassae em C. krusei, produzindo
1762 moscas, e a pior foi D. hydei nessa mesma levedura, com
9 moscas apenas.

A ordem de abundância, quanto a produtividade,
foi D. simulans, D. ananassae, D. melanogaster, D. kikkawai
e D. hydei. A segunda colocação de D. ananassae deve-se à
alta produção em C. krusei (1762), pois nas outras 4 espé-
cies de leveduras apresentou um total de 290 descendentes.

Com respeito às leveduras, a ordem decrescen-
te de produtividade foi C. krusei (3109), C. tropicalis
(1579), C. macedoniensis (1276), C. pseudotropicalis (1254) e
C. albicans (738). A primeira colocação de C. krusei deve-
se a produtividade de D. ananassae (1762), pois as outras 4
espécies de moscas produziram comparativamente menos descen-

Tabela 34: Número (N) e biomassa (B) em mg de moscas das 5 espécies de Drosophila, produzidas em espécies de Candida.

Levedura	<u>Drosophila</u>					Total	
	A	H	K	M	S		
1-CAA	N	21	43	236	190	248	738
	B	19	107	175	51	133	485
2-CAK	N	1762	9	201	371	766	3109
	B	1216	13	79	140	347	1795
3-CAM	N	52	56	211	224	733	1276
	B	48	68	151	127	461	855
6-CAP	N	39	21	134	429	631	1254
	B	31	47	95	242	454	869
8-CAT	N	178	43	149	630	579	1579
	B	144	55	166	330	286	981
TOTAL	N	2052	172	931	1844	2957	7956
	B	1458	290	666	890	1681	4985

dentos, num total de 1347.

D. kikkawai apresentou números semelhantes de descendentes em C. krusei (201) e em C. macedoniensis (211), entretanto a biomassa produzida na primeira levedura (79mg) foi aproximadamente metade da produzida na segunda (151mg). Fato análogo pode ser observado para D. hydei em C. albicans e C. tropicalis, respectivamente com 107 mg e 55 mg, para 43 moscas nos dois casos. Consideradas as 25 combinações Drosophila-levedura, a correlação entre números de indivíduos produzidos e biomassa total é positiva ($r = 0,973$) e altamente significativa ($t_{23} = 20,119$, $P < 0,001$), como poderia ser esperado. Contudo, a correlação não é perfeita. Em alguns casos, para números praticamente iguais de moscas corresponderam biomassas marcadamente diferentes, como já foi destacado para D. hydei em C. albicans e C. tropicalis e para D. kikkawai em C. krusei e C. macedoniensis. Outra causa é a biomassa produzida por D. kikkawai em C. tropicalis, determinando pesos individuais superiores a 1 mg, em contraste com as demais leveduras nas quais os pesos individuais ficaram abaixo de 0,8 mg.

Essas observações evidenciam que o tamanho atingido pelas moscas mostra, em alguns casos, um efeito direto da espécie de levedura. Como os números de moscas produzidas também variaram com a levedura considerada, a produtividade mostra-se sensível ao substrato nutritivo representado pelas leveduras, nos dois aspectos estudados, isto é, número e biomassa da progênie.

A tabela 35 contém os números e biomassas de fêmeas e machos das 5 espécies de Drosophila produzidos nas 5 espécies de Candida. Os valores de X^2 da igualdade para a razão de sexo 1:1, constantes da tabela 36, permitem constatar que para D. simulans, há desvios significativos com predominância de fêmeas em 4 leveduras (C. albicans, C. kru sei, C. pseudotropicalis e C. tropicalis), em uma para D. kikkawai (C. pseudotropicalis), também com predominância de fêmeas e em uma para D. simulans (C. pseudotropicalis), porém com predominância de machos.

Para controle do estudo da biomassa, foram retirados dos estoques de cada espécie de Drosophila, mantidos em meio de cultura de trigo-fubá, 48 fêmeas e 48 machos, para os quais foram determinadas as biomassas total e individual e a razão entre biomassa individual de fêmeas e biomassa individual de machos. A tabela 37 mostra esses resultados.

A tabela 38 contém os valores de biomassa individual de fêmeas e machos, calculados a partir dos números da tabela 35. Os maiores valores correspondem a D. hydei pois esta é a espécie de maior porte entre as 5 estudadas. Em todos os casos, como poderia ser esperado, as biomassas individuais das fêmeas são maiores que as dos machos. Entretanto, dois tipos de variações devem ser considerados para cada espécie de Drosophila: as da biomassa de cada sexo e as das razões entre as biomassas individuais de fêmeas e de machos, nas 5 leveduras.

Tabela 35: Número (N) e Biomassa (M) em mg de fêmeas (F) e machos (M) das 5 espécies de Drosophila, produzidas em 5 espécies de Candida.

Levedura	<u>Drosophila</u>												Total			
	A			H			K			M				S		
	F	M		F	M		F	M		F	M			F	M	
1-CAA	N	13	8	16	27	114	122	100	90	156	92	399	339			
	B	13	6	47	60	92	83	31	20	91	42	274	211			
2-CAK	N	908	854	5	4	101	100	198	173	443	323	1655	1454			
	B	686	530	9	4	42	37	89	51	227	120	1053	742			
3-CAM	N	22	30	33	23	109	102	119	105	383	350	666	610			
	B	27	21	48	20	87	64	69	58	262	199	493	362			
6-CAP	N	16	23	13	8	81	53	194	235	366	265	670	584			
	B	17	14	31	16	67	28	132	110	287	167	534	335			
8-CAT	N	91	87	22	21	78	71	319	311	321	258	831	748			
	B	79	65	30	25	102	64	187	143	171	115	569	412			
TOTAL	N	1050	1002	89	83	483	448	930	914	1669	1288	4221	3735			
	B	822	636	165	125	390	276	508	382	1038	643	2923	2062			

Tabela 36: Valores de χ^2 para a razão de sexo 1:1 das moscas das 5 espécies de Drosophila, produzidas em 5 espécies de Candida (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$).

Levedura	<u>Drosophila</u>				
	A	H	K	M	S
1-CAA	1,190	2,814	0,271	0,526	16,516 **
2-CAK	1,655	0,111	0,005	1,685	18,799 **
3-CAM	1,231	1,786	0,232	0,875	1,486
6-CAP	1,256	1,196	5,851 *	3,918 *	15,166 **
8-CAT	0,090	0,023	0,329	0,102	6,855 **
TOTAL	1,122	0,208	1,314	0,138	49,090 **

Tabela 37: Biomassa (mg) de 48 machos e 48 fêmeas dos estoques das 5 espécies de Drosophila (BT = biomassa total; BI = biomassa individual).

<u>Drosophila</u>	fêmeas		machos	
	BT	BI	BT	BI
A	59	1,229	44	0,917
H	97	2,021	82	1,708
K	24	0,500	19	0,396
M	46	0,958	30	0,625
S	38	0,792	27	0,563

Tabela 38: Biomassa individual (mg) de fêmeas (F) e machos (M) das 5 espécies de Drosophila em 5 espécies de Candida.

	<u>Leveduras</u>					
	1-CAA	2-CAK	3-CAM	6-CAP	8-CAT	
A	F	1,000	0,755	1,237	1,062	0,868
	M	0,750	0,620	0,700	0,608	0,747
H	F	2,937	1,800	1,454	2,384	1,363
	M	2,222	1,000	0,869	2,000	1,190
K	F	0,807	0,415	0,798	0,827	1,307
	M	0,680	0,370	0,627	0,528	0,901
M	F	0,310	0,449	0,579	0,680	0,585
	M	0,222	0,294	0,552	0,468	0,459
S	F	0,583	0,512	0,684	0,784	0,532
	M	0,456	0,371	0,568	0,630	0,445

Em relação aos valores de biomassa individual do estoque (tabela 37), podem ser destacadas algumas diferenças mais contrastantes.

Quanto a D. ananassae, os pesos individuais de fêmeas e machos nas 5 leveduras são inferiores aos dos estoques, excluídas as fêmeas em C. macedoniensis, com biomassa individual 1,237 mg, semelhante à do estoque, de 1,229 mg. A menor biomassa individual de fêmeas (0,755 mg), em C. krusei, foi cerca de 60% do valor do estoque, e a menor de machos (0,608 mg), em C. pseudotropicalis, foi cerca de 65% do valor do estoque (0,917mg).

