

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Alterações Evolutivas durante a Adaptação ao Cativeiro:
Análise de Características Morfológicas, Comportamentais e da
História da Vida

Inês Regina Lopes de Mendonça Fragata

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Alterações Evolutivas durante a Adaptação ao Cativeiro:
Análise de Características Morfológicas, Comportamentais e da
História da Vida

Inês Regina Lopes de Mendonça Fragata

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Margarida Matos

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

2007

À minha Família e Amigos

“Nada faz sentido em biologia excepto à luz da evolução”
- Dobzhansky

Agradecimentos

Foram muitas as pessoas que contribuíram para esta tese nos mais variados aspectos. No entanto, tal como existem factores preponderantes durante a evolução de uma população, existem pessoas que foram essenciais para esta tese e a quem não posso deixar de agradecer.

À minha orientadora, Professora Margarida Matos por toda a ajuda, (muita) paciência e apoio que me deu durante o trabalho e elaboração desta tese. Mas principalmente por me ter mostrado o (não mágico, mas científico e muito provavelmente maravilhoso) mundo da Evolução Experimental.

Ao pessoal do laboratório de Evolução Experimental que fez com que (quase) fosse um prazer levantar-me da cama todos os dias para ir trabalhar:

Carla Rego, por me ajudar a propôr (todos e mais alguns) ensaios de comportamento à Professora e pelas dicas preciosas e sorriso pronto em mais do que uma ocasião;

Pedro Simões pelo apoio e amizade que me deu e pela ajuda nos mais diversos aspectos, pelas dúvidas a que me respondeu e pelo “mau ambiente” (essencial para um bom trabalho) que criou no laboratório com a sua presença;

Josiane Santos pelo apoio incondicional e amizade que mostrou ao longo de todo o trabalho. Pelas muitas horas passadas no laboratório em conjunto (“é tão bom, uma amizade assim...”), ajuda nos ensaios de comportamento, e pelas discussões muito frutíferas para a elaboração desta tese;

Marta Santos, que recentemente se converteu ao maravilhoso mundo da *Drosophila subobscura* e da Evolução Experimental, pela ajuda preciosa nos ensaios de comportamento e por me aturar já há muitos e longo anos.

Aos meus amigos, que são muitos e dos mais variados feitios e formas e que me fariam ocupar mais páginas do que tenho na tese a dizer o porquê de lhes agradecer. Vocês foram essenciais para que esta “fragata chegasse a bom porto”. Queria agradecer especialmente ao Bruno Afonso por acreditar em mim e ao João Leitão pela companhia constante nos fins de semana de trabalho passados na faculdade, pela amizade e apoio incondicional nos últimos anos e dicas nos retoques finais desta tese.

Por último, mas não menos importante, à minha família, por todo o apoio e amor que me demonstraram e por serem um pilar essencial da minha vida. Queria agradecer principalmente ao Paulo por me ter ajudado a rever a tese uma última vez e à minha avó por tudo (e mais alguma coisa).

Resumo

A dinâmica da adaptação ao cativeiro é um tema que tem gerado alguma controvérsia na área da Evolução Experimental. Nesta tese abordam-se diversos aspectos da dinâmica da adaptação ao laboratório, traçando trajectórias evolutivas para características da história da vida em populações de *Drosophila subobscura*. Os principais aspectos focados são 1) a importância de efeitos temporais e geográficos (diferentes anos e locais de fundação) na dinâmica evolutiva inicial na adaptação ao laboratório, 2) a comparação dessa dinâmica quando analisada quer pelo método da evolução em tempo real, quer quando inferida através do método comparativo, e 3) a existência de diferenças entre populações há mais e menos tempo em laboratório, em termos de fecundidade, resistência à inanição, comportamento e tamanho do corpo do adulto. Os resultados sugerem um padrão geral de adaptação nas populações fundadas até 2005, embora as respostas evolutivas de algumas características possam ser afectadas pelo ano e/ou local de fundação. Observou-se ainda uma falha na capacidade de previsão das dinâmicas evolutivas traçadas pelo método comparativo, quando introduzida a fundação CW. Os resultados da comparação da diferenciação de populações há mais e menos tempo em laboratório sugerem que, apesar de não haver diferenças no tamanho do adulto, fecundidade e resistência à inanição, existem diferenças no comportamento dos machos durante o acasalamento. No conto geral este trabalho mostra o papel preponderante da selecção natural durante a adaptação ao laboratório, apesar de existirem contingências, ilustradas na similaridade inesperada de populações recém-introduzidas e populações já estabilizadas no laboratório. Este problema apenas reforça o facto de ser necessário cuidado com as inferências a tirar a partir de estudos evolutivos, nomeadamente quando é utilizado o método comparativo, apelando a um estudo mais diversificado de características relacionadas com a *fitness*, de modo a obter uma caracterização mais fina e precisa das dinâmicas evolutivas subjacentes ao laboratório.

Palavras chave: adaptação ao laboratório, trajectórias evolutivas, *Drosophila subobscura*, características da história da vida, comportamento, morfologia.

Abstract

The dynamics of adaptation to captivity has raised some controversial issues in the area of Experimental Evolution. In this thesis I tackle different aspects of evolutionary dynamics of adaptation to the laboratory environment, by generating real time evolutionary trajectories of life history traits for *Drosophila subobscura* populations. The main issues are 1) the impact of temporal and geographical effects of foundation in the initial dynamics of laboratory evolution (i.e. repeatability of the adaptive process); 2) the comparison of evolutionary dynamics analysed either with comparative or with real time evolution, and 3) the existence of differences in traits like fecundity, starvation resistance, behaviour and adult body size between populations recently founded and longer established in the laboratory. The results point to a general adaptive response in populations founded until 2005, although evolutionary responses of some traits can be influenced by year and/or local of foundation. It was also observed a lack of consistence between the dynamics inferred through comparative method and evolutionary trajectories, suggesting a low predictive capacity of the first. The comparison of initial differentiation between recently founded and a longer established population suggests that, although there aren't differences in adult body size and life history traits, there are some differences between these populations in male mating ability. This work shows that natural selection plays a major role in adaptation to laboratorial environment, although there are some contingencies during the study of this process, as illustrated by the unexpected similarity of CW and NW populations in their initial performance. This issue strengthens the need for caution when making evolutionary inferences, especially if using the comparative method. It also enlightens the necessity to pursue a more diversified study of fitness related traits in different populations, so that there can be more precise characterization of evolutionary dynamics subjacent to laboratory adaptation.

Keywords: laboratory adaptation, evolutionary trajectories, *Drosophila subobscura*, life history traits, behaviour, morphology.

Índice

| | |
|---|------|
| Agradecimentos | vi |
| Resumo | viii |
| Abstract | x |
| Índice | xii |
| Lista de Figuras | xiv |
| Lista de Tabelas | xvi |
| Introdução Geral | 1 |
| | |
| 1 – Contingências Evolutivas Durante a Adaptação ao Cativeiro | |
| 1.1 – Introdução | 8 |
| 1.2 – Materias e Métodos | 10 |
| 1.3 – Resultados | 15 |
| 1.4 – Discussão | 22 |
| | |
| 2 – Método comparativo <i>vs</i> Evolução em Tempo Real | |
| 2.1 – Introdução | 26 |
| 2.2 – Materiais e Métodos | 28 |
| 2.3 – Resultados | 30 |
| 2.4 – Discussão | 35 |
| | |
| 3 – Diferenciação Inicial na Adaptação ao Laboratório | |
| 3.1 – Introdução | 38 |
| 3.2 – Materiais e Métodos | 40 |
| 3.3 – Resultados | 48 |
| 3.4 – Discussão | 58 |
| | |
| Considerações Finais | 62 |
| | |
| Bibliografia | 66 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| A - Filogenia de todas as populações presentes no laboratório, respectivos anos e locais de fundação. | 6 |
| 1.1 - Hierarquia das fundações utilizada neste estudo | 11 |
| 1.2 - Variação da resposta evolutiva (declive) das diferentes fundações. | 17 |
| 1.3 - Resposta evolutiva durante as gerações iniciais de todas as fundações. | 19 |
| 1.4 - Distribuição dos valores apresentados pelo fenótipo composto no início e no fim do período estudado. | 21 |
| 1.5 - Distribuição da variação associada ao fenótipo composto dos declives (esquerda) e diferenciação inicial (direita). | 21 |
| 2.1 - Trajectórias Evolutivas para o regime NW (à esquerda) vs Método Comparativo (à direita) utilizando os regimes CW, FWA, TW e NW. | 31 |
| 3.1 - Valores médios de tempo dos machos NW e CW no ensaio da geração 4 (à esquerda) e na geração 6 (à direita). | 50 |
| 3.2 - Valores médios das várias direcções dos cruzamentos, para a duração da cópula na geração 6. | 52 |
| 3.3 - Valores médios no tempo de corte (esquerda) e cópula (direita), da interacção fêmea*macho. | 53 |
| 3.4 - Valores médios da duração das cópulas para cada regime. | 54 |
| 3.5 - Valores médios da resistência dos machos à inanição na geração 4 (esquerda) e 7 (direita). | 56 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| 1.1 - Valores de ANOVA para testar a existência de efeito de amostragem. | 15 |
| 1.2 - Valores ANCOVA às diferenças entre fundações. | 16 |
| 1.3 - Valores de testes ANCOVA às diferenças entre o local de fundação e o ano, correspondentes aos anos 2001 e 2005. | 16 |
| 1.4 - Valores de teste ANCOVA às diferenças entre o local de fundação e o ano, correspondentes a todos os anos em que foram feitas fundações (1998, 2001 e 2005). | 16 |
| 1.5 - Valores de diferenciação inicial de cada fundação ao controlo. | 18 |
| 2.1 - Modelos de regressão obtidos utilizando Trajectórias Evolutivas e Método Comparativo. | 33 |
| 2.2 - Resultados de testes ANCOVA às diferenças entre modelos obtidos pelo método comparativo <i>versus</i> trajectórias evolutivas. | 34 |
| 3.1 - Teste t às diferenças de densidade e de número de fugas entre regimes | 49 |
| 3.2 - Valores dos testes ANOVA às diferenças entre fêmeas, machos e tipo de casal nas gerações 4 e 6 do regime CW. | 49 |
| 3.3 - Valores do teste t feito às diferenças no número de cortes com cópula entre acasalamentos homogâmicos e heterogâmicos para as gerações 4 e 6. | 51 |
| 3.4 - Valores dos testes ANCOVA às diferenças entre gerações para fêmeas, e machos. | 51 |
| 3.5 - Valores dos testes ANOVA às diferenças entre as direcções dos cruzamentos e os contrastes. | 51 |
| 3.6 - Número de cortes e acasalamentos dos machos azuis CW e NW e para machos CW com <i>pool</i> de dados. | 52 |
| 3.7 - Valores dos testes ANOVA ao efeito cor e às diferenças entre fêmeas, machos e tipo de casal para início de corte e cópula. | 53 |
| 3.8 - Valores do teste ANOVA às diferenças entre regimes para início, duração, número e tempo entre cópulas. | 54 |
| 3.9 - Valores do teste ANCOVA às diferenças entre regimes para a duração da cópula tendo em conta o número de cópulas já feitas anteriormente. | 54 |
| 3.10 - Valores de teste ANOVA às diferenças de tamanho entre regimes, para machos e fêmeas, e entre machos e fêmeas. | 55 |
| 3.11 - Valores de teste ANOVA às diferenças entre regimes na geração 4 e 7 e entre as gerações para casais homogâmicos dos regimes CW e NW. | 55 |
| 3.12 - Valores dos testes ANOVA às diferenças entre os regimes das fêmeas, machos e tipo de casal nas gerações 4 e 7. | 55 |
| 3.13 - Valores de diferenciação inicial de cada população ao controlo NW e sua significância. | 57 |
| 3.14 - Valores dos testes ANOVA e contrastes da diferenciação inicial dos regimes. | 57 |

Introdução Geral

A Biologia Evolutiva é a área da biologia que tem como principais objectivos descrever e analisar a história evolutiva de todos os organismos e os processos, mecanismos e causas subjacentes, explicando a diversidade biológica existente na actualidade, que existiu anteriormente, e que poderá surgir no futuro, a vários escalas de perspectiva (Futuyma, 1998).

Adaptação e Evolução Experimental

A Evolução Experimental é, por excelência, a área da Biologia Evolutiva que estuda os processos adaptativos de populações, mais especificamente, as mudanças a nível microevolutivo que caracterizam os processos de adaptação a um novo ambiente (Chippindale, 2006), permitindo o estudo dos processos evolutivos através da observação directa e da experimentação de hipóteses com modelos concebidos para controlar factores e permitir extrair conclusões estatisticamente válidas (Futuyma, 1998; Chippindale, 2006). Um dos objectivos dos estudos de Evolução Experimental é caracterizar as potencialidades das populações em responder directamente à selecção, tendo a maioria das características uma resposta significativa quando sob o efeito de selecção direccional. Assim, um dos mecanismos mais utilizados é a imposição de regimes selectivos em populações laboratoriais, mantidas há já um elevado número de gerações noutras condições ambientais, levando eventualmente à divergência entre populações ancestrais e seleccionadas (Rose, 1984; Rose & Lauder, 1996; Chippindale, 2006). Outro aspecto a ter em conta é a existência de alterações evolutivas em características que não estão a ser directamente seleccionadas, mas que podem apresentar correlações genéticas com algumas características directamente relevantes para a *fitness*. Por vezes poderá ocorrer uma quebra no desempenho de características funcionais, explicada pela presença de *trade-offs* entre características. Isto pode não ocorrer quando populações se adaptam a um novo ambiente, já que o conjunto de novos factores ambientais pode gerar correlações genéticas positivas entre características da história da vida, sobretudo numa fase inicial da adaptação (Chippindale *et al*, 1996; Prasad & Joshi, 2003; Chippindale, 2006).

Existem diversas aproximações através das quais se pode estudar a evolução de populações. Entre elas, a selecção natural em laboratório surge como um método muito eficaz para o estudo de respostas evolutivas durante a adaptação. Este método implica que os organismos são colocados num ambiente específico e deixados a evoluir, não havendo uma acção directa do investigador para seleccionar fenótipos (acção essa que ocorre em selecção

artificial). Neste tipo de estudos podem ser aplicados diversos regimes, como por exemplo: regimes demográficos com diferentes densidades, resistência a vários factores de stress ambiental, etc. (e.g. Folk & Bradley, 2005, mas ver mais em Rose & Lauder, 1996; Prasad & Joshi, 2003; Fuller *et al*, 2005; Chippindale, 2006).