Em D. melanogaster a situação é semelhante pois as moscas do estoque apresentaram biomassa maior que as desenvolvidas nas 5 leveduras. O maior valor para a biomassa das fêmeas (0,680 mg em C. pseudotropicalis) é cerca de 70% do valor do estoque (0,958 mg) e o menor (0,310 mg em C. albicans) é pouco mais que 30% do estoque. Quanto aos machos, os extremos são observados em C. macedoniensis (0,552 mg) e C. albicans (0,222 mg), correspondendo respectivamente a cerca de 90 e 35% do valor do estoque (0,625 mg).

Para as outras espécies as variações são mais complexas pois foram observadas biomassas individuais tanto de machos como de fêmeas, superiores e inferiores às dos estoques.

Para D. hydei, fêmeas e machos apresentaram em C. albicans biomassas individuais da ordem de 1,4 vês

maiores que as respectivas biomassas individuais do estoque. Por outro lado a biomassa das fêmeas (1,363 mg) em C. tropicalis é cerca de 67% do valor do estoque (2,021 mg) e a dos machos (0,869 mg) em C. macedoniensis corresponde a cerca de 50% da biomassa apresentada pelos machos do estoque (1,708 mg).

Quanto a D. kikkawai, a menor biomassa individual das fêmeas foi observada em C. krusei (0,415 mg) e a maior em C. tropicalis (1,307 mg), correspondendo respectivamente a cerca de 0,8 e 2,6 vezes a biomassa individual das fêmeas do estoque (0,500 mg). Para os machos, os valores extremos foram verificados em C. krusei (0,370 mg), praticamente igual ao do estoque (0,396 mg), e em C. tropicalis (0,901 mg), valor cerca de 2,3 vezes maior que o do estoque.

Os menores valores de D. simulans, tanto de fêmeas (0,512 mg) como de machos (0,371 mg), correspondem a cerca de 65% das respectivas biomassas individuais do estoque. Fêmeas em C. pseudotropicalis (0,784 mg) e machos em C. macedoniensis (0,568 mg) apresentaram biomassa praticamente igual a do estoque. Apenas machos em C. pseudotropicalis tiveram biomassa superior a do estoque, com 0,630 mg contra 0,563 mg.

A tabela 39 contém os valores das razões entre biomassa individual de fêmeas e de machos, calculadas a partir das biomassas individuais (tabela 38). Pelos valores dessas razões pode-se concluir que as relações entre as biomassas de fêmeas e machos variam em função da levedura considerada. Todos os valores são superiores a 1,00 indicando que

Tabela 39: Razões biomassa individual de fêmeas / biomassa individual de machos das 5 espécies de Drosophila em 5 espécies de Candida.

<u>Drosophila</u>	Leveduras				
	1-CAA	2-CAK	3-CAM	6-CAP	8-CAT
A	1,33	1,22	1,77	1,75	1,16
H	1,32	1,80	1,67	1,19	1,14
K	1,19	1,12	1,27	1,57	1,45
M	1,40	1,53	1,05	1,45	1,28
S	1,28	1,38	1,20	1,24	1,20

as fêmeas são maiores que os machos. Uma razão próxima de 1,00, como 1,05 para D. melanogaster em C. macedoniensis, indica portes aproximadamente iguais dos dois sexos. Razões altas, como por exemplo 1,80 para D. hydei em C. krusei, indicam uma acentuada desproporção de tamanho entre os dois sexos.

As desproporções mais acentuadas entre biomassa individual de fêmeas e de machos ocorreram para D. ananasae em C. macedoniensis e C. pseudotropicalis, para D. hydei em C. krusei e C. macedoniensis, para D. kikkawai em C. pseudotropicalis e C. tropicalis, para D. melanogaster em C. krusei e para D. simulans em C. krusei, com razões superiores a 1,5. O conjunto de razões mais semelhantes é o correspondente a D. simulans com extremos 1,20 e 1,38. A maior amplitude de variação corresponde a D. hydei, com os extremos 1,14 e 1,80.

As relações entre a biomassa individual de fêmeas e a de machos foram também analisadas calculando-se o coeficiente de correlação entre os pesos individuais dos dois sexos. O valor encontrado, $r = 0,963$ é significativo ($t_{23} = 17,136$, $P < 0,001$). A figura 12 mostra esta correlação.

Essas observações indicam a existência de diferentes graus de interação, não só Drosophila-levedura como sexo-levedura, na produtividade, tanto em número de indivíduos como em biomassa.

A tabela 40 contém os números de moscas das

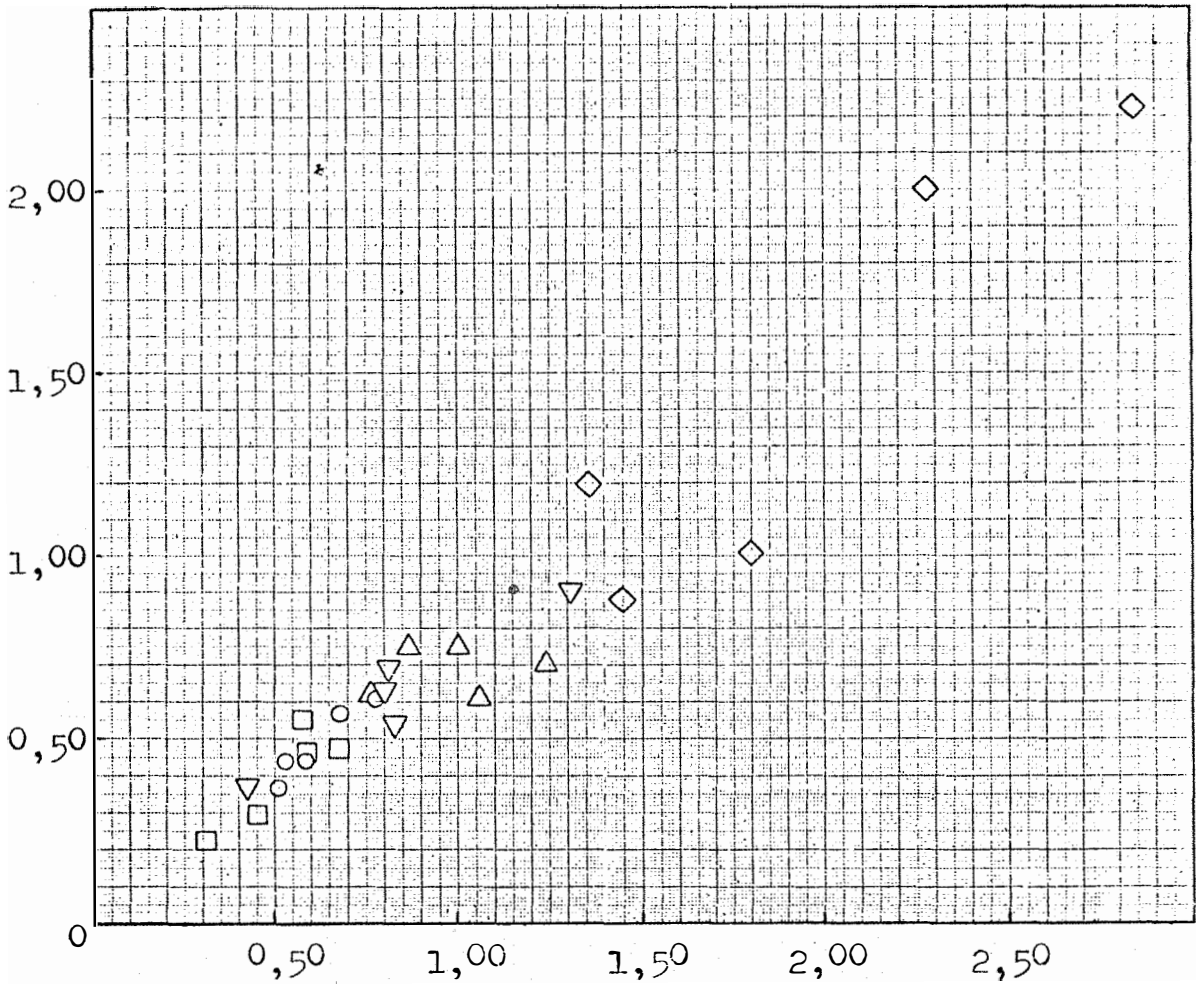


Figura 12 - Correlação entre biomassa individual de fêmeas (abscissa) e de machos (ordenada), em mg das 5 espécies de Drosophila nas 5 espécies de Candida (△ : D. ananassae; ◇ : D. hydei; ▽ : D. kikkawai; □ : D. melanogaster; ○ : D. simulans).

Tabela 40: Números de moscas das 5 espécies de Drosophila capturadas em 5 espécies de Candida.

Levedura	<u>Drosophila</u>					TOTAL
	A	H	K	M	S	
1-CAA	1	12	6	15	47	81
2-CAK	21	12	44	30	38	145
3-CAM	44	14	14	38	74	184
6-CAP	10	14	11	64	20	119
8-CAT	66	22	9	4	53	154
TOTAL	142	74	84	151	232	683

5 espécies de Drosophila capturadas nas 5 espécies de Candi
da. Os valores foram retirados da tabela 2.

Uma representação gráfica permite a apreciação visual das relações entre atração e produtividade das 5 espécies de moscas nas 5 espécies de Candida. Com os dados das tabelas 34 e 40, foi construída a figura 13. Essa figura mostra, na parte superior, as distribuições percentuais relativas à atração e à produtividade de cada espécie de Drosophila nas 5 espécies de Candida. Na parte inferior estão representados graficamente os percentuais relativos à atração e à produtividade das 5 espécies de Drosophila em cada espécie de Candida. Em cada círculo da parte superior, as espécies de Candida estão dispostas em ordem alfabética no sentido horário, a partir de 12 horas; os símbolos sucessivos correspondem respectivamente a C. albicans, C. krusei, C. macedoniensis, C. pseudotropicalis e C. tropicalis. Do mesmo modo, na parte inferior, os símbolos sucessivos de cada círculo correspondem respectivamente a D. ananassae, D. hydei, D. kikkawai, D. melanogaster e D. simulans.

O exame da figura permite concluir logo pela inexistência de padrões de distribuição, tanto de atração como de produtividade.

As 25 combinações relativas a distribuição de cada espécie de Drosophila nas 5 espécies de Candida (primeira fileira de círculos) e as respectivas representações da produtividade (segunda fileira de círculos), permitem

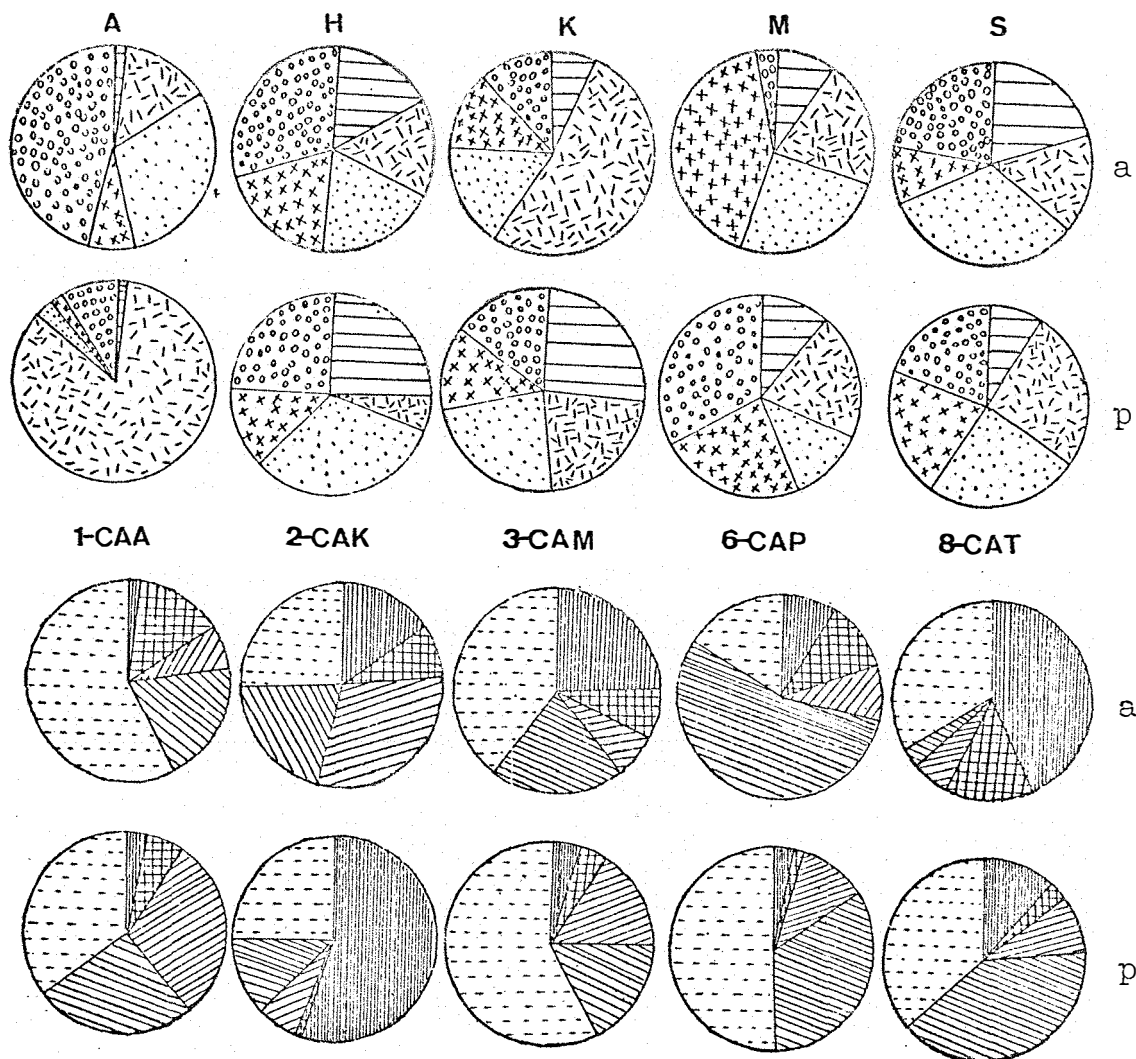



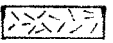

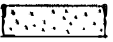

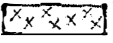
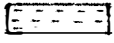
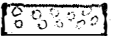


Figura 13: Distribuições percentuais, relativas à a tração (a) e à produtividade (p), de cada espécie de Drosophila nas 5 espécies de Candida (acima) e das 5 espécies de Drosophila em cada espécie de Candida (abaixo).

- | | | | |
|---|------------------------|---|----------------------------|
|  | <u>D. ananassae</u> |  | <u>C. albicans</u> |
|  | <u>D. hydei</u> |  | <u>C. krusei</u> |
|  | <u>D. kikkawai</u> |  | <u>C. macedoniensis</u> |
|  | <u>D. melanogaster</u> |  | <u>C. pseudotropicalis</u> |
|  | <u>D. simulans</u> |  | <u>C. tropicalis</u> |

distinguir 3 situações básicas: a) percentual de atração maior que o da produtividade, como D. kikkawai em C. krusei ; b) percentual de atração semelhante ao da produtividade, como D. melanogaster em C. krusei; e c) percentual de atração menor que o da produtividade, como D. ananassae também em C. krusei.

Consideradas as distribuições das espécies de Drosophila, em cada espécie de Candida, para atração (terceira fileira de círculos) e produtividade (quarta fileira de círculos), do mesmo modo podem ser distinguidas 3 situações básicas: a) percentual de atração maior que o da produtividade, como D. kikkawai em C. albicans; b) percentual de atração semelhante ao da produtividade, como D. simulans em C. tropicalis; e c) percentual de atração menor que o da produtividade, como D. simulans em C. pseudotropicalis.

Essas relações parecem suficientemente sugestivas, como indicação de laboratório, da existência de locais de nutrição e criação na natureza.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, sobre relações entre espécies de Drosophila e de levedura, foi desenvolvida uma técnica para esterilização do trato digestivo das moscas e idealizado um dispositivo para estudo de preferências alimentares das moscas em relação às leveduras.

A esterilização do trato digestivo das moscas teve o objetivo de preparar, para os experimentos, animais isentos de leveduras. Nos trabalhos de El-Helw e Ali (1970 e 1973) e Ali e El-Helw (1974) foram usadas pupas colocadas em meio sintético, com a espécie de levedura a ser empregada no experimento. Após a emergência, os imagos eram acasalados e as larvas descendentes lavadas em água destilada estéril.