Os estudos mais abundantes no âmbito da Evolução Experimental são os de evolução divergente (em ambientes contrastantes, ou entre um ambiente ancestral e um novo). Estudos de evolução convergente são muito menos abundantes, sendo as experiências mais emblemáticas as de reversão evolutiva (e.g. Teotónio & Rose, 2000; Teotónio *et al*, 2002). O teste à convergência é feito através da reimposição de regimes selectivos da população ancestral a populações que sofreram um processo divergente. Isto permite determinar a importância da história das populações na capacidade adaptativa, nomeadamente, na sua capacidade de retornar aos picos adaptativos do seu passado. Este regresso às origens será devido a uma selecção uniforme, o que é de esperar que possibilite a convergência entre regimes. No entanto, existem alguns exemplos de estudos de adaptação em que a aplicação de uma selecção uniforme não leva à convergência entre populações (e.g. Cohan, 1984a e b; Cohan & Hoffmann, 1989).

Devem ser tidos em conta diversos parâmetros ao realizar um estudo de evolução experimental. É fundamental a escolha do organismo modelo a utilizar, que depende muito das questões que se pretende abordar. É essencial ter em conta parâmetros como, por exemplo, o tipo de reprodução, o tempo de gerações e a facilidade de manutenção. O organismo sexuado com maior utilização é a *Drosophila*, devido à sua fácil manutenção, gerações rápidas e ao estudo extensivo do qual tem sido alvo, levando a uma forte base de conhecimentos aos mais diversos níveis (Chippindale, 2006).

Outro aspecto essencial, em estudos de Evolução Experimental, é a replicação, uma vez que é fundamental para testar a repetibilidade dos processos evolutivos que são derivados da aplicação de regimes selectivos. Uma vez que, a unidade de estudo, em evolução experimental, é a população, esta é também a unidade de replicação (Chippindale, 2006).

Como a maior parte dos estudos, sejam convergentes ou divergentes, são feitos em regimes de selecção, um outro aspecto essencial, em evolução experimental, é comparar populações que estão a sofrer o processo e adaptação com populações estáveis, quer por estarem já adaptadas ao novo ambiente ou por serem populações ancestrais. O tipo de controlo a utilizar depende dos estudos a realizar: em estudos de divergência, os controlos utilizados são as populações ancestrais das que estão a ser seleccionadas, e devem estar

adaptadas ao ambiente inicial. Em estudos de convergência os controlos deverão estar estabilizados no ambiente ao qual as novas populações estão a adaptar-se.

Outros factores a ter em conta, em estudos de Evolução Experimental, são o tamanho das populações e o tipo de manutenção destas. O tamanho populacional deve ser grande de modo a minimizar os efeitos da deriva genética e depressão. O tipo de manutenção deve ser padronizada para todos os factores, exceptuando aqueles para os quais está a haver selecção.

Evolução de Características

Uma vez que um dos objectivos da Biologia Evolutiva é explicar a diversidade evolutiva dos organismos vivos, é necessário estudar a evolução das características que permitem aos organismos, directa ou indirectamente, sobreviver e reproduzir-se. Isto inclui características da história da vida (como por exemplo o número e tamanho da descendência, a idade de reprodução e o tempo de vida), morfológicas (tamanho e forma do corpo), fisiológicas e comportamentais (de aquisição de recursos, acasalamento e fuga), etc (Futuyma, 1998). O tipo de características a estudar depende das perguntas a que se quer responder. Por exemplo, em estudos de adaptação são frequentemente utilizadas características que estão relacionadas com a *fitness*, como, por exemplo, a fecundidade, o número de descendentes gerados por cada organismo, o comportamento de acasalamento, a resistência ao stress, o comportamento de exploração de recursos e de fuga ou o tamanho do corpo. É de esperar que, à medida que os organismos se adaptam ao novo ambiente, exista um melhoramento proporcional destas características, aumentando o desempenho dos indivíduos. É no entanto importante não esquecer que estas características poderão sofrer efeitos devido a *trade-offs*, que poderão levar à diminuição de algumas características em detrimento de outras, mais fortemente seleccionadas (Rose, 1984; Rose & Lauder, 1996).

O tamanho do corpo é muito estudado devido às implicações que pode ter na fisiologia e morfologia dos organismos. Numerosos factores são influenciados por esta característica tais como, por exemplo, organismos pequenos levam menos tempo até à maturação, precisam de menos alimento, embora a sua fecundidade seja em geral menor. Por outro lado organismos maiores podem carregar maior quantidade de ovos, armazenar mais nutrientes, embora tenham de arranjar maior quantidade de alimento (Futuyma, 1998).

Os comportamentos são características complexas, que muitas vezes não apresentam uma evolução simples. Pensa-se que o comportamento de acasalamento, devido à sua importância para a reprodução, sofre uma forte pressão selectiva (Futuyma, 1998). Vários

estudos têm sido feitos em *Drosophila* de modo a caracterizar os diferentes tipos de comportamento e a sua determinação genética (Smith, 1956; Singh & Singh, 2003; Mackay *et al*, 2005; Markow & Grady, 2005; Mueller *et al*, 2005; Edwards *et al*, 2006). No entanto, existem relativamente poucos estudos em que se caracterize a evolução do comportamento durante a adaptação a um novo ambiente (Grant & Mettler, 1969; Steele, 1986a e b; Sokolowsky *et al*, 1997; Huey *et al*, 2003; Mueller *et al*, 2005).

Adaptação ao Laboratório

A utilização do laboratório como um ambiente propício ao estudo da dinâmica evolutiva durante a adaptação tem sido alvo de críticas por parte de alguns autores (Harshmann & Hoffmann, 2000). Isto devido tanto aos resultados díspares obtidos entre diversos laboratórios e/ou investigadores, como devido às questões que podem ser respondidas com este tipo de estudos. No entanto é importante não esquecer que o laboratório “apenas” mais um tipo de ambiente no qual se pode ver a evolução de populações, gerando resultados ao nível microevolutivo e permitindo identificar e caracterizar as mudanças fenotípicas, alélicas ou mesmo genómicas, que ocorrem durante este processo (Matos *et al*, 2000a).

O método comparativo tem sido frequentemente utilizado para inferir dinâmicas evolutivas de populações a adaptar-se ao ambiente de laboratório (Sgrò & Partridge, 2000; Hoffmann *et al*, 2001; Gilligan & Frankham, 2003; Griffiths *et al*, 2005). Neste método, populações introduzidas no ambiente laboratorial são comparadas sincronizadamente, assumindo-se que estão em diferentes estados do processo de adaptação, sendo utilizadas para traçar a trajectória evolutiva, como se fossem apenas uma população em alteração temporal. O pressuposto base destes estudos é que populações, recolhidas em diferentes tempos, ao adaptarem-se ao mesmo ambiente, terão a mesma trajectória evolutiva, o que pode não ser válido (Matos *et al*, 2004; Simões *et al*, 2007b).

O estudo de evolução em tempo real é um método muito menos utilizado, uma vez que é mais moroso e demorado que o método comparativo. Neste tipo de estudos são traçadas trajectórias evolutivas desde a introdução das populações no laboratório, ao longo de várias gerações, proporcionando um estudo detalhado da dinâmica evolutiva das mesmas. Esta metodologia permite testar o pressuposto de convergência, assim como analisar uma série de outras questões evolutivas, como a repetibilidade dos processos evolutivos, a importância do efeito fundador e do fundo genético das populações naturais, a evolução a longo prazo, etc. Infelizmente, poucas equipas utilizam esta metodologia, e as excepções envolvem em geral

um período reduzido de gerações (e.g. Hercus & Hoffmann, 1999; Krebs *et al*, 2001). A equipa no âmbito da qual foi elaborada esta tese, tanto quanto se sabe, é a que possui os estudos mais longos de adaptação ao laboratório (Matos *et al*, 2000a, 2002, 2004; Simões *et al*, 2007a, b).

Ao longo de mais de quinze anos, essa equipa tem analisado a evolução durante a adaptação ao laboratório de populações de *Drosophila subobscura* desde a sua fundação a partir de colheitas na Natureza (Matos *et al*, 2000a, 2002, 2004; Simões *et al*, 2007a, b). Até agora têm sido, estudadas diversas características da história da vida, em várias populações fundadas a partir de diferentes locais e/ou anos. Estes trabalhos têm permitido não só analisar a dinâmica evolutiva destas características durante a adaptação ao laboratório, como testar a semelhança entre taxas e padrões evolutivos entre populações com diferentes fundações, quer a curto quer a longo prazo. Isto é feito através da análise dos valores médios das características da história da vida ao longo de diversas gerações, utilizando-os para traçar trajectórias evolutivas em tempo real. O primeiro estudo com replicação foi iniciado em 1998, quando foi feita a fundação NW e envolvendo as populações B (fundadas em 1990) como populações de referência (controles) – que passou a chamar-se NB quando foi feita a replicação da fundação NW . Ambas as fundações foram originadas por uma colheita num pinhal perto da Adraga, Sintra – ver figura A para uma filogenia mais detalhada das populações em laboratório. Com estas populações foi feito um estudo das trajectórias evolutivas, observando-se, o aumento geral do desempenho em várias características da história da vida, aproximando-se os valores da população NW aos da população controlo (Matos *et al*, 2002). Na comparação das primeiras 14 gerações destas populações e de uma anterior (estudo não replicado, ver Matos *et al*, 2000a), observou-se diferenças nas taxas e padrões evolutivos. Estas diferenças foram atribuídas a mudanças na população natural e/ou nas condições experimentais no laboratório (Matos *et al*, 2002). Também com estas populações, foi testada a capacidade de previsão de dinâmicas evolutivas do método comparativo, quando em comparação com o método de evolução em tempo real. Nesta comparação, verificou-se que, para características directamente relacionadas com a *fitness*, o método comparativo conseguia prever as padrões evolutivos, não sucedendo o mesmo, no entanto, para características mais complexas (Matos *et al*, 2004).

O passo seguinte foi tentar responder às questões da repetibilidade do processo evolutivo e de quais os factores que poderiam levar a diferenças entre padrões evolutivos. Para tal, foi feita uma nova recolha, utilizando como locais de fundação a população natural de Sintra, que

deu origem ao regime TW, e a população natural da Arrábida, que deu origem ao regime AR. Com estas populações, procurou-se testar a existência de diferenças nos padrões de evolução e nas dinâmicas adaptativas entre populações fundadas sincronicamente, mas provenientes de locais diferentes. Os resultados da análise das trajectórias evolutivas, da diferenciação inicial e da taxa evolutiva apontam para diferenças na dinâmica adaptativa inicial entre populações de diferentes locais (Simões *et al*, 2007a).

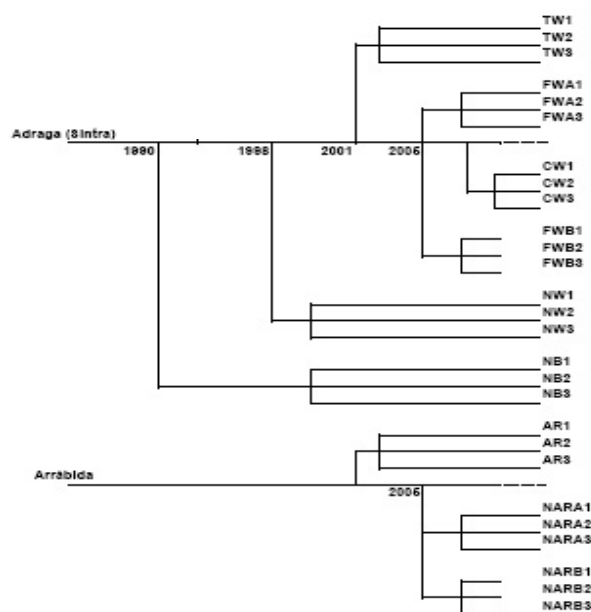


Fig. A – Filogenia de todas as populações presentes no laboratório, respectivos anos e locais de fundação. As populações NB e NW são as utilizadas como referência. No momento de fundação da CW as populações de Sintra: NB (1990), NW (1998), TW (2001), FWA e FWB (2005) estavam, respectivamente, na geração 201, 111, 65, 20. As populações da Arrábida, AR (2001), NARA e NARB (2005) estavam nas gerações 65 e 20. No final de 2006 as populações FWB e NARB foram extintas.

Assim, a conclusão geral, até ao momento, é a de que existe uma clara dinâmica adaptativa durante a evolução no laboratório, bem como uma convergência evolutiva entre populações, embora com diferenças entre características e taxas evolutivas entre populações (Matos *et al*, 2004; Simões *et al*, 2007a). Nesta tese são aprofundadas as diversas questões abordadas nesses estudos, envolvendo: 1) mais gerações em estudos a longo prazo; 2) mais fundações, incluindo duas fundações síncronas de cada um dos dois locais antes estudados; e 3) mais características, incluindo comportamento e morfologia.

Nesta tese as questões principais que se abordam são, assim:

→ Em trabalhos anteriores observaram-se diferenças entre a dinâmica evolutiva de fundações em anos diferentes e locais separados, no entanto não pôde ser excluída a hipótese

de estas diferenças serem devido a efeitos de amostragem. Qual a relevância das diferenças de fundação das populações na sua dinâmica evolutiva inicial? No caso de diferenças espaciais, qual a contribuição de efeitos fundadores de amostragem versus efeitos geográficos (inerentes às populações naturais)? Será que existe repetibilidade na adaptação ao laboratório?

→ O método comparativo é muitas vezes utilizado para estudar trajetórias evolutivas de populações a adaptarem-se ao mesmo ambiente. À semelhança de trabalhos anteriores (Matos *et al*, 2004) serão comparadas ‘trajetórias evolutivas’ obtidas com este método com as obtidas através da análise em tempo real. Será que com um maior número de gerações e fundações a consistência demonstrada anteriormente pelo método comparativo se mantém?

→ Em trabalhos anteriores, foi demonstrado que o período inicial de adaptação ao laboratório é caracterizado por uma dinâmica evolutiva muito intensa. Quando são comparadas populações já estabilizadas em laboratório com populações recém-introduzidas, será que existem sempre diferenças? Será a magnitude dessas eventuais diferenças igual para diferentes fundações?

→ Os estudos feitos, até agora, mostram que características da história da vida, como a fecundidade, sofrem alterações significativas durante a adaptação ao laboratório. Será que características também relacionadas com a *fitness*, como o comportamento e tamanho do corpo, sofrem alterações ao longo do processo adaptativo? Haverá diferenças nessas características em populações há mais e menos tempo em laboratório? De que forma variam estas características? O que sugerem essas eventuais diferenças relativamente à sua relevância para a dinâmica evolutiva das populações em adaptação?