O procedimento adotado neste trabalho, além da vantagem de manipulação fácil, possibilita o emprego, nos experimentos, de qualquer indivíduo. Basta mantê-lo durante cerca de 3 dias em meio de cultura ao qual são adicionados bactericidas e fungicidas, conforme descrito em Material e

Métodos. No caso de moscas recém-nascidas, o período de esterilização é em geral suficiente para o seu amadurecimento sexual.

A técnica de El-Helw e Ali, começando pela manipulação de pupas, não possibilita o uso direto de moscas originárias de populações, naturais ou experimentais.

O dispositivo para o estudo de preferências alimentares é a caixa de atração, também descrita em Material e Métodos. Esse dispositivo possibilitou, no presente trabalho, que 11 espécies de leveduras fossem expostas simultaneamente a cada espécie de Drosophila.

De construção simples e manipulação fácil, a caixa de atração é suficientemente versátil para o estudo de vários aspectos da associação Drosophila-leveduras. A liberação simultânea de mais de uma espécie de Drosophila deve possibilitar a análise de competição interespecífica por recursos alimentares. A liberação, separadamente, de machos e fêmeas virgens, para posteriores cruzamentos, deve possibilitar a seleção de linhagens para estudo de bases genéticas de preferência alimentar.

Os resultados dos experimentos de atração mostraram que as 5 espécies de Drosophila apresentam preferências por determinadas espécies de levedura. Nenhuma espécie de mosca exibiu uma especialização rígida para somente um microrganismo. Com exceção de D. hydei, que não visitou duas espécies de levedura, as outras 4 tiveram representantes nos

44 microrganismos empregados. Assim, diferenças de preferência alimentar observadas neste trabalho, podem ser consideradas de 2 tipos: qualitativas e quantitativas.

Duas espécies de Drosophila diferem qualitativamente quanto à preferência por uma levedura quando a frequência de uma delas é nula ou extremamente baixa que possa ser considerada casual. Foi claramente qualitativa a diferença entre D. hydei e as demais espécies, em relação a Hansenula saturnus e Rhodotorula glutinis, pois D. hydei não ocorreu nessas duas leveduras (tabela 3 e 5). Com base nesse critério também podem ser consideradas qualitativas, entre outras, as diferenças entre D. simulans e D. ananassae em Candida albicans, D. ananassae e D. melanogaster em Candida tropicalis, D. kikkawai e D. ananassae em Hansenula beijerinckii, D. simulans e D. melanogaster em Leucosporidium scottii e em Pichia polymorpha, D. ananassae e D. hydei em relação a D. melanogaster (tabelas 2 a 6).

Duas espécies de Drosophila diferem quantitativamente quanto à preferência por uma levedura, quando ambas ocorrem a essa levedura com frequências suficientemente altas para identificar uma preferência, porém diferentes numa ordem de grandeza suficiente para indicar graus diferentes de preferência.

Com base nesse critério foi quantitativa a diferença entre D. ananassae e D. kikkawai em Candida kru sei, na qual essas espécies ocorreram na proporção aproxima

da de 1:2 (tabela 2). Igualmente deve ser considerada quantitativa a diferença entre D. ananassae e D. melanogaster em Pichia etchellsii, na qual a proporção aproximada dessas espécies foi 2:1 (tabela 4). D. ananassae, D. kikkawai e D. simulans ocorreram em Pichia vini em proporções aproximadas de 1:3,5:1 (tabela 4) e em Rhodotorula glutinis na proporção 5:2:1 (tabela 5). Em relação a Saccharomyces ludwigii, D. hydei e D. melanogaster parecem não diferir, porém as duas diferem quantitativamente das outras 3 espécies de moscas (tabela 6).

Deste modo, os resultados apresentam uma concordância geral com os trabalhos de Buzzati-Traverso (1949), Cunha et alii (1951), Dudgeon (1954) e Dobzhansky e Cunha (1955), os quais mostraram que as espécies de Drosophila têm preferências em sua escolha de leveduras. Entretanto, os presentes resultados mostraram ainda, com base nos critérios propostos, a existência de diferenças não só quantitativas mas também qualitativas. As observações feitas são, no mínimo, indicativas da possibilidade de duas espécies diferirem qualitativamente em suas preferências alimentares.

A distinção de diferenças qualitativas e quantitativas pode se constituir em promissora hipótese de trabalho experimental. Será necessário determinar o número mínimo de moscas em uma levedura que permita afirmar que a ocorrência não é causal. Igualmente a diferença mínima en

tre dois números acima do limite aleatório que permita afirmar que essa diferença não é aleatória.

A falta de especialização rígida das moscas em suas preferências por leveduras pode ser um fator responsável pela coexistência das espécies em uma comunidade, pois todas as moscas podem explorar uma ampla variedade de microrganismos, mas com capacidades diferentes.

Dobzhansky et alii (1956) verificaram que a seleção natural deve atuar entre as espécies de Drosophila minimizando a competição por alimento, não só entre espécies mas também entre larvas e adultos da mesma espécie. As moscas coexistem devido à capacidade que apresentam de explorar uma grande variedade de leveduras; nenhuma mosca é superespecializada a ponto de ser monófaga.

Cunha et alii (1951) mostraram que as espécies tropicais de Drosophila apresentam uma diversificação maior em suas preferências alimentares, que moscas de regiões temperadas. O desenvolvimento de preferências alimentares é um mecanismo, segundo os autores, responsável pela minimização da competição interespecífica, tornando as moscas adaptadas a viverem juntas. Uma especialização rígida poderia resultar na extinção da espécie, na falta do alimento específico. Ambientes tropicais têm uma variedade de frutos disponíveis, maior que os de regiões temperadas.

A capacidade de explorar diferentes leveduras e o fato dessa capacidade ser diferencial quanto às espécies

de moscas, quanto à região geográfica e quanto à época do ano, são apontados como explicativos da constituição das comunidades de espécies de Drosophila. As diferenças entre as espécies de moscas, com relação a essa característica, devem ser reflexo de diferenças na constituição genética. A caixa de atração, apresentada neste trabalho, abre perspectivas de estudo experimental das bases genéticas da preferência alimentar.

Para cada espécie de Drosophila foram identificadas, quanto à capacidade de atração, 5 leveduras mais favoráveis, 5 intermediárias e 5 menos favoráveis (tabela 7).

As leveduras com capacidade de atração intermediária são menos discriminadoras das espécies de Drosophila que as mais e as menos favoráveis. Essa observação permite supor que a competição interespecífica deve ser mais forte em leveduras com capacidade de atração intermediária que nas mais e menos favoráveis.

D. simulans foi a espécie que apresentou maior número de indivíduos atraídos pelas leveduras, a seguir vieram respectivamente, D. kikkawai, D. melanogaster, D. ananassae e D. hydei. A sequência é a mesma quanto ao número de leveduras nas quais cada uma das espécies de moscas predominou em relação às outras 4.

As ogivas de percentagens acumuladas (figura 3) refletem a flexibilidade dos imagos de cada espécie de Drosophila em suas preferências alimentares. Mostram que

D. hydei foi a espécie mais especializada, em virtude de atingir frequências mais altas nas leveduras mais atrativas. A seguir vem D. ananassae, sendo que D. kikkawai e D. mela nogaster são semelhantes. D. simulans foi a mosca que apresentou os imagos mais versáteis para a escolha das leveduras.

Diferenças na exploração de leveduras, por moscas do grupo "virilis", foram descritas por Dudgeon (1954), mostrando ser D. montana a espécie mais sensível às diferenças nutricionais, D. texana intermediária e D. virilis a mais flexível.

Vários autores, entre os quais Wallace e Dobzhansky (1946), Spieth e Hsu (1950) e Miller e Weeks (1964), mostraram, em coletas na natureza, diferenças nas proporções sexuais entre os indivíduos capturados. Bélo e Lemos (1978) verificaram que machos e fêmeas de moscas de um ambiente doméstico apresentavam comportamento diurno diferente.

As diferenças entre os sexos, apontadas acima, podem ser de fato consequência de atração diferencial e/ou comportamentos diversos. Entretanto, podem ser também uma consequência de uma desproporção entre fêmeas e machos nas populações naturais estudadas. Pipkin (1956) levanta outras hipóteses para desproporções sexuais em coletas na natureza, procurando relacioná-las com maior longevidade e menor tempo de desenvolvimento das fêmeas.

O problema é aberto, posto que as populações naturais são desconhecidas quanto à sua constituição sexual. Os números de fêmeas e machos nas coletas podem ser consequência, tanto de atração diferencial, como de comportamento diurnos desiguais, como de diferenças de longevidade e tempo de desenvolvimento, como de desproporções sexuais reais, ou outras causas. Tornaram-se pois importantes estudos em laboratório, nos quais essa variável pode ser controlada.

No presente trabalho foram feitas observações sobre a atração diferencial de fêmeas e machos. Os dados mostraram ser pouco sugestiva tal hipótese, pois de 220 possibilidades de atração diferencial, em apenas 11 casos isso ocorreu e em alguns, o número de indivíduos atraídos foi pequeno (tabela 12). O esclarecimento desse assunto requer mais experimentos. Na caixa de atração esse problema pode ser abordado com a repetição de testes envolvendo apenas as leveduras nas quais ocorreu atração diferencial e ainda, liberando-se na caixa, de cada vez, machos ou fêmeas, o que permitiria excluir a eventual ação de feromônios como fatores responsáveis pela atração.

O segundo experimento de atração (tabelas 13 a 17), com as 5 leveduras mais atrativas e as 5 menos atrativas para cada espécie de Drosophila confirmou os resultados anteriores, mostrando que as preferências por determinadas leveduras são marcantes. Portanto, as espécies de moscas estudadas mostraram possuir uma atração preferencial por

determinadas espécies de levedura. Entretanto essa atração não é acentuada a ponto das moscas não serem atraídas por outras leveduras.

A repetição dos resultados nos dois experimentos de atração, principalmente pelas condições diferentes de associação das leveduras, afasta de vez a casualidade de preferências alimentares. Acresce ainda que as moscas usadas nos 2 experimentos não foram as mesmas, mas foram o riginárias das mesmas linhagens, as quais deveriam conter as bases genéticas das preferências observadas. Com base nos resultados de Buzzati-Traverso (1949), Wagner (1949), Dobzhansky e Pavan (1950), Carson (1951), Dobzhansky et alii (1956), Cunha (1957), Cunha et alii (1951 e 1957), Pavan (1957), Lindsay (1958), Cooper (1960), Pipkin et alii (1966) e El-Helw e Ali (1973), que constataram diferenças geográficas de preferências por leveduras, deveriam ser esperados resultados diferentes nos 2 testes de atração se tivessem sido usadas moscas de procedências diferentes em cada caso. Esta hipótese pode ser testada na caixa de atração.

Uma dificuldade em associar resultados de laboratório com os da natureza é o fato de as populações naturais de Drosophila apresentarem flutuações, como foi mostrado por Patterson (1943), Dobzhansky e Pavan (1950), Pipkin (1952 e 1965), Mather (1956), Pavan (1957), Mourão (1966) e Bélo (1973).

Embora o método de coletas na natureza não

assegure a assepsia de iscas inoculadas com leveduras específicas, elas foram realizadas por autores como Cunha et alii (1951) e Dobzhansky e Cunha (1955), que verificaram sua eficiência prática para a observação das associações entre Drosophila e leveduras.

Apesar das dificuldades apontadas acima, este trabalho também envolveu coletas na natureza, utilizando iscas inoculadas com leveduras específicas. Foram escolhidas 4 espécies de leveduras para serem utilizadas em trabalho de campo. A partir dos resultados dos testes de atração realizados no laboratório, foi possível estabelecer hipóteses quanto à incidência esperada das 5 espécies de Drosophila utilizadas neste trabalho, quando as 4 leveduras fossem expostas na natureza.

Fatores diferentes das condições do laboratório devem ter influenciado os resultados, como agentes climáticos (veja Bélo e Oliveira Filho 1976) e o número de espécimes existentes na natureza. Mesmo assim, os dados obtidos (tabela 18) foram satisfatoriamente concordantes com as expectativas.

Excluída a escassez de D. kikkawai, provavelmente associada com flutuações temporais e D. hydei, espécie pouco frequente (veja Bélo 1973), as 3 outras foram abundantes nas coletas. Bélo e Gallo (1977) verificaram que a maior frequência, cerca de 8% de D. melanogaster em relação a D. simulans, na natureza, ocorreu em março e as

coletas com leveduras escolhidas foram realizadas em julho, setembro e novembro. No total, D. melanogaster foi a segunda espécie mais comum em relação às moscas empregadas no presente trabalho, atingindo uma frequência de 7,5% em relação a D. simulans.

As observações feitas justificam recomendar a realização de coletas periódicas em um mesmo local, utilizando iscas inoculadas com leveduras específicas escolhidas a partir de testes de laboratório, como um procedimento capaz de fornecer conhecimentos novos sobre as flutuações.

A capacidade de uma espécie deixar descendentes em um número maior ou menor de leveduras deve ser considerada como um componente fundamental de seu valor adaptativo. A capacidade de explorar grande número de leveduras é pois, uma característica favorável que deve contribuir para a sobrevivência da espécie em um determinado ambiente e para a colonização de ambientes variados. As espécies que apresentaram maior número de descendentes foram, respectivamente, D. simulans, D. melanogaster, D. ananassae, D. kikkawai e D. hydei. A sequência é a mesma considerando-se o número de leveduras nas quais cada espécie de Drosophila predominou (tabela 25).

D. ananassae superou D. kikkawai, apesar desta espécie ter apresentado maior número de fêmeas atraídas e ter deixado descendentes em maior número de leveduras (tabela 19). Estes fatos indicam que D. kikkawai e D. ananassae

sae podem apresentar estratégias diferentes, com respeito à capacidade de exploração de um ambiente. A primeira, mais flexível em suas preferências pelas leveduras e a segunda, com menor flexibilidade de escolha mas com alta fertilidade das fêmeas em determinadas leveduras.

Essas observações concordam em parte com os resultados obtidos por Bélo (1973) e Bélo e Gallo (1977), que, usando iscas de banana fermentada naturalmente, mostraram ser D. simulans a espécie mais bem representada no local de coletas (Olimpia), em observações durante o período de um ano. Também D. ananassae foi mais frequente que D. kikkawai em tais coletas.

Carson (1951) criou os termos local de criação e local de alimentação, referindo-se a larvas e imagos de Drosophila explorarem recursos diferentes na natureza, no que concerne às espécies de levedura encontradas no trato digestivo. Afirmou que tal comportamento pode ser responsável por diminuição da competição intraespecífica.

Posteriormente, Shehata e Mrak (1952) verificaram, com moscas do grupo "obscura", que leveduras do trato digestivo de imagos eram diferentes das encontradas nos locais de criação das espécies, o mesmo sendo verificado por Carson et alii (1956).

Wagner (1949), Dudgeon (1954) e Lindsay (1958) constataram que diferentes espécies de Drosophila possuem diferentes capacidades em relação à sobrevivência e

à duração do ciclo de vida em diferentes espécies de levedura.

Semelhante à atração, as espécies de Drosophila apresentaram diferenças acentuadas em relação às leveduras nas quais ocorreram descendentes. Houve diferenças quanto ao número de larvas e pupas produzidas em espécies de um mesmo gênero e quanto ao número de leveduras nas quais ocorreram descendentes (tabelas 20 e 24). As leveduras nas quais ocorreram descendentes em maior número, para cada espécie de mosca, são de espécies diferentes. Considerando os grupos das 5 leveduras com as maiores produtividades para cada espécie de mosca, verifica-se que apenas 5 microrganismos participaram em mais de um grupo.

Por outro lado, não foram verificadas relações acentuadas entre atração e produtividade, o que significa que uma espécie de levedura pode atrair um grande número de indivíduos, os quais poderão ou não deixar um número grande de descendentes (figuras 7 a 9). Essa observação em experimentos de laboratório é concordante com as de outros autores (Carson, 1951 e Shehata et alii, 1955, por exemplo), de que há locais com certas espécies de levedura que servem para alimentação de adultos e outros para o desenvolvimento das larvas.