1. Contingências Evolutivas Durante a Adaptação ao Cativeiro

1.1 - Introdução

Quando sujeitas a uma mudança de habitat, ou a outro tipo de alteração ambiental significativa, as populações tendem a manifestar uma adaptação a esse novo ambiente. Esta pode ser a nível de diferentes características fenotípicas (morfológicas, fisiológicas ou comportamentais), mas ocorre sempre no sentido do aumento da *fitness* relativa para aquele ambiente específico, e correspondem a mudanças a nível da distribuição das frequências genotípicas (Matos *et al*, 2000a).

Espera-se que durante a adaptação a ambientes iguais ou semelhantes, diferentes populações manifestem sinais de convergência a partir de determinado momento evolutivo. É também de esperar que populações que apresentem diferenças mais acentuadas de *fitness* na mudança para o novo ambiente, apresentem maior taxa evolutiva durante o processo de convergência (Matos *et al*, 2002; Simões *et al*, 2007a). Esta maior taxa evolutiva pode estar relacionada com pressões selectivas de maior intensidade devido a um baixo desempenho médio dos indivíduos no novo ambiente e ainda (de forma não exclusiva com a anterior) devido a uma maior variabilidade genética expressa no novo ambiente.

Embora existam diversas formas de estudar a adaptação das populações a um novo ambiente, o estudo da convergência ou evolução paralela de populações provenientes de diferentes fundações ou regimes selectivos afigura-se um dos métodos mais robustos e informativos para este estudo. Estranhamente, são encontrados relativamente poucos trabalhos testando a convergência e repetibilidade dos processos de adaptação a um mesmo ambiente (e.g. Teotónio & Rose 2000; Cohan & Hoffmann 1986; Hoffmann & Cohan, 1989; Matos *et al* 2000a, 2002, 2004; Simões *et al* 2007a). Por outro lado, o papel de factores aleatórios ou determinísticos durante o processo adaptativo foi abordado por vários autores, sem, no entanto, se registarem opiniões concordantes, nomeadamente no que refere ao papel da selecção, da história das populações e da deriva durante o processo evolutivo.

Travisano e colaboradores (1995), num estudo com organismos assexuados (*Escherichia coli*), estudaram as diferentes contribuições da adaptação, história e deriva em diferentes características relacionadas directa e indirectamente com a *fitness*. Neste trabalho, os autores testaram a *fitness* e o tamanho das células após 1000 gerações em dois novos ambientes, novo meio nutricional e nova temperatura, testando-os contra a população ancestral no seu meio

ambiente. Os resultados obtidos apontam para um papel preponderante da selecção forte em características directamente relacionadas com a *fitness* e um papel importante da história populacional nas características indirectamente relacionadas com a *fitness*.

Por outro lado, Teotónio e Rose (2000) fizeram um estudo de reversão evolutiva em 5 regimes selectivos diferentes, em *Drosophila melanogaster*, de modo a testar a capacidade destes reverterem ao estado ancestral da população de onde eram provenientes. Para tal, colocaram-nas no ambiente ancestral durante 50 gerações e observaram a evolução de diferentes características, directa ou indirectamente relacionadas com a *fitness*, obtendo resultados diferentes tanto para populações, como para características. Apesar de serem observadas quatro tipos de trajectórias evolutivas diferentes (convergência ao estado ancestral; reversão rápida, seguida de stasis sem chegar ao estado ancestral; convergência lenta durante as 50 gerações sem chegar ao estado ancestral; e ausência de mudanças significativas durante as 50 gerações analisadas) é de sublinhar o papel preponderante da selecção na maior parte das características analisadas, embora a história populacional tenha um papel não negligenciável na dinâmica evolutiva.

Os resultados destes trabalhos apontam para a selecção como o principal factor durante a adaptação de populações a um novo ambiente, para factores que estejam directamente ligados à *fitness*. No entanto, o papel uniformizante da selecção foi questionado por Cohan e Hoffmann (1986) em trabalhos com *Drosophila melanogaster*. Estes investigadores fundaram populações a partir de 5 localidades diferentes e observaram que, após selecção para resistência ao etanol durante 24 gerações, houve um aumento das diferenças entre populações. Esta resposta divergente foi atribuída às diferenças entre locais de fundação. Nesse estudo foram, também, encontradas diferenças entre réplicas, nas características não directamente relacionadas com a *fitness*. Os autores atribuíram a maioria da heterogeneidade entre réplicas ao fenómeno de deriva genética, levando à fixação ou perda aleatória de alelos, quando as características não eram directamente seleccionadas durante a adaptação ao novo ambiente. Por outro lado, num estudo com *Drosophila serrata*, Magiafoglou e Hoffmann (2003) fundaram três populações a partir de três regiões geográficas diferentes, replicando-as e mantendo-as durante 20 gerações em laboratório, após as quais fizeram selecção diferencial para diferentes tipos de stress térmico, não observando diferenças significativas nas respostas das várias populações.

Uma vertente pouco explorada dos problemas nas fundações em laboratório é a do efeito da amostragem na dinâmica evolutiva. Duas amostras da mesma população podem diferir na

adaptação local após fundação num novo ambiente comum, sem que as diferenças derivem das populações naturais de origem. Assim, tornam-se necessários estudos que possam elucidar melhor se as diferenças de dinâmica evolutiva encontradas nas populações provenientes de diferentes locais podem ser explicadas por meros efeitos de amostragem ou se são originadas pela diferença geográfica, que deverá ter maiores efeitos.

Resultados contraditórios, como alguns dos apresentados acima, ou problemáticas pouco abordadas, como por exemplo a do efeito de amostragem, tornam necessários e prementes estudos do efeito de fundação no processo adaptativo de populações a um novo ambiente.

A linha de estudos de Matos e colaboradores tem como por objectivo a caracterização da adaptação ao laboratório de populações de *Drosophila subobscura*, desde o momento da sua fundação a partir de populações naturais. Em trabalhos anteriores, foram encontradas diferenças na resposta evolutiva de populações derivadas de diferentes fundações (Matos *et al.*, 2002, Simões *et al.*, 2007), com sugestão de diferenças de fundo genético das populações derivadas de diferentes anos (Matos *et al.*, 2002) assim como de diferentes locais (Arrábida *versus* Sintra, Simões *et al.*, 2007a). No entanto, como referido acima, pelo menos parte dessas diferenças poderão ter sido devidas a efeitos de amostragem na fundação das populações. Com o objectivo de discriminar estes diversos efeitos, num projecto iniciado mais recentemente, foram introduzidas quatro novas fundações envolvendo duas colheitas a partir de cada um dos dois locais estudados previamente (Sintra e Arrábida). A análise das eventuais diferenças na resposta evolutiva destas populações permitirá distinguir o efeito das diferenças geográficas dos efeitos de amostragem, durante a adaptação inicial ao ambiente de laboratório.

Os objectivos deste trabalho são então: 1) tentar discernir se existe repetibilidade do processo adaptativo, ou se a evolução é um processo contingente; 2) testar a existência de diferenças nas respostas evolutivas das populações devido a diferenças entre anos, locais e amostragem nas várias populações fundadas.

1.2 - Materiais e Métodos

Fundação das populações

As populações utilizadas neste estudo são provenientes de dois locais distintos, Adraga (perto de Sintra) e Arrábida, sendo que foram fundadas diversas populações em anos distintos (para detalhes da história da fundação das populações ver figura A). Em 1990 foram fundadas as populações B, a partir da população natural de Adraga, perto de Sintra (ver Matos *et al.*,

2000a). Em 1998, quando as populações B já estavam na geração 90, foi fundada a população NW, a partir da mesma população natural. Após duas gerações, as populações B e NW foram replicadas (ver procedimento mais à frente) em 5 populações réplicas: NB₁₋₅ e NW₁₋₅ (Matos *et al*, 2002). Em 2001 foram feitas duas recolhas síncronas, uma a partir da população natural de Sintra, designada por TW, e outra a partir da população natural da Arrábida, designada por AR. Após 2 gerações em laboratório, estas populações foram replicadas em 3 populações réplicas, designadas por AR₁₋₃ e TW₁₋₃ (Simões *et al*, 2007a). Em Abril de 2005 foram fundados mais quatro conjuntos de populações provenientes dos dois locais previamente amostrados. As populações FWA e FWB foram fundadas em dias consecutivos a partir da população de Sintra e as populações NARA e NARB, foram fundadas, também em dias consecutivos, a partir da população da Arrábida. O número de fêmeas fundadoras para estas populações foi de 70 para a FWA, 76 para a FWB, 60 para a NARA e 80 para a NARB. Após duas gerações em laboratório, estas populações foram replicadas em 3 populações réplica, designadas por FWA₁₋₃, FWB₁₋₃, NARA₁₋₃ e NARB₁₋₃. No momento da introdução das populações FWA, FWB, NARA e NARB, as populações NB₁₋₃, NW₁₋₅, TW₁₋₃ e AR₁₋₃, estavam nas gerações 181, 91, 45 e 45, respectivamente.

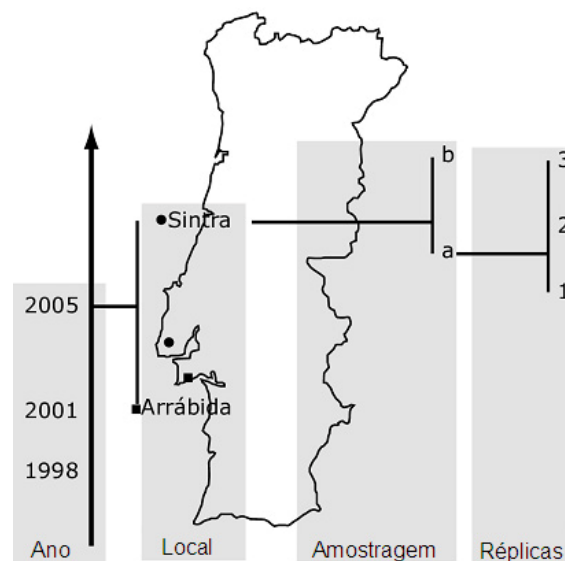


Figura 1.1 – Hierarquia das fundações utilizada neste estudo. Os níveis de hierarquia utilizados são os anos de fundação (1998, 2001 e 2005), local (Sintra e Arrábida), e amostragem (duas colheitas, A e B, feitas em cada local no ano de 2005). Todas as fundações são constituídas por três réplicas, exceptuando a fundação NW, que possui 5 réplicas.

A replicação das populações é, assim, sempre feita na segunda geração após introdução no laboratório (exceptuando a NB, em que a replicação foi feita na geração 92). Para tal, é

utilizada a postura de 24 horas de cada tubo de adultos das novas populações que é dividida equitativamente pelos tubos de cada réplica a formar. Para facilitar a exposição, uma vez que estes estudos são replicados, o termo ‘Regime’ passará a designar um conjunto de populações réplicas com a mesma origem (por exemplo: regime NW para designar as populações réplicas que foram fundadas em 1998 a partir da população natural de Sintra).

Assim as populações usadas no presente estudo são NB₁₋₃, NW₁₋₅, TW₁₋₃, FWA₁₋₃, FWB₁₋₃ provenientes de Sintra e AR₁₋₃, NARA₁₋₃, NARB₁₋₃ provenientes da Arrábida (mais detalhes ver fig. 1.1).

Manutenção das populações

A manutenção é padronizada para todas as populações: quando em fase adulta são mantidas com cerca de 1200 indivíduos, sendo o meio usado para manutenção utilizado desde a fundação da população NB (Matos *et al*, 2000a), e é composto por levedura de cerveja, farinha de milho, agar, nipagina e pó de carvão. As populações são mantidas, excepto durante o manuseamento, em incubadoras ajustadas a 18° C, com um fotoperíodo de 12 horas à luz:12 horas às escuras. Para o desenvolvimento, são colocados cerca de 70 ovos por tubo, com cerca de 3 ml de meio, mantendo assim um controlo de densidade desde o início do mesmo. Cada população é dividida pelas duas incubadoras, sendo colocados 12 tubos por grade em cada uma. O desenvolvimento leva entre 17 e 22 dias desde a recolha de ovos. Ao quarto ou quinto dia de emergência de adultos todas as moscas de cada população são cuidadosamente misturadas com ajuda de anestesia por CO₂, e colocadas em tubos, com cerca de 50 indivíduos por tubo. Os adultos são transferidos para um novo tubo, contendo meio fresco, dia sim, dia não, até ao dia da recolha de ovos para a geração seguinte. Para a recolha é utilizada a postura de 24 horas de cada população, que tem lugar quando as fêmeas estão entre os 6 e 11 dias de idade, sendo o tempo de geração de 28 dias.

Ensaio de características da história da vida adulta

As características utilizadas neste estudo foram: a idade da primeira reprodução (A1R), que corresponde ao número de dias até a fêmea colocar o primeiro ovo; a fecundidade precoce (F1-7), que corresponde ao número total de ovos postos por uma fêmea entre o primeiro e o sétimo dia; a fecundidade de pico (F8-12), que corresponde ao número total de ovos postos por uma fêmea entre o oitavo e décimo segundo dia; e a resistência dos machos (RM) e fêmeas (RF) à inanição, que corresponde ao número de horas de sobrevivência sem

alimento. Os ensaios incluídos neste estudo corresponderam às gerações 3 a 21 das populações FWA₁₋₃, FWB₁₋₃, NARA₁₋₃ e NARB₁₋₃, 3 a 20 das AR₁₋₃ e TW₁₋₃, 4 a 15 das NW₁₋₃. Os dados das populações NB₁₋₃ que foram utilizados correspondem aos dados obtidos sincronicamente em cada ensaio das outras populações.

Em cada ensaio é feita uma recolha de ovos extra, um dia ou dois antes ou depois da recolha de ovos para a manutenção das populações. Para cada população estudada é formada uma amostra de cerca de 15-18 casais com moscas que emergiram no próprio dia. A formação de pares (com uma fêmea e um macho) é feita com a ajuda de anestesia por CO₂. A disposição dos casais nas grades é feita em filas de 4-6 tubos pertencentes à mesma população (dependendo da amostra total de casais) colocados juntos em posições aleatórias em cada grade do bloco correspondente, de modo a evitar efeitos ambientais entre regimes que ocorressem sistematicamente devido a posições específicas na grade. A fecundidade diária é registada durante os primeiros 12 dias. Depois deste período os adultos são submetidos a um teste de resistência à inanição, através da transferência para um tubo com meio de agar, sendo verificada a mortalidade de 6 em 6 horas (esta característica é utilizada como um indicador de sobrevivência, uma vez que um ensaio de longevidade levaria vários meses). Em todos os ensaios, a posição das grades na incubadora é aleatorizada diariamente para evitar efeitos ambientais relacionados com a posição das grades nas incubadora.