As correlações entre número de fêmeas atraídas em cada levedura e a sua produtividade (figuras 7 a 9), são muito esclarecedoras. Pode ser verificado, para D.

ananassae, que Candida parapsilosis, Saccharomyces rouxii, Pichia etchellsii e Hanseniaspora valbyensis atraíram cerca de 20 fêmeas e o número de larvas e pupas produzidas, nessa sequência, variou de 26 em Candida parapsilosis a quase 100 em Hanseniaspora valbyensis.

Para D. kikkawai, Hansenula saturnus e Pichia etchellsii atraíram mais de 50 fêmeas, as quais produziram menos que 30 indivíduos. Por outro lado, Rhodotorula glutinis atraiu 27 fêmeas que produziram cerca de 80 indivíduos.

Drosophila simulans e D. melanogaster geralmente apresentaram alta produção de descendentes. Entretanto, Saccharomyces ludwigii para D. melanogaster e Leucosporidium scottii para D. simulans atraíram os maiores números de fêmeas, mas só 5 indivíduos se desenvolveram em Saccharomyces ludwigii e na outra levedura nenhum.

Outro fato indicativo de diferenças entre as espécies em relação a locais de criação e de alimentação é a produção média por fêmea (tabelas 26 a 30). As maiores médias por fêmea, de cada espécie de Drosophila, foram obtidas em espécies de leveduras diferentes, todas com capacidade muito baixa para a atração de imagos. As médias de D. hydei, D. kikkawai e D. ananassae não diferiram estatisticamente, sendo inferiores às de D. melanogaster e D. simulans.

Talvez essas observações possam ser usadas para explicar o fato observado por Bélo (1973), de que D.

kikkawai não apresentou variações significativas no tamanho da sua população nas estações do ano. A baixa fecundidade poderia ser compensada pela grande flexibilidade apresentada para a exploração de diferentes nichos ecológicos.

Um segundo experimento de produtividade foi realizado com 15 espécies de levedura, medindo-se também a biomassa dos descendentes. Ocorreram algumas variações marcantes entre as biomassas de fêmeas e machos nas diferentes leveduras, ao lado de uma correlação positiva forte entre número de descendentes e biomassa total. Também foram positivas e altamente significativas as correlações entre os dois sexos para número e biomassa. Indica-se a conclusão de que, excluídas as exceções, fêmeas e machos das 5 espécies de moscas tiveram desempenhos correspondentes quanto à capacidade de produção de biomassa a partir das leveduras disponíveis (tabelas 32 e 33).

Moore (1952) considerou que a coexistência de D. melanogaster e D. simulans, em condições naturais, só é compreensível admitindo que essas espécies não ocupam nichos ecológicos idênticos. Mostrou, em experimentos realizados com caixas de população, diferenças entre as espécies relacionadas com o local de ovoposição e a temperatura. O trabalho de Parsons (1975) apresenta confirmações dessa hipótese com base em observações feitas em vinhas e adegas, relacionadas com a tolerância ao álcool, consistentes com resultados de laboratório.

Os resultados obtidos neste trabalho, embora não sejam todos concordantes com a hipótese de Moore (1952), em parte a confirmam, como no caso de Candida tropicalis (tabela 2), Hansenula californica (tabela 3), Pichia polymorpha e Leucosporidium scottii (tabela 4), Kloeckera africana e Saccharomyces ludwigii (tabela 6), por exemplo, nos experimentos de atração em caixa. Quanto a locais de criação, essas duas espécies se excluíram, completa ou parcialmente, por exemplo em Candida pseudotropicalis, (tabela 20), Hansenula polymorpha (tabela 21), Torulopsis dattila e T. erbonii (tabela 22), Rhodotorula glutinis e Tricosporon pullulans (tabela 23), Citeromyces matritensis e Shizoblastosporion starkeyi (tabela 24).

Essas observações de não ocupação de nichos ecológicos idênticos, por D. melanogaster e D. simulans, evidenciam que, pelo menos nesses casos, tem validade o princípio da exclusão competitiva de Gause (1934, 1971).

Por outro lado, o princípio da exclusão competitiva é ainda controvertido quanto a uma aplicação universal (veja por exemplo, Ayala 1968, 1969, 1970 e 1971, Levens 1968, Mourão e Ayala 1971 e Tadei 1973). Os próprios resultados deste trabalho mostraram que D. melanogaster e D. simulans não se excluíram, por exemplo em Candida krusei e C. macedoniensis (tabelas 2 e 20), Hansenula anomala (tabelas 3 e 21), Pichia etchellsii e P. fermentans (tabelas 4 e 22), Tricosporon aculeatum e Cryptococcus albidus (tabela

las 5 e 23).

Moore (1952) considerou que o ambiente aparentemente uniforme de uma caixa de população pode conter muitas variáveis ambientais capazes de influenciar a competição entre duas espécies. Tadei (1973) afirma que para rejeitar a ocorrência de competição em populações experimentais de Drosophila, é preciso admitir a existência, nas garrafas de cultura, de mais de um recurso alimentar não limitado.

Os resultados deste trabalho podem inserir-se no debate relativo à competição interespecífica como uma indicação forte de que o estudo da competição poderá a adicionar dados esclarecedores, quando feito em condições controladas da qualidade do alimento, espécies de levedura no caso de Drosophila. A caracterização dos locais de criação e de reprodução, para uma dada espécie de Drosophila, depende das relações entre todas as espécies dos dois e elementos da associação, presentes em um dado ambiente. Em otras palavras, requer o conhecimento das condições em que se estabelece ou não a competição, da qual resulta a constituição da comunidade biológica do habitat considerado.

Foi mostrado que certas leveduras permitem ótimo desenvolvimento de determinadas espécies de Drosophila porém não de outras. Sob este aspecto, uma análise mais minuciosa, envolvendo microrganismos filogeneticamente próximos, parecia desejável. Os testes de produtividade nas

5 espécies de Candida foram feitos com esse objetivo.

Embora pertencentes ao mesmo gênero, as 5 espécies de Candida mostraram-se bastante diversificadas quanto as interações com cada uma das espécies de Drosophila, consideradas constantes as demais condições ambientais, controladas no laboratório.

As diferenças foram extremas em C. krusei que permitiu o desenvolvimento de 1762 indivíduos de D. ananassae e apenas 9 de D. hydei. Essa diferença é extraordinária, mesmo considerando-se que a primeira espécie é em geral mais prolífica que a segunda (tabela 34). Quanto a capacidade de atração dessas 5 leveduras, os extremos foram C. macedonensis para D. simulans, até C. albicans que se mostrou praticamente incapaz de atrair D. ananassae (tabela 40).

A par de diferenças interespecíficas, algumas intraspecíficas também foram notáveis. Excluída C. macedonensis, as outras 4 espécies mostraram-se significativamente mais favoráveis ao desenvolvimento de fêmeas que de machos de D. simulans. Por outro lado excluídas D. ananassae e D. hydei, as outras 3 espécies mostraram desproporção sexual significativa entre os descendentes, em C. pseudotropicalis (tabela 36).

Outra ordem de variações refere-se à biomassa individual de cada sexo e às razões entre as biomassas individuais dos dois sexos nas diferentes leveduras. Por exemplo, os machos de D. hydei atingiram em C. albicans biomassa indi

vidual quase 3 vezes maior que em C. macedoniensis. As fêmeas de D. kikkawai em C. tropicalis tiveram biomassa acima de 3 vezes superior à conseguida em C. krusei. Esses resultados não parecem expressar efeitos de densidade (tabela 38).

As razões entre as biomassas individuais dos dois sexos também variaram conforme a levedura. Enquanto machos e fêmeas de D. melanogaster tiveram biomassas aproximadamente iguais em C. macedoniensis, em C. krusei a das fêmeas foi 1,5 vez maior que a dos machos. Diferenças da mesma ordem ocorreram com D. ananassae, em C. macedoniensis e C. tropicalis. Comparativamente, as razões relativas a D. simulans variaram pouco (tabela 39).

As biomassas individuais dos dois sexos, no meio de cultura a base de trigo-fubá, foram em geral maiores que nas espécies de Candida. Entretanto, ocorreram algumas exceções: machos e fêmeas de D. hydei atingiram em C. albicans biomassa cerca de 1,5 vês maior que no meio de cultura de trigo-fubá; para os dois sexos, a biomassa individual de D. kikkawai em C. tropicalis foi cerca de 2,5 vezes maior que no meio de trigo-fubá (tabelas 37 e 38).