Tratamento Estatístico

Para todas as análises efectuadas o regime usado como controlo foi o regime NB, uma vez que é aquele que está há mais gerações em laboratório permitindo analisar um maior número de fundações: NW, TW, AR, FW (A e B) e NAR (A e B). Assim, para todas as análises feitas foi utilizada a diferença entre os valores médios de cada réplica e o valor médio da réplica correspondente do controlo (por exemplo NW₁-NB₁).

Para testar o efeito da amostragem foi aplicado o seguinte modelo:

$$1) Y = \mu + F + S\{F\} + \text{Rep}\{S\{F\}\} + G + \text{Rep}\{S\{F\}\} * G + F * G + S\{F\} * G + \varepsilon$$

em que o factor fixo F representa a fundação (NAR e FW), o factor aleatório S representa a amostragem (A ou B) e está aninhado na fundação; o factor aleatório réplica (Rep) está aninhado na amostragem, e a geração G é o covariato. A existência de diferenças entre amostragens é dada pelo factor amostragem, e a existência de diferenças entre respostas evolutivas devido à amostragem é testada pelo termo de interacção amostragem*geração. Caso esta análise não apresente diferenças significativas, poderá ser feito o *pool* de dados de

FWA₁₋₃ e FWB₁₋₃ passando-se a designar por fundação FW (com 6 réplicas) e o *pool* de dados de NARA₁₋₃ e NARB₁₋₃, passando-se a designar por fundação NAR (com 6 réplicas).

Para testar o efeito da fundação foram aplicados os seguintes modelos:

$$2) Y = \mu + F + \text{Rep}\{F\} + G + \varepsilon$$

$$3) Y = \mu + F + G + F * G + \varepsilon$$

Em que o factor fixo F representa, novamente, a fundação (NW, TW, AR, FW e NAR), o factor aleatório réplica (Rep) está aninhado na fundação, e a geração (G) é o covariato. O modelo 2 foi utilizado para testar o efeito da fundação, e a diferença das respostas evolutivas das diferentes fundações é dada pelo termo de interacção fundação*geração do modelo 3. Adicionalmente, foram aplicadas regressões lineares utilizando as gerações iniciais de cada fundação de modo a obter o valor de diferenciação ao controlo.

Para testar o efeito do ano e local foi utilizado o seguinte modelo:

$$4) Y = \mu + A + L + \text{Rep}\{A * L\} + G + \text{Rep}\{A * L\} * G + A * G + L * G + A * L * G + \varepsilon$$

Em que o factor fixo A representa o ano (2001 e 2005), o factor fixo L representa o local (Sintra ou Arrábida), a geração G é o covariato e o factor aleatório Rep representa a réplica e está aninhado na interacção ano*local. A existência, ou não, de diferenças entre anos é dada através do factor ano, enquanto que diferenças entre locais de fundação é dada pelo factor local. Para saber se existem diferenças significativas nas respostas evolutivas das populações devido a diferentes anos de fundação ou locais, vê-se se os termos de interacção ano*geração e local*geração, respectivamente, são significativos. Para saber se as diferenças de resposta evolutiva entre locais variam entre anos vê-se a significância do termo de interacção local*ano*geração.

Uma versão mais simplificada do modelo acima descrito foi aplicada de modo a poder ser incluído na análise o ano 1998, assim foi, ainda, utilizado o modelo:

$$5) Y = \mu + A + L + \text{Rep}\{A * L\} + G + \text{Rep}\{A * L\} * G + A * G + L * G + \varepsilon$$

Em que o factor fixo A representa o ano (1998, 2001 e 2005), o factor fixo L representa o local (Sintra ou Arrábida), a geração G é o covariato e o factor aleatório Rep representa a réplica e está aninhado na interacção ano*local. A existência, ou não, de diferenças entre anos é dada através do factor ano, enquanto que diferenças entre locais de fundação é dada pelo factor local. Para saber se existem diferenças nas respostas evolutivas das populações devido a diferentes anos ou locais de fundação, ver-se-à a significância dos termos de interacção ano*geração e local*geração, respectivamente.

Foi ainda efectuada uma análise utilizando a diferença dos dados individuais de cada casal à réplica controlo correspondente (sendo NB o controlo), em que foi considerado um fenótipo composto, utilizando as quatro características da história da vida das fêmeas: A1R, F1-7, F8-12 e RF das 23 réplicas, correspondentes aos regimes NW, TW, AR, FWA, FWB, NARA e NARB. Em cada réplica foi utilizada a geração ensaiada mais perto da introdução ao laboratório (denominada por início da selecção) e a última geração ensaiada (denominada por fim da selecção). Fez-se uma análise discriminante, criando-se uma combinação linear das quatro características que levaram à maior diferença entre o início e o fim da selecção. A partir dos coeficientes lineares das quatro características para as 23 réplicas em estudo, foi calculado o fenótipo composto e a sua distribuição. Foi ainda feita uma análise de ‘bootstrap’ neste fenótipo composto, permitindo a análise da variação destes dois parâmetros em vários níveis de hierarquia (dentro de cada réplica - nível do indivíduo, entre réplicas, entre regimes, entre locais e anos de amostragem), bem como testar o significado de diferenças entre fundações derivadas de diferentes locais ou anos (para mais detalhes ver Simões *et al* 2007c).

1.3 - Resultados

O teste à existência de efeitos de amostragem revelou que não houve diferenças nas respostas evolutivas devido à amostragem (termo de interacção amostragem*geração não significativo, $p > 0.1$, tabela 1.1), para nenhuma das características em estudo. Assim sendo, foi feito um *pool* de dados em que fundações FW e NAR passaram a ser compostas por 6 populações replicadas nas restantes análises.

Tabela 1.1 – Valores de ANOVA para testar a existência de efeito de amostragem. Nesta análise só são utilizados os dados correspondentes às fundações NAR e FW. São apresentados os valores de F significativos, tal como a sua significância.

| | A1R | F1-7 | F8-12 | RF | RM |
|------------------------------|---------|----------|-------|--------|--------|
| Fundação | ns | ns | ns | ns | ns |
| Amostragem{Fundação} | ns | ns | ns | ns | ns |
| Geração | 96.62** | 126.84** | ns | 12.09* | 8.86* |
| Geração*Amostragem{Fundação} | ns | ns | ns | ns | ns |
| Fundação*Geração | ns | ns | ns | ns | 10.08* |

ns $p > 0.10$; * $0.05 < p < 0.10$; ** $p < 0.05$.

Em todas as análises realizadas foi observado para a idade da primeira reprodução (A1R), um valor de p significativo do factor geração (tabela 1.2, 1.3 e 1.4) o que indica a ocorrência de alterações temporais significativas durante as gerações iniciais de adaptação ao

laboratório. A magnitude destas alterações é variável nas diferentes fundações, mas todas elas foram no sentido da redução da A1R (fig. 1.2a e 1.3a).

Tabela 1.2 – Valores ANCOVA às diferenças entre fundações. Os dados são correspondentes às fundações NW (5 réplicas), TW e AR (3 réplicas por cada fundação), FW e NAR (6 réplicas por cada fundação). Valores de F para resultados significativos são apresentados, tal como a sua significância.

| | A1R | F1-7 | F8-12 | RF | RM |
|----------|---------|---------|--------|--------|--------|
| Fundação | 10.09** | 3.68** | 6.18** | 3.18** | 3.02** |
| Geração | 63.13** | 49.37** | 5.13** | ns | ns |

ns $p > 0.10$; * $0.05 < p < 0.10$; ** $p < 0.05$.

Tabela 1.3 – Valores de testes ANCOVA às diferenças entre o local de fundação e o ano, correspondentes aos anos 2001 e 2005. Os valores de F para resultados significativos são apresentados, assim como o nível de significância. .

| | A1R | F1-7 | F8-12 | RF | RM |
|-------------------|---------|---------|-------|---------|-------|
| Ano | ns | ns | ns | 11.89** | ns |
| Local | ns | ns | ns | ns | ns |
| Geração | 52.01** | 79.01** | ns | 6.45** | ns |
| Local*Geração | ns | ns | ns | ns | 3.78* |
| Ano*Geração | ns | 3.87* | ns | ns | ns |
| Ano*Local*Geração | ns | ns | ns | ns | ns |

ns $p > 0.10$; * $0.05 < p < 0.10$; ** $p < 0.05$

Tabela 1.4 – Valores de teste ANCOVA às diferenças entre o local de fundação e o ano, correspondentes a todos os anos em que foram feitas fundações (1998, 2001 e 2005). Valores de F para resultados significativos são apresentados, tal como a sua significância.

| | A1R | F1-7 | F8-12 | RF | RM |
|---------------|---------|---------|-------|---------|--------|
| Ano | 5.04** | ns | ns | 12.45** | 3.42** |
| Local | ns | ns | ns | ns | ns |
| Geração | 29.28** | 45.27** | 3.98* | ns | ns |
| Local*Geração | ns | ns | ns | ns | 6.55** |
| Ano*Geração | ns | ns | ns | 7.23** | ns |

ns $p > 0.10$; * $0.05 < p < 0.10$; ** $p < 0.05$.

Os regimes NW e NARB apresentam a menor taxa evolutiva (fig. 1.2a) e a menor diferenciação inicial (tabela 1.5), enquanto que os regimes FWB e TW apresentam a maior taxa evolutiva (fig. 1.2a) e também a maior diferenciação inicial (tabela 1.5). Verifica-se ainda que os regimes provenientes da Arrábida apresentam um declive muito semelhante entre si, e que isto acontece também com os regimes provenientes de Sintra, excepto a população NW (fig 1.2a), o que pode indicar a existência de efeito de local de amostragem.

Nas análises feitas para testar a existência dos efeitos dos factores ano e local verificou-se que, usando dados dos anos 2001 e 2005, não existia nenhum factor significativo (tabela 1.3), mas quando se juntava o ano 1998, o factor ano passou a ser significativo (tabela 1.4).

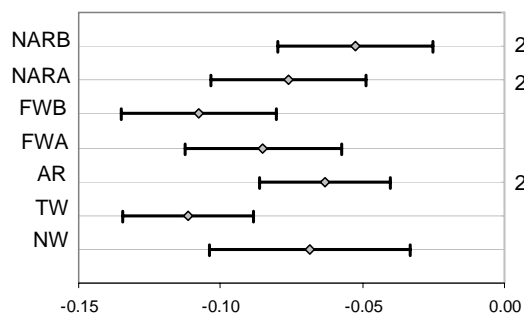


Figura 1.2a

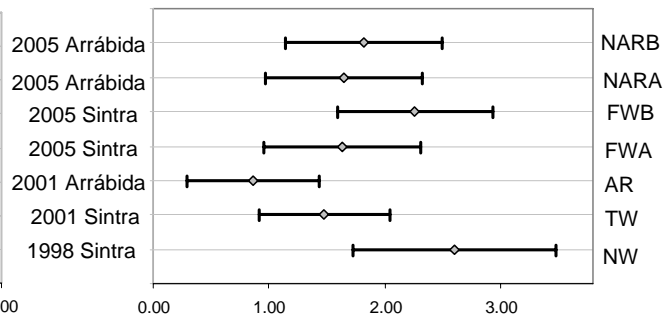


Figura 1.2b

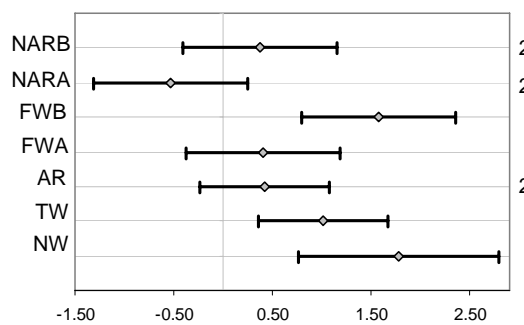


Figura 1.2c

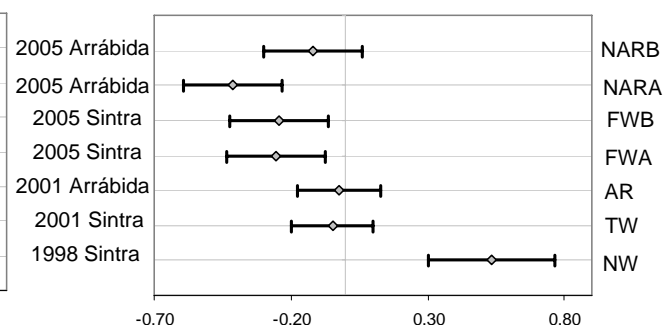


Figura 1.2d

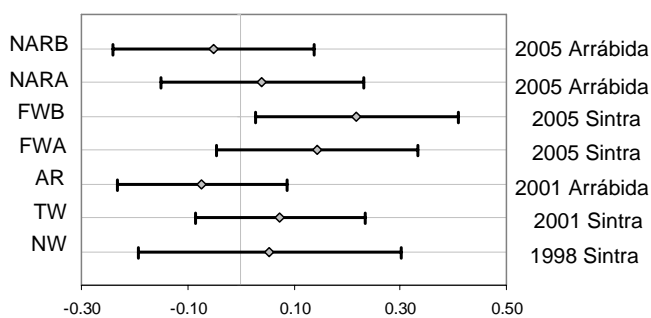


Figura 1.2e

Figura 1.2 – Variação da resposta evolutiva (declive) das diferentes fundações. Os dados utilizados correspondem às diferenças médias de cada regime ao controlo. a) idade da primeira reprodução (AIR); b) fecundidade de 1 a 7 (F1-7); c) fecundidade de 8 a 12 (F8-12); d) resistência das fêmeas à inanição (RF); e) resistência dos machos à inanição (RM). O erro apresentado corresponde à heterogeneidade de declives entre réplicas.

Tabela 1.5 – Valores de diferenciação inicial de cada fundação ao controlo. Estes valores foram obtidos através da aplicação de uma regressão linear simples aos dados das gerações iniciais de cada regime.

| | A1R | F1-7 | F8-12 | RF | RM |
|------|----------|------------|------------|-----------|-----------|
| NW | 1.1879** | -71.2438** | -62.7467** | -7.4584** | -6.3957** |
| TW | 2.4489** | -80.3647** | -40.4160** | -1.0875 | -1.1876 |
| AR | 2.1494** | -77.7121** | -44.0292** | -1.0781 | -1.2268 |
| FWA | 2.0847** | -82.2610** | -45.9570** | 4.3833* | 0.0278 |
| FWB | 2.5533** | -98.4691** | -74.7642** | 3.3883 | -2.8433 |
| NARA | 1.9801** | -85.9949** | -47.0674** | 5.8233** | -0.9339 |
| NARB | 1.7132** | -82.2147** | -49.0016** | 4.4105** | 2.0237 |

ns $p > 0.10$; * $0.05 < p < 0.10$; ** $p < 0.05$.

Para a fecundidade precoce (F1-7) foram observadas diferenças significativas para o factor geração nas várias análises (tabelas 1.2, 1.3 e 1.4). Isto indica uma alteração significativa desta característica ao longo da adaptação do laboratório. Verificaram-se ainda diferenças taxas evolutivas para alguns regimes (fig. 1.3b), nomeadamente o regime AR, que apresenta o menor declive (fig. 1.2b). O regime NW é o que apresenta maior taxa evolutiva (fig. 1.2b), mas menor diferenciação inicial (tabela 1.5). Por sua vez, o regime FWB é o que apresenta maior diferenciação inicial (tabela 1.5). Observa-se, ainda, que os regimes fundados em 2005 apresentam um declive maior do que os fundados em 2001 (fig 1.2b). No teste à existência de diferenças entre os anos e locais de fundação verificou-se que entre 2001 e 2005, há uma resposta evolutiva diferente (tabela 1.3 e fig. 1.2b). No entanto, ao introduzir-se o ano 1998 na análise, esta resposta deixa de ser significativa (tabela 1.4).

Nas análises feitas com os dados da fecundidade de pico (F8-12) observaram-se diferenças significativas para o factor geração ao ser incluído o ano 1998 (tabelas 1.2 e 1.4). No entanto, utilizando apenas os anos 2001 e 2005 não houve diferenças significativas para nenhum factor (tabela 1.3). Ao contrário do que acontece nas características A1R e F1-7, para F8-12 o regime NARA apresenta uma trajectória evolutiva com um sentido diferente do apresentado pelos restantes regimes, diminuindo o valor de F8-12 (fig. 1.3c), embora este declive não seja significativo (fig. 1.2c). Os regimes FWB e NW são os que apresentam maior diferenciação inicial (tabela 1.5) e taxa evolutiva para esta característica (fig. 1.2c).

No teste à alteração temporal na resistência das fêmeas observaram-se diferenças significativas na análise com os anos 2001 e 2005 (tabela 1.3). Observaram-se, também, valores médios significativamente diferentes entre fundações (tabela 1.2) e entre diferentes anos (factor ano significativo nas tabelas 1.3 e 1.4), e a variação da resposta evolutiva varia entre o ano 1998 e os anos 2001 e 2005 (termo de interacção ano*geração significativo na

tabela 1.4). Pode ainda ser observada uma heterogeneidade de respostas evolutivas para as diferentes fundações (fig. 1.3d). A fundação NW é a única que apresenta uma diferenciação inicial significativa ao controlo (tabela 1.5) e uma taxa evolutiva positiva (fig. 1.2d), sugerindo uma melhoria desta característica. No entanto para os regimes FWA, FWB e NARA observa-se um claro declínio, diminuindo os valores para além do controlo, enquanto que os regimes AR, TW e NARB apresentam uma dinâmica não significativa (fig. 1.3d).

Na análise da resistência à inanição dos machos observaram-se diferenças nas respostas evolutivas entre os locais Sintra e Arrábida (termo de interacção local*geração nas tabelas 1.3 e 1.4) e diferenças entre valores médios para esta característica entre o ano 1998 e os restantes (factor ano significativo na tabela 1.4). À semelhança da resistência das fêmeas pode também ser observada uma heterogeneidade de respostas evolutivas para as diferentes fundações (fig. 1.3e), e uma diferenciação inicial significativa para o regime NW (tabela 1.5). As fundações com maior declive foram as FWA e FWB (fig. 1.2e) embora não sejam significativas (FWA: $p=0.56$; FWB: $p=0.15$). Ao invés da resistência das fêmeas, a dos machos não apresenta nenhuma taxa evolutiva significativa, embora existam alguns regimes que apresentem uma ligeira sugestão de melhoria nesta característica, nomeadamente FWA, FWB e TW (fig. 1.3e).

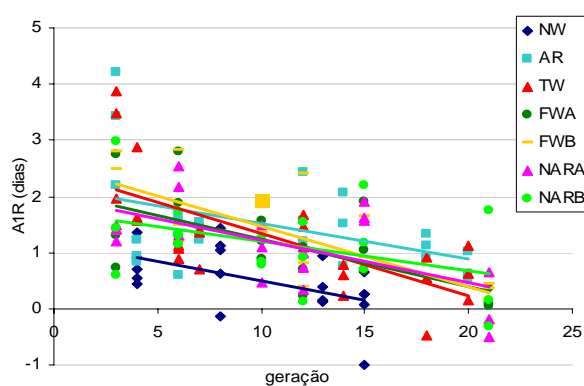


Figura 1.3a

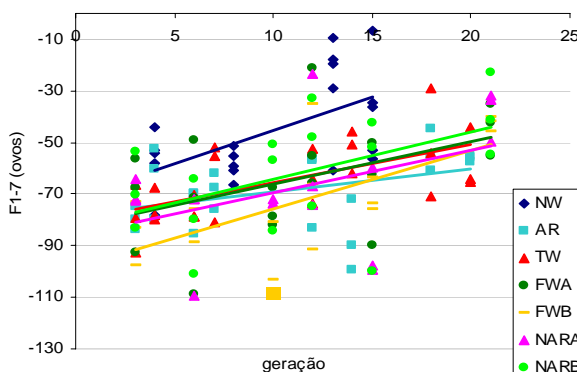


Figura 1.3b

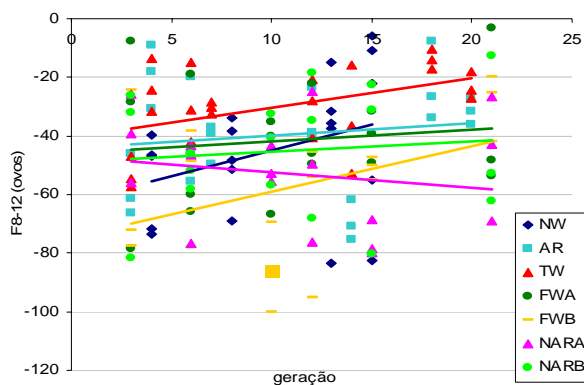


Figura 1.3c

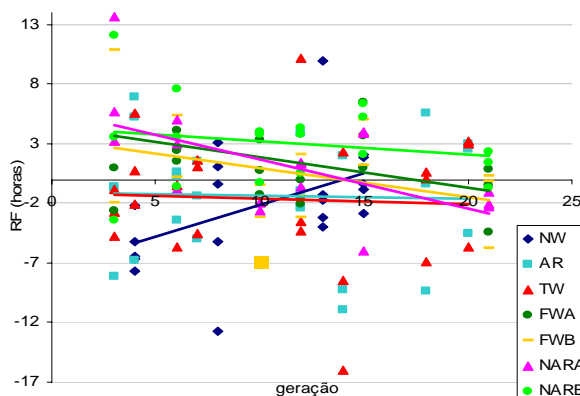


Figura 1.3d

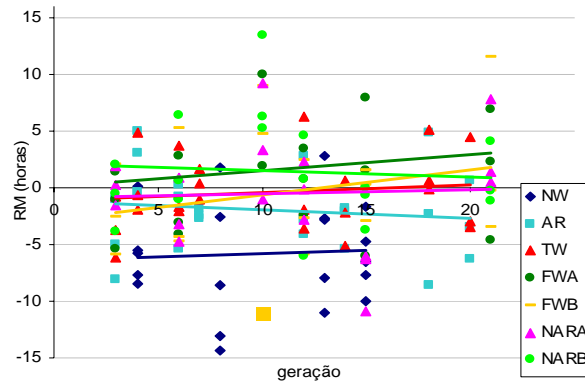


Figura 1.3e

Figura 1.3 – Resposta evolutiva durante as gerações iniciais de todas as fundações. Os dados utilizados correspondem à diferença dos valores médios entre cada réplica e a réplica controlo correspondente, em cada geração. a) idade da primeira reprodução (A1R); b) fecundidade de 1 a 7 (F1-7); c) fecundidade de 8 a 12 (F8-12); d) resistência das fêmeas à inanição (RF) e) resistência dos machos à inanição (RM).

Para a resistência à inanição de machos e fêmeas, foi analisada com mais detalhe a heterogeneidade das réplicas de cada fundação, uma vez que isto pode ter contribuído para um baixo poder estatístico na análise dos padrões temporais nestas características. Com efeito, a heterogeneidade entre réplicas é observada em todas as fundações, em pelo menos uma das características. Para a resistência à inanição das fêmeas, observa-se uma grande heterogeneidade entre réplicas do regime NW, AR, FWA, FWB e NARB, em que as taxas evolutivas das réplicas NW_1 , NW_4 , NW_5 , AR_1 , AR_2 , FWA_2 , FWB_1 , $NARB_1$ e $NARB_2$ são positivas, contrastando com as restantes réplicas dos regimes correspondentes. Por outro lado, os regimes TW e NARA não apresentam uma heterogeneidade tão contrastante, observando-se apenas variações na magnitude do declive das rectas de regressão das réplicas. Para a resistência dos machos, todos os regimes, exceptuando o FWB, apresentam diferenças no sinal da taxa evolutiva entre réplicas. Nas réplicas NW_1 , NW_2 , NW_3 , NW_5 , TW_1 , TW_2 , AR_1 , AR_2 , FWA_1 , FWA_2 , $NARA_1$, $NARA_2$ e $NARB_1$ observam-se taxas evolutivas positivas, enquanto que as restantes réplicas dos regimes apresentam respostas evolutivas negativas. No regime FWB, as réplicas FWB_1 e FWB_2 apresentam uma resposta positiva semelhante, e elevada, enquanto que a população FWB_3 , embora apresente um declive positivo, não apresenta uma resposta tão rápida como as outras réplicas.

Os resultados da análise do fenótipo composto demonstram uma clara diferença entre as gerações iniciais e as finais (fig. 1.4), o que sugere, juntamente com os resultados obtidos anteriormente, uma melhoria geral, tendo em conta o conjunto das características, durante a

adaptação ao laboratório. Os coeficientes lineares obtidos através da análise discriminante indicam que a idade da primeira reprodução e fecundidade precoce são as características que explicam a maioria da variação observada no intervalo de tempo analisado (coeficientes de discriminação linear para A1R: -0.409 e F1-7: 0.0214 vs F8-12: -0.00883 e RF: -0.000510).

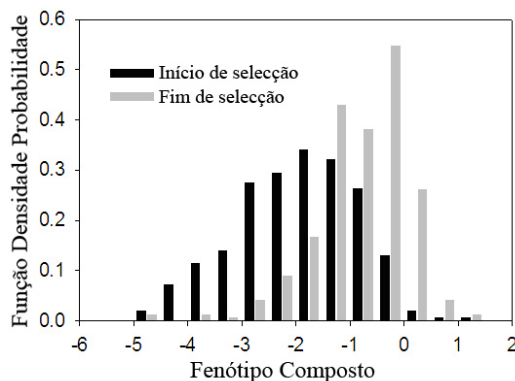


Figura 1.4 – Distribuição dos valores apresentados pelo fenótipo composto no início e no fim do período estudado. O fenótipo composto foi definido a partir das quatro características da fêmea, para o conjunto das populações réplica.

Os resultados obtidos através da análise da distribuição da variação da resposta evolutiva do fenótipo composto por ‘bootstrap’ indica que a maior parte da variação é observada ao nível dos indivíduos e das réplicas (fig. 1.5, esquerda), não havendo um aumento significativo da variância nos níveis hierárquicos acima (amostragem, local e ano). Para a diferenciação inicial verifica-se que, embora exista um aumento da variação do nível dos indivíduos para réplicas, existe, também, um aumento da variação em níveis hierárquicos acima da réplica (fig. 1.5, direita), sobretudo a nível de amostragem e de ano, sugerindo a existência de efeitos de amostragem e de ano de fundação, nas diferenças iniciais do fenótipo composto.

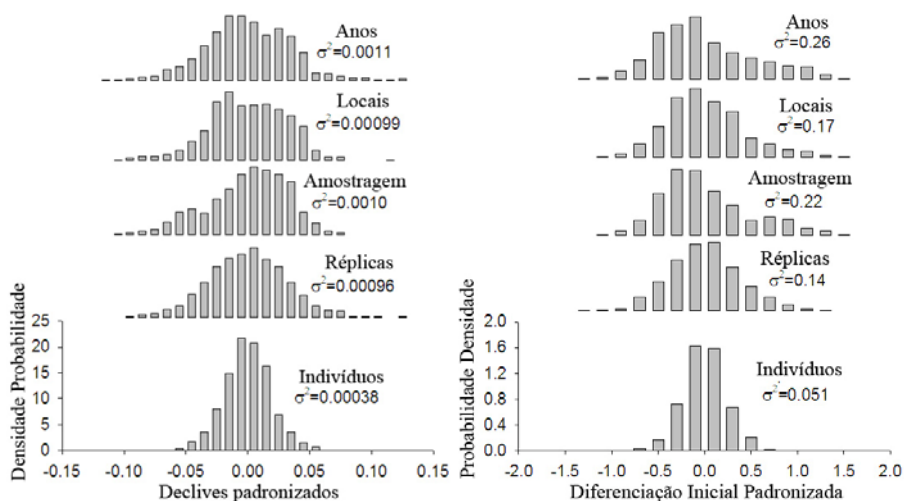


Figura 1.5 – Distribuição da variação associada ao fenótipo composto dos declives (esquerda) e diferenciação inicial (direita). Os níveis apresentados correspondem ao

indivíduo, réplica, amostragem, local e ano de fundação. Os dados utilizados envolveram dados individuais de todas as 23 réplicas ensaiadas, dos 5 regimes (NW, TW, AR, FW e NAR), com dois locais de fundação (Arrábida e Sintra) e três anos de colheitas (anos 1998, 2001 e 2005).

1.4 - Discussão

Diferenças entre populações: efeito de ano, local ou amostragem?