Essas observações mostram a existência de diferentes graus de interação, não só espécie-levedura como sexo-levedura, no número e na biomassa da progênie.

Os resultados obtidos, no seu todo, mostraram que são extremamente complexas as relações entre as

espécies de Drosophila e as de microrganismos, mesmo em experimentos de laboratório, nos quais as condições ambientais são parcialmente controladas. Mostraram, entretanto, a necessidade do trabalho no laboratório como meio para a compreensão das interações na natureza, mais complexas ainda pela existência de inúmeras variáveis, das quais muitas têm influências até hoje pouco conhecidas.

As espécies de Drosophila estudadas, como foi apontado por outros autores, desde Wagner (1944), mostraram-se diferenciadas fisiologicamente com respeito às exigências nutricionais. Essa diferenciação, variável no espaço e no tempo, é reflexo da constituição genética, não só das moscas como das próprias leveduras das quais se alimentam. A base genética dessa diferenciação, relacionada com as moscas e os microrganismos é afinal o conhecimento necessário para a interpretação da associação Drosophila-leveduras.

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

This is a study of the relationship between species of Drosophila and yeasts in terms of attraction and productivity. The experiments involved 5 species of Drosophila (D. ananassae, D. hydei, D. kikkawai, D. melanogaster and D. simulans) and 44 of yeasts belonging to 19 genera.

A new technique was used for sterilizing the digestive tract of the flies. They are maintained for 3 days in culture media to which fungicides and bactericides were added.

An apparatus was designed for the study of attraction. Up to 22 species of yeasts can be exposed simultaneously, each in one of the 22 half-pint bottles disposed in the attraction cage. The flies are released in the cage and after a fixed time the bottles are plugged and the flies in each bottle are counted.

Both the sterilizing technique and the attraction cage were efficient for the intended purposes.

Their use will open several possibilities for the study of the Drosophila-yeasts association.

Evidences of differential attraction of the species of Drosophila to the different species of yeasts were found. A criterion is proposed to distinguish between qualitative and quantitative differences.

The nutritional preferences of adult flies followed an increasing degree of flexibility, being D. hydei < D. ananassae < D. kikkawai = D. melanogaster < D. simulans.

No evidences of differential effects of the yeasts in attracting males and females were observed.

The results of attraction experiments in nature, with baits inoculated with specific yeasts, were partially concordant with hypotheses based on the attraction cage tests.

Two experiments carried out in the attraction cage with different groups of yeasts gave strongly concordant results. This fact is pointed out as a laboratory evidence of the differential attraction of the flies to the yeasts.

Marked differences also occurred for the productivities of the Drosophila species in the yeasts. However, the correlations between attraction and productivity in the same yeasts were weak. These facts are pointed out as laboratory evidences of the natural breeding

and feeding sites. One species of yeast may attract a large number of flies, which may or may not leave a large number of descendants.

In 5 species of the Candida genus, different degrees of interaction in biomass and number of the progeny, not only species-yeast but also sex-yeast, were observed.

The results obtained for attraction and productivity gave pro and con evidences of the competitive exclusion principle. Procedures are suggested to tackle this problem.

8. LITERATURA CITADA

- ALI, A. M. M. & EL-HELW, M. R., Differences in the yeasts preferred by Drosophila melanogaster and D. simulans. Egypt. Jour. Genet. Cytol., 3: 204-210, 1974.
- AYALA, F. J., Genotype, environment and population numbers, Science, 162: 1453-1459, 1968.
- AYALA, F. J., Experimental invalidation of the principle of competitive exclusion. Nature, 224: 1076-1079, 1969.
- AYALA, F. J., Competition, coexistence, and evolution. Em "Essays in Evolution and Genetics in Honor of Theodosius Dobzhansky". Appleton Century-Crofts, New York. Capitulo 4: 121-158, 1970.
- AYALA, F. J., Competition between species: Frequency dependence. Science, 171: 820-824, 1971.
- BARKER, J. S. F., The estimation of relative fitness of Drosophila populations. V. Generation interval and heterogeneity in competition. Evolution, 21: 299-309, 1967.

- BARKER, J. S. F., Ecological differences and competitive interaction between Drosophila melanogaster and Drosophila simulans in small laboratory populations. Oecologia, 8: 139-156, 1971.
- BARNETT, J. A. & PANKHURST, R. J., A new key to the yeasts. North-Holland Publishing Company, 273 pp., 1974.
- BÉLO, M., Flutuações em uma população de Drosophila de habitat doméstico. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, 1973.
- BÉLO, M. & GALLO, A. J., Domestic Drosophila species. I. Flies collected in Olímpia, SP, Brazil. D.I.S., 52: 137-138, 1977.
- BÉLO, M., & LEMOS, M. V., Domestic Drosophila species. IV. Males and females collected in different hours of the day. D.I.S., 1978 (no prelo).
- BÉLO, M. & OLIVEIRA FILHO, J. J., Espécies Domésticas de Drosophila. V. Influências dos fatores ambientais no número de indivíduos capturados. Rev. Brasil. Biol., 36: 903-909, 1976.
- BICUDO, H. E. M. de C., & RICHARDSON, R. H., Morphological and developmental studies of Drosophila mulleri, D. arizonensis and their hybrids. Biologisches Zentralblatt, 1977 (no prelo).
- BORTOLOZZI, J., PAGANI, M. I., GOLDONI, J. S. & MONTEIRO, A. G., Drosophila e leveduras da região de Humaitá - (AM). Ciênc. Cult., 28: 311-312, 1976.

- BRNCIC, D., Las especies chilenas de Drosophilidae. Univ. de Chile. 136 pp., 1957.
- BRNCIC, D. & BRIONES, H., Tumors and nutrition. D.I.S., 23: 86, 1949.
- BUZZATI-TRAVERSO, A., Preference of D. subobscura for wild yeasts. D.I.S., 23: 88, 1949.
- CARMO SOUZA, L. DO, Distribution of yeasts in nature, em The Yeasts (editado por A. H. Rose e J. S. Harrison), Academic Press. vol. I: 79-106, 1969.
- CARSON, H. L., Breeding sites of Drosophila pseudoobscura and Drosophila persimilis in the transition zone of the Sierra Nevada. Evolution, 5: 91-96, 1951.
- CARSON, H. L., KNAPP, E. P. & PHAFF, H. J., Studies on the ecology of Drosophila in the Yosemite region of California. III. The yeast flora of the natural breeding sites of some species of Drosophila. Ecology, 37: 538-544, 1956.
- CARSON, H. L. & WASSERMAN, M., A widespread chromosomal polymorphism in a widespread species, Drosophila buzzatti. Am. Nat., 99: 111-115, 1965.
- COOPER, D. M., Food preferences of larval and adult Drosophila. Evolution, 14: 41-55, 1960.
- CROMBIE, A. C., Interspecific competition. J. Animal Ecol., 16: 44-73, 1947.
- CUNHA, A. B. DA, Modification of the adaptative values of chromosomal types in Drosophila pseudoobscura by

- nutritional variables. Evolution 5: 395-404, 1951.
- CUNHA, A. B. DA, Contribuição ao estudo da adaptação das populações de Drosophila (Diptera) a diferentes levedos. Bol. F.F.C.L., USP, nº 220, Biol. Geral nº 10: 1-56, 1957.
- CUNHA, A. B. DA, DOBZHANSKY, TH. & SOKOLOFF, A., On food preferences of sympatric species of Drosophila. Evolution, 5: 97-101, 1951.
- CUNHA, A. B. DA, SHEHATA, A.M.El-TABEY & OLIVEIRA, W. DE, A study of the diets and nutritional preferences of tropical species of Drosophila. Ecology, 38: 98-106, 1957.
- DOBZHANSKY, TH., Genética do processo evolutivo. Tradução de C. A. Mourão. Editoras Polígono e da Universidade de São Paulo, 453 pp., 1970.
- DOBZHANSKY, TH., COOPER, D. M., PHAFF, H. J., KNAPP, E. P. & CARSON, H. L., Studies on the ecology of Drosophila in the Yosemite region of California. IV. Differential attraction of species of Drosophila to different species of yeasts. Ecology, 37: 544 - 550, 1956.
- DOBZHANSKY, TH. & CUNHA, A. B. DA, Differentiation of nutritional preferences in Brazilian species of Drosophila. Ecology, 36: 34-39, 1955.
- DOBZHANSKY, TH. & PAVAN, C., Local and seasonal variations in relative frequencies of species of Drosophila in