A análise feita por Simões *et al* (2007a) às trajectórias evolutivas dos regimes NW, AR e TW, revelou que a taxa evolutiva dos regimes NW e TW não diferia entre si, mas ambas diferiam da taxa evolutiva do regime AR. Isto sugere a existência de diferenças entre respostas evolutivas, devido a efeitos de fundação, a partir de populações naturais de locais diferentes. Apesar das diferenças encontradas na resposta evolutiva, as três fundações apresentam resultados na adaptação ao laboratório muito semelhantes (aproximação ao controlo das características relacionadas como a fecundidade), sugerindo que a selecção natural em laboratório poderá ser suficientemente forte para diminuir as diferenças causadas pelos efeitos de fundação. Este papel fulcral da selecção natural foi também obtido por diversos autores em trabalhos em *E. coli* (e.g. Travisano *et al*, 1995), em *Comamonas acidovorans* (Korona *et al*, 1994, Korona, 1996), em *Drosophila melanogaster* (e.g. Teotónio & Rose, 2000) e em *Drosophila subobscura* (Matos *et al*, 2002; Simões *et al*, 2007a).

Os resultados obtidos nas várias análises deste estudo corroboram os resultados obtidos anteriormente por diversos autores (Matos *et al*, 2002; Schmidt *et al*, 2005; Simões *et al*, 2007a), sugerindo que as várias características, dos diversos regimes, poderão ter diferentes taxas evolutivas devido a efeitos de local e/ou ano de amostragem. As diferentes taxas evolutivas não implicam, porém, a ausência de um aumento geral de desempenho de todos os regimes (dada pela diminuição da diferença ao controlo) nas características directamente relacionadas com a *fitness*. Assim, embora as respostas evolutivas variem entre fundações, todas elas apresentam uma trajectória inicial no sentido da diminuição da idade da primeira reprodução e aumento da fecundidade precoce e de pico (exceptuando o regime NARA, que apresenta uma resposta evolutiva negativa, pouco acentuada, para a fecundidade de pico). Para as características indirectamente relacionadas com a *fitness*, como a resistência à inanição, não existe um padrão geral comum a todos os regimes, havendo diferentes taxas evolutivas entre regimes distintos, não sendo claro se existe uma convergência para o controlo na maior parte das fundações. Já em Matos *et al* (2004) estas características não apresentavam um padrão evolutivo claro, sendo uma das causas apontadas, a complexidade da determinação

genética desta característica, a qual torna necessário um maior número de gerações para se poder determinar qual o padrão evolutivo para a resistência à inanição dos adultos.

A análise feita para a resposta evolutiva e diferenciação inicial ao controlo utilizando o fenótipo composto das características das fêmeas aponta para que diferenças observadas nas respostas evolutivas dos vários regimes sejam, na sua maioria, explicadas pela heterogeneidade entre réplicas. Por outro lado, na diferenciação inicial ao controlo existe uma grande parte da variação explicada pelos diferentes anos de amostragem, o que poderá indicar que regimes fundados nos vários anos, possuem diferentes níveis nas características estudadas, que poderão ser, ou não, próximas das apresentadas pelo controlo.

Ao longo deste trabalho verificou-se que não existia um consenso no que respeita às razões para explicar as diferenças observadas nas respostas evolutivas das diferentes populações para as características relacionadas com a fecundidade. Embora exista a sugestão de que o ano de amostragem poderá ser o factor com maior influência na resposta evolutiva das diferentes fundações para a fecundidade precoce, tanto para a idade da primeira reprodução como para a fecundidade de pico não existe nenhum factor apontado como principal, embora para esta última característica o regime NW se apresente destacado de todos os outros, uma vez que apresenta a maior taxa de resposta evolutiva.

A existência de efeitos de fundação a diferentes níveis de amostragem das populações (por exemplo: geográficos ou temporais), quando se quer estudar o processo de adaptação a um novo ambiente, quer haja ou não selecção directa, é uma questão que está longe de ter uma resposta definitiva. Pelo contrário, estudos neste sentido poderão elucidar-nos sobre a variação do ‘fundo’ genético das populações naturais de onde são recolhidas as populações em anos diferentes, ou que se apresentam afastadas a nível geográfico (Simões *et al*, 2007c).

Contingências evolutivas na adaptação ao laboratório

A repetibilidade dos processos evolutivos é um tema algo controverso no panorama da biologia evolutiva actual, existindo evidências da ocorrência de algumas imprevisibilidades no processo adaptativo a um novo ambiente (Cohan & Hoffmann, 1986, 1989; Trivisono *et al*, 1995; Teotónio & Rose, 2000; Prasad & Joshi, 2003).

Já foram observadas contingências durante a adaptação a um novo ambiente em vários estudos, nomeadamente por Korona (1996), que fez experiências com *Comamonas acidovorans*. Este autor observou um aumento do nível médio de *fitness* num novo ambiente (medida pela taxa de crescimento), devido ao aparecimento de várias mutações, que levavam

a diferenças em características como a resistência à inanição e tamanho das células. Num trabalho em *Drosophila melanogaster*, Joshi e colaboradores (2003) estudaram o impacto da deriva, história (selecção anterior e ancestralidade) e selecção na taxa de alimentação larvar (directamente relacionada com a *fitness*) e na altura a que era feita a empupação (não directamente ligada). Os resultados obtidos neste trabalho são consistentes com os obtidos por Teotónio e Rose (2000) e Teotónio *et al* (2002) sugerindo que constrangimentos históricos em mudanças adaptativas, ao nível microevolutivo, em populações sexuadas são derivados dos efeitos da selecção feita anteriormente, reflectindo-se na interacção genótipo-ambiente. Isto sugere que, para características não directamente relacionadas com a *fitness*, pode haver efeitos da história e do acaso na adaptação ao novo ambiente.

Em consonância com os trabalhos apresentados acima, os resultados obtidos neste trabalho apontam para a existência de convergência em características relacionadas com a fecundidade durante a adaptação ao laboratório, independentemente do local ou ano de fundação. Esta adaptação é caracterizada por um aumento da fecundidade ao longo das gerações, e por uma concomitante diminuição da diferença em relação às populações controlo. No entanto, mesmo para estas características, foi possível observar diferenças entre taxas evolutivas devido ao ano ou local da fundação e que não são explicáveis por mero efeito de amostragem, hipótese que não se pôde descartar anteriormente (Simões *et al*, 2007a).

Nas características relacionadas com a resistência à inanição, só foi encontrado um padrão de convergência inicial para a fundação NW, correspondente a um pior desempenho inicial seguido por uma melhoria significativa nas gerações seguintes. As restantes populações não apresentaram uma dinâmica evolutiva significativa no período inicial de adaptação. Esta ausência de resposta contrasta com um padrão significativo observado em estudos com mais gerações, em particular a fundação de Sintra em 2001 para a resistência das fêmeas (ver Simões *et al*, 2007a).

Devido aos resultados observado na resistência à inanição, foi feita uma análise à heterogeneidade das réplicas, onde se observou uma resposta, predominantemente, heterogénea entre réplicas. Como apontado anteriormente, esta heterogeneidade pode dever-se, maioritariamente, ao padrão complexo da dinâmica selectiva que afecta directamente as características. No entanto, como defendido por Cohan e Hoffman (1986, 1989), Travisano e colaboradores (1995) e MacLean e Bell (2003), esta heterogeneidade poderá também ser devida a um relaxamento selectivo, levando a alterações evolutivas por deriva genética (Cohan & Hoffman, 1986, 1989; MacLean & Bell, 2003; Travisano *et al*, 1995), e

acumulação de mutações (Travisano *et al*, 1995; MacLean & Bell, 2003), devido à selecção indirecta desta característica. Hoffmann e colaboradores (2001) apresentam, ainda, a hipótese de que o padrão complexo das resistências poderá ser devido a respostas correlacionadas com diferentes factores. Ao contrário do sucedido em estudos anteriores, não foram encontradas correlações positivas entre a resistência à inanição e o conteúdo lípidico (Chippindale *et al*, 1996; Harshmann *et al*, 1999), sendo apontadas como possíveis razões: a variação entre linhas ser devido não só a efeitos de deriva, mas também a diferenças ambientais; efeitos de inbreeding; predisposição do ambiente laboratorial, devido à abundância de alimento, para que o aumento no conteúdo lípidico seja a forma preferencial de resistência à inanição; ou instabilidade durante a adaptação a um novo ambiente.

No caso da resistência à inanição, nomeadamente, das fêmeas, a característica que, intuitivamente, seria de esperar que mais influenciasse esta característica seria a fecundidade, uma vez que era de esperar que o custo energético de pôr os ovos, limitasse o tempo que a fêmea aguentaria sem restaurar a sua reserva energética. No entanto, este *trade-off* fisiológico não foi observado em nenhum dos trabalhos anteriores (Matos *et al*, 2000a, 2002, 2004; Simões *et al*, 2007a), o que poderá dever-se não só à correlação indirecta destas duas características, como também ao facto de que só ser esperado observar um *trade-off* quando as populações estão em equilíbrio evolutivo, tornando plausível, numa fase inicial de adaptação ao laboratório, um aumento de resistência à inanição, seguido, de modo a haver convergência para o controlo, de uma diminuição nos valores de resistência (Matos *et al*, 2002). Uma análise com um maior número de gerações permitir-nos-ia testar se o comportamento diferencial das réplicas se iria manter ao longo da adaptação ao laboratório e verificar a existência de alterações na correlação entre a resistência à inanição e a fecundidade, embora com as reservas necessárias a estas inferências, dada a complexidade da dinâmica evolutiva (e.g. envolvendo selecção paralela versus correlacionada entre características).

No conto geral, este trabalho demonstra a existência de contingências evolutivas na adaptação ao laboratório, diferindo dos acima citados por conferir uma dimensão geográfica e temporal ao estudo da repetibilidade dos processos adaptativos. Mas, acima de tudo, este estudo apresenta uma marca indelével de que, apesar das diferenças nas taxas evolutivas, todas as populações presentes no laboratório estão, mais ou menos acentuadamente, a convergir para um mesmo ponto, enfatizando o papel preponderante da selecção natural na adaptação a um novo ambiente.

2. Método Comparativo vs Evolução em Tempo Real

2.1 - Introdução

A adaptação a um novo ambiente, ou a novos desafios postos num mesmo ambiente, é um dos temas fulcrais da biologia evolutiva, uma vez que é este processo que permite às espécies sobreviverem ao longo do tempo às mudanças constantes no ambiente que as rodeia (Futuyma, 1998).

A evolução experimental apresenta-se como a área da Biologia Evolutiva por excelência para efectuar estudos deste processo adaptativo uma vez que permite uma caracterização microevolutiva das mudanças que ocorrem quando populações são introduzidas num novo ambiente (Chippindale, 2006, Simões *et al*, 2007b). Para além disto, permite também caracterizar a repetibilidade e consistência de respostas evolutivas durante o processo de adaptação, o que poderá dar uma ideia do nível de importância de factores como, efeitos fundadores e de amostragem, tornando-se uma ferramenta essencial no estudo da evolução (Fuller *et al*, 2005).

Existem, essencialmente, dois tipos de estudos para monitorizar a história evolutiva de populações: o estudo em ambientes naturais e o estudo em populações em ambientes controlados pelo Homem. Os estudos em ambientes naturais são difíceis de realizar, devido às dificuldades em controlar os diferentes factores, de modo a isolar as causas das variações nas características em estudo. Um dos exemplos mais conhecidos destes tipos de estudos é o de Reznick e colaboradores (Reznick *et al*, 2005) em que utiliza as diversas populações naturais de *Poeticia reticulata* (que podem ser utilizadas como réplicas), para estudar a variação de diversas características da história da vida com o tipo de predação sofrido pelos guppies. Estudos de adaptação em ambientes controlados pelo Homem, com ou sem selecção artificial, envolvem a introdução de amostras de populações naturais num ambiente com características determinadas pelos investigadores, de modo a estudar diversas problemáticas (Rose & Lauder, 1996; Prasad & Joshi, 2003; Chippindale, 2006; Simões *et al*, 2007b).

Um dos principais alvos da crítica aos estudos da adaptação ao ambiente é o facto de estes não poderem ser aplicados às populações naturais, uma vez que o ambiente laboratorial possui características próprias que não estão presentes na natureza e vice-versa (Sgrò & Partridge, 2000; Harshman & Hoffmann, 2000, mas ver Matos & Avelar, 2001; Prasad & Joshi, 2003; Fuller *et al*, 2005 e Simões *et al*, 2007b para uma opinião contrária). Segundo Matos e colaboradores (2000b, 2001), o ambiente de laboratório é apenas “mais um

ambiente” para o qual se está a testar as diferentes histórias adaptativas de populações, e caracterizar as suas potencialidades evolutivas, destas estando a extrapolação para populações naturais, fora do âmbito deste tipo de experiências.

Dentro do laboratório existem duas abordagens principais. Uma é o estudo de selecção, em que as populações são confrontadas com um novo ambiente ao qual têm de se adaptar (por exemplo Rose *et al* 1996, Lenski *et al*, 1991; ver Chippindale, 2006 para uma revisão). Neste tipo de estudos há alguma controvérsia no que respeita o número de gerações em laboratório a que devem ser sujeitas as populações, antes de se começar a fazer selecção para as características em estudo (ver Harshman & Hoffmann, 2000). A outra abordagem, muito menos representada na literatura, é o estudo de convergências de populações a um novo ambiente, em que se colocam populações diferenciadas (Teotónio & Rose, 2000, Teotónio *et al*, 2001) ou recém introduzidas (Matos *et al* 2000a, 2002, 2004, Simões *et al* 2007) num novo ambiente e depois se caracteriza a adaptação destas ao nível de características relacionadas com a *fitness*.

Uma das questões mais controversas dentro destes estudos e que tem gerado uma série de dúvidas quanto à validade de resultados experimentais obtidos é o método utilizado para estudar a variação das características ao longo do processo adaptativo. Existem duas metodologias distintas que poderão ser utilizadas quando se quer estudar a adaptação de populações a um mesmo ambiente: o método comparativo e as trajectórias evolutivas.

No método comparativo são utilizadas populações, vindas do mesmo local, mas fundadas em anos diferentes e assume-se que estas terão a mesma resposta evolutiva, uma vez que são provenientes do mesmo local e estão a ser sujeitas ao mesmo ambiente. Assim são feitos ensaios síncronos com todas as populações assumindo-se que populações mais recentes representam estados anteriores das populações há mais tempo em laboratório, e traça-se a dinâmica evolutiva com os dados desse ensaio (para exemplos ver Sgrò & Partridge, 2000; Gilligan & Frankham, 2003; Hoffmann *et al*, 2001; Griffiths *et al*, 2005). No entanto este método assume à partida que não irão existir efeitos estocásticos na população natural entre fundações, que possam levar a uma mudança no fundo genético e fazer com que as populações tenham respostas evolutivas diferentes, e que uma população exposta a um mesmo ambiente irá responder sempre da mesma forma a esse mesmo ambiente. Esta abordagem, também não assume efeitos fundadores na população que representa o estado inicial, os quais, que só por si, afectariam as inferências (devido a diferenciação inicial variável entre fundações).