- Brazil. J. Animal Ecol. 19: 1-14, 1950.
- DOBZHANSKY, TH. & SPASSKY, B., Environmental modification of heterosis in Drosophila pseudoobscura. P.N.A.S., 40: 407-415, 1954.
- DOBZHANSKY, TH., SPASSKY, B. & TIDWELL, T., Genetics of natural populations. XXXII. Inbreeding and the mutational and balanced genetic loads in natural populations of Drosophila pseudoobscura. Genetics, 48: 361-373, 1963.
- DUDGEON, E., Species differences in the utilization of wild yeast by Drosophila. Univ. Texas Publ., 5422: 65-97, 1954.
- EHRlich, P. R. & RAVEN, P. H., Butterflies and plants, a study in coevolution. Evolution, 18: 586-608, 1964.
- EL-HELW, M. R. & ALI, A. M. M., Competition between Drosophila melanogaster and D. simulans on media supplemented with Saccharomyces and Schizosaccharomyces. Evolution, 24: 531-537, 1970.
- EL-HELW, M. R. & ALI, A. M. M., Fitness of Drosophila on media supplemented with different races of Saccharomyces cerevisiae. Egypt. Jour. Genet. Cytol., 2: 283-287, 1973.
- FRANK, P. W., A laboratory study of intraspecies and interspecies competition in Daphnia pulicaria (Forbes) and Simocephalus vetulus O. F. Müller. Physiol. Zoöl., 25: 178-204, 1952.

- FROTA-PESSOA, O., Flower feeding Drosophilidae. D.I.S., 26: 101-102, 1952.
- GALLO, A. J., Morphological distinction between female Drosophila melanogaster and female D. simulans. Ciênc. Cult., 25: 341-345, 1973.
- GAUSE, G. F., The struggle for existence. Dover Publications, Inc. (Edição inalterada de Willians & Wilkins Company em 1934) 163 pp., 1971.
- HEED, W. B., Ecological and distributional notes on the Drosophilidae (Diptera) of El-Salvador. Univ. Texas Publ., 5721: 62-78, 1957.
- KREGER-VAN RIJ, N. J. W., Taxonomy and systematics of yeasts em The Yeasts (editado por A. H. Rose e J. S. Harrison), Academic Press, vol. I: 5-78, 1969.
- LAST, F. T. & PRICE, D., Yeasts associated with living plants and their environments em The yeasts (editado por A. H. Rose e J. S. Harrison), Academic Press. vol. I: 183-218, 1969.
- LEVINS, R., Evolution in changing environments. Monographs in Population Biology. Ed. R. H. Mac Arthur, Princeton University Press, 120 pp., 1968.
- LINDSAY, S. L., Food preferences of Drosophila larvae, Am. Nat., 92: 279-285, 1958.
- MATHER, W. B., The genus Drosophila (Diptera) in Eastern Queensland. II. Seasonal changes in a natural population 1952-1953. Aust. Jour. Zool., 4:65-75, 1956.

- MILLER, D. D. & WEEKS, L., Drosophila collections near the Blue Ridge of southwestern North Carolina. Amer. Midl. Natur., 72: 93-114, 1964.
- MITTLER, S., Influence of nutrition upon appearance of tumors in Tu50j stock of D. melanogaster. Science, 115: 271-272, 1952.
- MOORE, J. A., Competition between Drosophila simulans and Drosophila melanogaster. I. Population cage experiments. Evolution, 6: 407-420, 1952.
- MOURÃO, C. A., Estudos ecológicos e taxonômicos em populações naturais do gênero Drosophila Fällén (1823) que habitam duas matas de Mirassol, S.P., Tese de Doutorado - F. F. C. L. de S.J.do Rio Preto, 1966.
- MOURÃO, C. A. & AYALA, F. J., Competition between strains of Drosophila willistoni and D. pseudoobscura. Experientia, 27: 343, 1971.
- MOURÃO, C. A., GALLO, A. J., BICUDO, H. E. M. DE C., Sobre a sistemática de Drosophila no Brasil, com descrição de D. mendeli sp. n. e "Relação de Espécies Brasileiras do Gênero Drosophila". Ciênc. Cult. 14: 577-586, 1965.
- MOURÃO, C. A., GALLO, A. J. & BICUDO, H. E. M. DE C., Drosophila morgani, nova espécie brasileira (Drosophilidae, Diptera). Papéis Avulsos Zool., São Paulo, 20 (art. 15): 159-164, 1967.

- PARSONS, P. A., The comparative evolutionary biology of the sibling species, Drosophila melanogaster and D. simulans. Quart. Rev. Biol., 2: 151-169, 1975.
- PATTERSON, J. T., Fluctuations in the populations of Drosophila. Univ. Texas Publ., 4313: 203-214, 1943.
- PATTERSON, J. T. & WAGNER, R., Geographical distribution of species of the genus Drosophila in the United States and México. Univ. Texas Publ., 4313: 217-281, 1943.
- PAVAN, C., Relações entre populações de Drosophila e o meio ambiente. Bol. F. F. C. L. da USP, 221, Biol. Geral, 11: 1-81, 1957.
- PHAFF, H. J., MILLER, M. W., RECCA, J. A., SHIFRINE, M. & MRAK, E. M., Studies on the ecology of Drosophila in the Yosemite region of California. II. Yeasts found in the alimentary canal of Drosophila. Ecology, 37: 533-538, 1956.
- PIPKIN, S. B., Seasonal fluctuations in Drosophila populations at different altitudes in the Lebanon Mountains. Z.I.A.V., 84: 270-305, 1952.
- PIPKIN, S. B., Fluctuations in Drosophila populations in a tropical area. Am. Nat., 87: 317-322, 1953.
- PIPKIN, S. B., Sex ratio in wild populations of Drosophila. Genetics, 41: 656, 1956.
- PIPKIN, S. B., New flower breeding species of Drosophila (Diptera, Drosophilidae). Proc. Entomol. Soc. Wash.,

66: 217-245, 1964.

- PIPKIN, S. B., The influence of adult and larval food habits on population size of neotropical ground-feeding Drosophila. Am. Midl. Nat., 74: 1-27, 1965.
- PIPKIN, S. B., RODRIGUEZ, R. L., LEÓN, J., Plant host specificity among flower feeding Neotropical Drosophila (Diptera, Drosophilidae). Am. Nat. 100: 135-156, 1966.
- ROBERTSON, F. W., SHOOK, M., TAKEI, G. & GAINES, H., Observations on the biology and nutrition of Drosophila disticha, Hardy, and indigenous Hawaiian species. Univ. Texas Publ., 6818: 279-299, 1968.
- SHEHATA, A. M. EL-TABEY & MRAK, E. M., The fate of yeast in the digestive tract of Drosophila. Am. Nat., 85: 381-383, 1951.
- SHEHATA, A. M. EL-TABEY & MRAK, E. M., Intestinal yeast floras of successive populations of Drosophila, Evolution 6: 325-332, 1952.
- SPIETH, H. T. & HSU, T. C., The influence of light on the mating behaviour of seven species of the Drosophila melanogaster species group. Evolution, 4: 316-325, 1950.
- TADEI, W. J., Aptidão competitiva e coexistência em populações experimentais de Drosophila. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP, 1973.

- TANTAWY, A. O. & SOLIMAN, M. H., Studies on natural populations of Drosophila VI. Competition between Drosophila melanogaster and Drosophila simulans. Evolution, 21: 34-40, 1967.
- WAGNER, R. P., The nutrition of Drosophila mulleri and Drosophila aldrichi. Growth of larvae on cactus. Univ. Texas Publ., 4445: 104-128, 1944.
- WAGNER, R. P., Nutritional differences in the Mulleri Group. Univ. Texas Publ., 4920: 39-41, 1949.
- WALLACE, B. & DOBZHANSKY TH., Experiments on sexual isolation in Drosophila. VIII. Influence of light on the mating behaviour of Drosophila subobscura, Drosophila persimilis and Drosophila pseudoobscura. P.N.A.S., 32: 226-234, 1946.
- WHEELER, M. R., TANAKA, H. & BRNCIC, D., The flavopilosa species group of Drosophila. Univ. Texas. Publ., 6205: 395-413, 1962.