No estudo de trajectórias evolutivas é caracterizada a evolução em tempo real de uma população, isto é caracterização de a dinâmica evolutiva de uma população ao longo do tempo, normalmente com referência a um controlo (ou seja, uma população já adaptada ao laboratório), sendo utilizados dados de ensaios periódicos a características relevantes para a *fitness* (para exemplos ver Matos *et al*, 2000a, 2002, 2004; Simões *et al* 2007a). O maior problema deste método é o tempo necessário e a morosidade do processo, mas tem como vantagem o facto de se observar a trajectória real duma dada população.

Matos e colaboradores (2004) fizeram uma comparação entre o método da evolução em tempo real e o método comparativo para estudar a dinâmica evolutiva de populações introduzidas no laboratório, para algumas das quais se conheciam os padrões evolutivos durante a adaptação ao laboratório. Nesse trabalho os autores encontraram fortes semelhanças entre os resultados obtidos pelos dois métodos para características relacionadas com a fecundidade (idade da primeira reprodução, fecundidade precoce e fecundidade de pico) e nenhuma semelhanças entre os resultados obtidos para a resistência à inanição. Esta discrepância de resultados foi atribuída ao facto das características relacionadas com a fecundidade terem trajectórias evolutivas robustas, ou seja, resultados semelhantes foram obtidos em vários trabalhos, ao longo de vários anos, enquanto que a resistência à inanição apresenta um padrão complexo de evolução, não totalmente previsível mesmo utilizando trajectórias evolutivas.

No presente estudo, comparativamente ao de Matos *et al* (2004), são adicionados dados de mais duas fundações independentes, provenientes do mesmo local (Sintra), assim como dados de mais 69 gerações à trajectória evolutiva das populações sobre as quais é feita a análise da evolução em tempo real (populações NW) Os objectivos deste estudo são 1) estudar o impacto de um maior número de fundações na capacidade preditiva de dinâmicas evolutivas aplicando o método comparativo, 2) estudar a existência de convergência da população NW ao controlo (população NB), agora com mais de 100 gerações em laboratório e por fim 3) comparar os dados obtidos por Matos e colaboradores (2004), testando a robustez dos resultados obtidos pelo método comparativo nesse trabalho com os deste.

2.2 - Materiais e Métodos

Fundação e manutenção das populações

Neste estudo são apenas utilizadas as populações provenientes de colheitas na Adraga (perto de Sintra). Quando as populações NB₁₋₃ (1990), NW₁₋₃ (1998), TW₁₋₃ (2001), FWA₁₋₃

(2005) estavam nas gerações 201, 111, 65 e 20, respectivamente, foi feita uma nova fundação a partir da população de Sintra, em finais de Outubro e princípios de Novembro de 2006. Foram utilizadas 58 fêmeas capturadas para fundar a população CW, que após duas gerações em laboratório, foi replicada em 3 populações réplica, designadas, CW_{1-3} . Uma vez que estes estudos são replicados, o termo ‘Regime’ passa então a designar um conjunto de populações réplicas com a mesma origem (por exemplo: regime TW para designar as populações réplicas que foram fundadas em 2001 a partir da população natural de Sintra). Assim as populações utilizadas neste estudo são: NB_{1-3} , NW_{1-3} , TW_{1-3} , FWA_{1-3} e CW_{1-3} (ver fig A).

A manutenção das populações é a descrita no capítulo 1.

Ensaio de características da história da vida adulta

Os ensaios realizados incluíram os regimes de Sintra NB (gerações 205 e 208), NW (gerações 115 e 118), TW (gerações 69 e 72), FWA (gerações 24 e 27) e CW (gerações 4 e 7).

A metodologia utilizada é a mesma que está descrita no capítulo 1.

Tratamento Estatístico

Todas as análises de dados foram feitas utilizando o software *Excel* e *Statistica 7.0*.

Com o intuito de testar a capacidade de previsão de dinâmicas evolutivas utilizando o método comparativo, foram realizados gráficos com os dados das populações presentes no ensaio da geração 4 da CW. Para contrapor foram traçadas as trajectórias evolutivas para o regime NW, para cada uma das características da história da vida, utilizando a diferença dos dados de NW ao controlo, neste caso NB, da geração 3 à 115. Por uma questão de coerência entre modelos, não foi utilizado o regime NB no método comparativo, mantendo constante o número de gerações analisado em cada modelo.

Para testar a convergência foram feitas regressões lineares utilizando, para as trajectórias evolutivas, como variável independente a geração e como dependente a diferença entre os valores médios de cada réplica e a réplica de controlo correspondente (e.g. $NW_1 - NB_1$); para o método comparativo foram utilizados como variável dependente os valores médios absolutos de cada réplica e como independente o número de gerações. Para ver qual dos modelos de regressão era o mais adequado foram calculados os valores de p para os modelos de regressão: linear, log linear e polinomial, sendo considerado o mais adequado o que obtivesse o valor de p mais baixo, a não ser que $p > 0.1$, onde não era escolhido nenhum modelo (no caso de os valores de p serem iguais era escolhido o com maior coeficiente de ajustamento).

Para testar se os modelos obtidos em cada tipo de estudo eram semelhantes aplicou-se uma ANCOVA segundo o modelo:

$$Y = \mu + M + G + M * G + \varepsilon$$

com o factor modelo (M), com duas categorias: trajectórias evolutivas e método comparativo, a geração (G) como covariato, e o termo de interacção M*G, que indica se existem diferenças nos declives dos dois modelos.

2.3 - Resultados

Trajectórias Evolutivas de NW-NB

Nas trajectórias evolutivas traçadas para as características idade da primeira reprodução, A1R (fig. 2.1a, esquerda); fecundidade precoce, F1-7 (fig. 2.1b, esquerda) e fecundidade de pico, F8-12 (fig. 2.1c, esquerda), é possível observar um claro padrão de convergência, traduzido pela aproximação da trajectória evolutiva ao eixo das abcissas, o que reflecte a diminuição da diferença entre o regime NW e o controlo. Por outro lado para a resistência dos machos à inanição (RM) não se observa o padrão de convergência ao controlo, uma vez que o regime NW cruzou o eixo das abcissas, o que indica que ultrapassou o regime NB (fig. 2.1e, esquerda). Isto sugere que esta característica poderá ter uma trajectória bifásica, hipótese que só será possível testar com um maior número de gerações. Para estas quatro características o modelo com menor valor de p, ou seja, o que melhor traduz a dinâmica das características é o de logaritmo neperiano (tabela 2.1).

A característica resistência das fêmeas à inanição (RF) não apresenta nenhum padrão claro nem de convergência, nem de divergência (fig. 2.1d, esquerda), não sendo possível traçar uma trajectória com um bom ajustamento, não havendo nenhum modelo testado, com os dados totais, que tivesse um valor de p significativo ($p > 0.1$, tabela 2.1).

Como se pode ver pela tabela 2.1, existe alguma heterogeneidade no tipo de modelos que melhor se adequa à trajectória evolutiva de cada réplica. No entanto, de um modo geral o tipo de modelo que foi considerado adequado para os regimes é concordante com a maioria das réplicas. A excepção é a característica RF, que não apresenta nenhum modelo de regressão ajustado à variação dos dados totais, mas com a adição de mais três gerações, a trajectória evolutiva da população NW₂ apresenta um bom ajustamento polinomial. Isto tanto pode indicar que, com o aumento de gerações em laboratório esta característica poderá ter este padrão evolutivo, como pode indicar que a réplica NW₂ está a ter uma trajectória evolutiva diferente das outras réplicas.

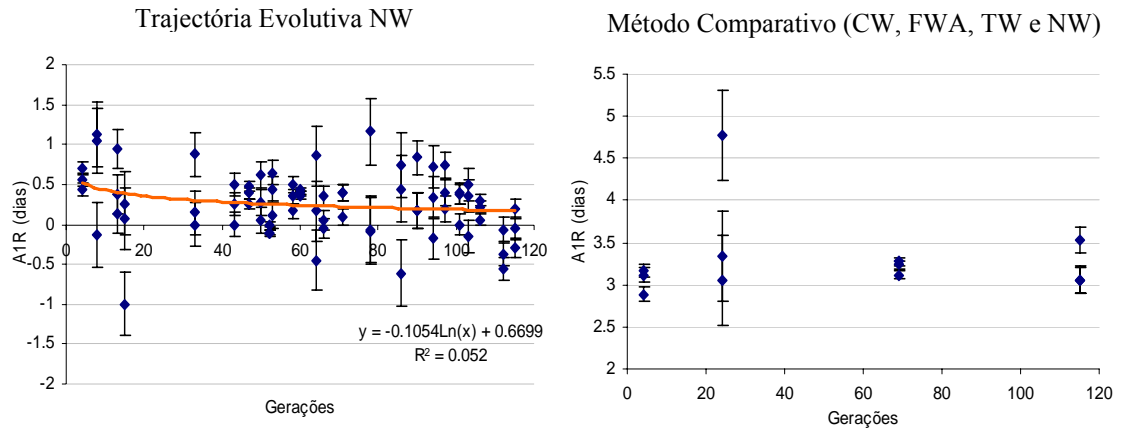


Figura 2.1a

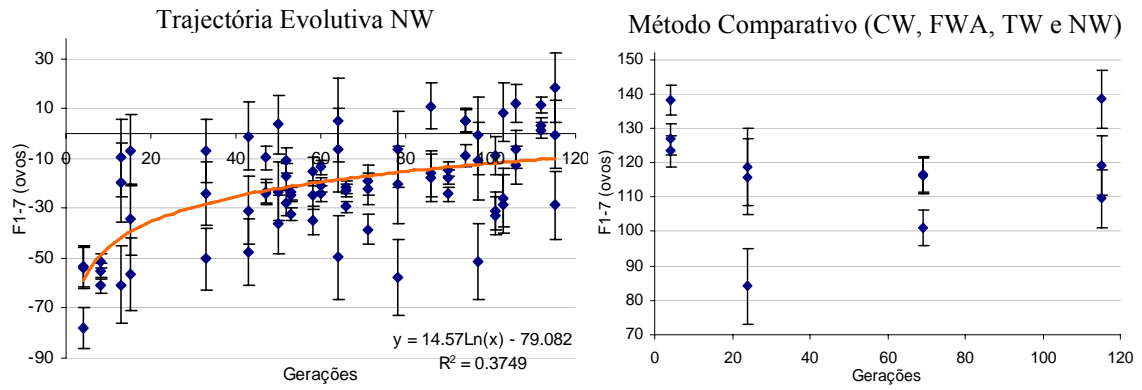


Figura 2.1b

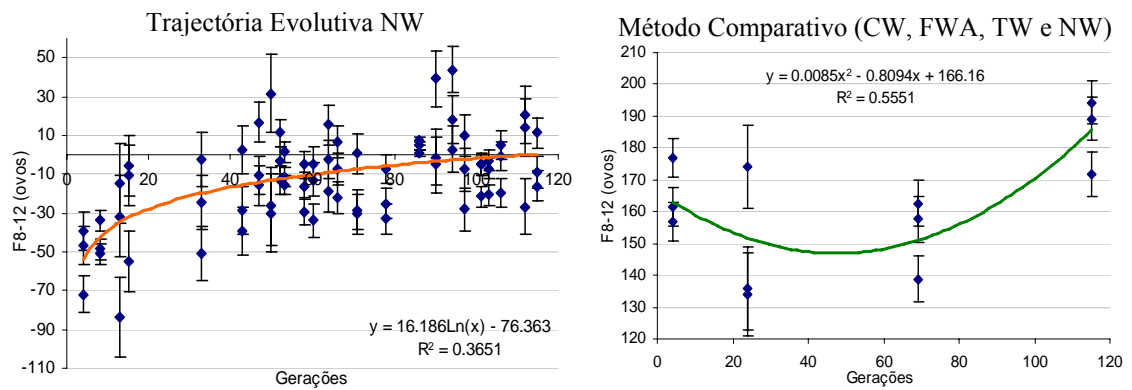


Figura 2.1c

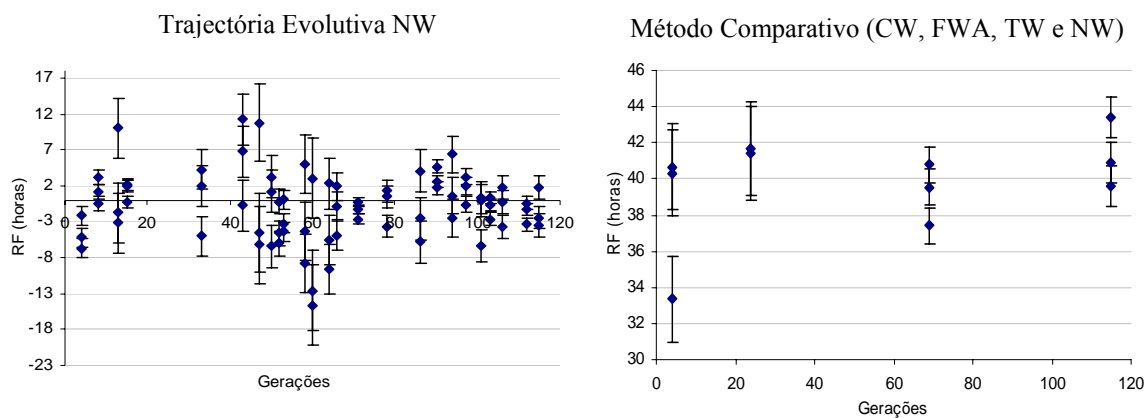


Figura 2.1d

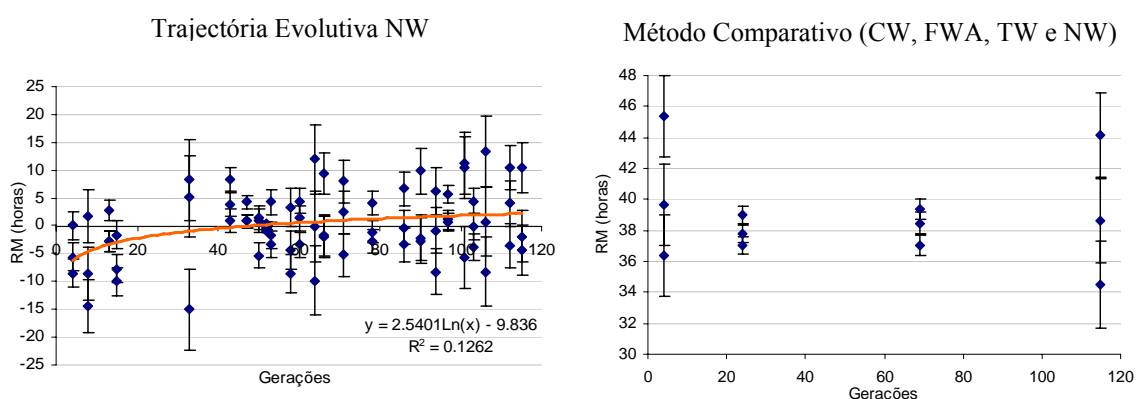


Figura 2.1e

Figura 2.1 – Trajectórias Evolutivas para o regime NW (à esquerda) vs Método Comparativo (à direita) utilizando os regimes CW, FWA, TW e NW. Nas Trajectórias são utilizados dados correspondentes às diferenças entre os valores médios de cada réplica ao controlo e para o Método Comparativo (à direita) valores médios das réplicas das populações CW, FWA, TW e NW. As barras de erro apresentadas correspondem à heterogeneidade das diferenças das réplicas com igual índice, para as trajectórias evolutivas (NW₁-NB₁ por exemplo) e à heterogeneidade dos valores absolutos das populações replicadas, para o método comparativo. A trajectória evolutiva entre a geração 3 à 115 corresponde às populações NW. Para o método comparativo foram utilizadas as gerações 4 da CW, 24 da FWA, 69 da TW e 115 da NW. As características representadas são a) idade da primeira reprodução (A1R); b) fecundidade precoce (F1-7); c) fecundidade de pico (F8-12); d) resistência das fêmeas à inanição (RF); e) resistência dos machos à inanição.

Tabela 2.1 – Modelos de regressão obtidos utilizando Trajectórias Evolutivas e Método Comparativo. São utilizados os dados obtidos a partir do ensaio das duas gerações da CW (4 e 7) para as diferentes características da história da vida: idade da primeira reprodução (A1R), fecundidade precoce (F1-7), fecundidade de pico (F8-12), resistência dos machos à inanição (RM) e resistência das fêmeas à inanição (RF).

| | | G | A1R | F1-7 | F8-12 | RF | RM |
|-------------------------|-----------|---|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Método Comparativo | replica 1 | 4 | ns | ns | ns | ns | ns |
| | replica 2 | 4 | ns | $y = -8.09\text{Ln}(x) + 148.16^{**}$ | ns | ns | ns |
| | replica 3 | 4 | ns | ns | ns | ns | $y = -1.94\text{Ln}(x) + 47.15^*$ |
| | total | 4 | ns | ns | $y = 0.009x^2 - 0.81x + 166.16^{**}$ | ns | ns |
| Método Comparativo | replica 1 | 7 | ns | ns | $y = 0.01x^2 - 1.47x + 192.12^*$ | ns | ns |
| | replica 2 | 7 | ns | ns | ns | ns | ns |
| | replica 3 | 7 | ns | ns | ns | ns | $y = -0.002x^2 + 0.09x + 40.67^*$ |
| | total | 7 | ns | ns | ns | ns | $y = -0.072x + 45.16^*$ |
| Trajectórias Evolutivas | replica 1 | 4 | $y = -0.22 \text{Ln}(x) + 1.16^{**}$ | $y = 13.50\text{Ln}(x) - 69.06^{**}$ | $y = 17.37\text{Ln}(x) - 78.06^{**}$ | ns | $y = 5.07\text{Ln}(x) - 14.95^{**}$ |
| | replica 2 | 4 | ns | $y = 0.516x - 52.07^{**}$ | $y = 14.17\text{Ln}(x) - 72.84^{**}$ | ns | $y = 0.08x - 7.18^{**}$ |
| | replica 3 | 4 | ns | $y = 11.59\text{Ln}(x) - 76.35^{**}$ | $y = 17.02\text{Ln}(x) - 78.19^{**}$ | ns | ns |
| | total | 4 | $y = -0.11\text{Ln}(x) + 0.67^{**}$ | $y = 14.57\text{Ln}(x) - 79.08^{**}$ | $y = 16.19\text{Ln}(x) - 76.36^{**}$ | ns | $y = 2.54\text{Ln}(x) - 9.84^{**}$ |
| Trajectórias Evolutivas | replica 1 | 7 | $y = -0.007x + 0.69^{**}$ | $y = 15.01\text{Ln}(x) - 73.69^{**}$ | $y = 20.87\text{Ln}(x) - 88.79^{**}$ | ns | $y = 4.99\text{Ln}(x) - 14.71^{**}$ |
| | replica 2 | 7 | ns | $y = 0.51x - 51.81^{**}$ | $y = 13.98\text{Ln}(x) - 72.27^{**}$ | $y = 0.001x^2 - 0.1229x + 0.2319^*$ | $y = 0.08x - 7.12^{**}$ |
| | replica 3 | 7 | ns | $y = 12.86\text{Ln}(x) - 80.24^{**}$ | $y = 15.83\text{Ln}(x) - 74.53^{**}$ | ns | ns |
| | total | 7 | $y = -0.003x + 0.46^{**}$ | $y = 15.62\text{Ln}(x) - 82.29^{**}$ | $y = 16.89\text{Ln}(x) - 78.53^{**}$ | ns | $y = 2.41\text{Ln}(x) - 9.45^{**}$ |

Os modelos apresentados correspondem aos com menor valor de p obtido a partir das regressões, sendo que quando $p > 0.1$ não foi considerado nenhum modelo. ns $p > 0.10$; * $0.05 < p < 0.10$; ** $p < 0.05$.

Método comparativo

Para este método foram feitas regressões lineares utilizando os conjuntos de dados com a geração 4 do regime CW (e gerações correspondentes: 24 da FWA, 69 da TW e 115 da NW) e com a geração 7 do regimes CW (e gerações correspondentes: 27 da FWA, 72 da TW e 118 da NW). De todas as características estudadas no ensaio correspondente à geração 4 do regime CW apenas a característica F8-12 apresenta um modelo que traduz a variação dos dados totais com um bom ajustamento (tabela 2.1). No entanto este modelo não sugere a existência de um percurso evolutivo linear, o que traduziria semelhança entre o padrão evolutivo dos diferentes regimes (fig. 2.1c, direita). No ensaio correspondente à geração 7 das populações CW₁₋₃, os dados totais da característica RM são explicados por uma regressão linear simples, o que poderá sugerir, se não uma trajectória evolutiva semelhante, pelo menos uma tendência para a diminuição desta característica ao longo dos vários regimes (declive negativo, tabela 2.1). Para as restantes características não se infere nenhum padrão evolutivo, nem de convergência, nem de divergência, como se pode ver pelos gráficos à direita nas figuras 2.1a, 2.1b, 2.1d e 2.1e.

Trajectórias Evolutivas vs Método Comparativo

Os resultados obtidos pela análise gráfica dos dois métodos e pela ausência de modelos que se ajustassem aos dados do método comparativo sugerem uma diferença entre as trajectórias evolutivas e inferências feitas analisando o percurso evolutivo dos vários regimes (método comparativo). Ao analisar os resultados do teste feito à homogeneidade de declives entre os dois métodos verifica-se que apenas para a característica F1-7 existem diferenças significativas no termo geração*modelo (tabela 2.2), o que indica que a trajectória traçada pelos dois métodos é diferente para esta característica. A significância apresentada para o factor modelos deve-se ao facto de que os dados apresentados para os dois modelos serem diferentes, uma vez que para as trajectórias evolutivas os dados são referentes à diferença de cada réplica ao controlo e no método comparativo os dados correspondem aos dados absolutos de cada réplica.

Tabela 2.2 – Resultados de testes ANCOVA às diferenças entre modelos obtidos pelo método comparativo *versus* trajectórias evolutivas. São apresentados os valores de F assim como a significância. Os dados correspondem ao valor da diferença $NW_i - NB_i$ (sendo $i = \{1, 2, 3\}$) de cada característica para as trajectórias evolutivas e o valor absoluto de cada réplica para cada característica para o método comparativo, como variáveis dependentes; o

tipo de análise como factor com duas categorias (trajectórias evolutivas e método comparativo) e a geração como covariato.

| | A1R | F1-7 | F8-12 | RF | RM |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Modelo | 187.554** | 346.668** | 349.130** | 285.544** | 215.443** |
| Geração | ns | 7.626** | 16.174** | ns | ns |
| Modelo*Geração | ns | 8.318** | ns | ns | ns |

ns $p > 0.10$; * $0.05 < p < 0.10$; ** $p < 0.05$.

2.4 - Discussão

Existe convergência?

Os resultados obtidos a partir das trajectórias evolutivas sugerem a existência de convergência das populações NW para as populações controlo, NB. Esta convergência é verificada na diminuição das diferenças entre os dois regimes à medida que o número de gerações das populações no laboratório aumenta. Matos e colaboradores (2004) fizeram esta mesma análise, embora utilizando menor número de gerações do regime NW, e obtiveram um padrão de convergência para as características A1R, F1-7 e F8-12 e parcialmente para a resistência dos machos. Ao estender-se o número de gerações analisadas foram reforçadas as ideias de que as populações NW estariam a convergir para as características já referidas anteriormente. Adicionalmente verificou-se que o padrão evolutivo da resistência dos machos não sugere convergência, mas sim um aumento desta característica, ultrapassando o controlo. Esta demonstração tardia deste padrão para esta característica poderá ser devida à complexidade da determinação desta característica (Matos *et al*, 2004), ou mesmo devido ao facto de não se relacionar directamente com a adaptação ao laboratório. Ao contrário dos resultados obtidos anteriormente para a resistência à inanição das fêmeas, não foi encontrado nenhum modelo capaz de descrever a dinâmica evolutiva da característica, o que também poderá derivar de padrões evolutivos complexos, ou de ausência geral de dinâmica evolutiva num período mais longo do estudo.

Será o método comparativo um bom descritor de dinâmicas evolutivas?

O método comparativo apoia-se no pressuposto de que populações inseridas no mesmo habitat provenientes do mesmo local irão sofrer as mesmas pressões e ter uma reacção semelhante, apresentando por isso um padrão igual de adaptação. Assim poder-se-á estudar a dinâmica evolutiva utilizando dados de populações há diferentes gerações no mesmo habitat e provenientes do mesmo local (Chippindale, 2006). Vários laboratórios utilizaram este mesmo método para estudar a dinâmica evolutiva de uma linha proveniente do mesmo local, com

populações fundadas com vários anos de diferença (e.g. Hercus & Hoffmann, 1999; Sgrò & Partridge, 2000; Kennington *et al*, 2001). Este pressuposto de que as populações irão ter igual dinâmica evolutiva devido ao facto de serem do mesmo local e estarem a sofrer as mesmas pressões ambientais, poderá ser gorada se as populações tiverem fundos genéticos diferentes. Diferenças na fundação terão efeitos na diferenciação inicial ao laboratório, seguidas ou não de alterações na dinâmica de adaptação (aspectos que poderão não ser independentes, uma vez que a taxa evolutiva das populações pode depender da diferenciação inicial destas).

Apesar de na generalidade se observarem melhorias numa ou mais características da história da vida, em estudos de adaptação ao ambiente controlado pelo Homem (Latter & Mulley, 1995; Hercus & Hoffmann, 2001; Gilligan & Frankham, 2003; Griffiths *et al*, 2005 *vs* Matos *et al*, 2000a, 2002, 2004; Simões *et al*, 2007a,b), existem disparidades entre autores, nomeadamente nos que usam o método comparativo (Latter & Mulley, 1995; Hercus & Hoffmann, 2001; Gilligan & Frankham, 2003; Griffiths *et al*, 2005) *vs* evolução em tempo real (Krebs *et al*, 2001; Matos *et al*, 2000a, 2002, 2004; Simões *et al*, 2007a,b). A falta de consistência entre estudos particularmente, na correlação entre a resistência à dessecação e/ou inanição com diversas características pode ser devida aos diferentes métodos de estudo do processo evolutivo entre autores (Matos *et al*, 2004, mas ver Harshmann & Hoffmann, 2000 para uma revisão das inconsistências e uma visão diferente do problema). No estudo feito por Matos e colaboradores em 2004, os resultados do método comparativo eram semelhantes aos obtidos com evolução em tempo real, para características relacionadas com a fecundidade, ou seja directamente relacionadas com a *fitness*. Para a resistência à inanição, isto já não foi observado, o que sugere que para características com padrões evolutivos complexos, ou que não estejam directamente relacionadas com a *fitness*, este método pode ser um mau preditor de trajectórias evolutivas.

Os resultados obtidos pelo método comparativo no nosso estudo, utilizando os dois conjuntos de dados, mostram que não existe um padrão evolutivo nas populações durante a adaptação ao laboratório, a não ser para a característica F8-12. Isto difere da informação obtida pela análise directa de trajectórias evolutivas, em que há uma clara dinâmica evolutiva loglinear para características de fecundidade. A disparidade entre esta análise e a feita por Matos *et al* (2004), em que foram obtidos resultados muito semelhantes entre os dois métodos para as características directamente relacionadas com a fecundidade, não era espectável. Nessa análise os autores propunham como explicação para a consistência dos dados comparativos o facto de as características relacionadas com a fecundidade demonstrarem um

padrão muito robusto em todas as análises (ver Matos *et al* 2002, 2004). Esta robustez já não era apresentada para características como a resistência à inanição que teriam um padrão evolutivo complexo. Na análise às diferenças entre as dinâmicas traçadas pelos dois métodos os resultados obtidos não foram os esperados, visto que a complexidade inerente desta característica sugere a existência de diferenças nas duas aproximações. Isto porque para padrões mais complexos quanto maior for o número de descritores (neste caso será o número de dados ao longo do tempo) melhor será a capacidade de predição do percurso adaptativo da característica. Devido à robustez apresentada pela característica F1-7 não eram de esperar as diferenças encontradas entre as duas aproximações. A explicação mais plausível será a de diferenças entre fundações, que poderão ter conduzido ao aparecimento de diferenças inesperadas em características relacionadas com a fecundidade.

Uma explicação possível para esta disparidade de resultados será o facto de as populações utilizadas para estudar a dinâmica evolutiva nesta análise, não serem as usadas na análise feita em 2004, sendo as diferenças entre as fundações seriam responsáveis pela diversidade de resultados obtidos. Simões e colaboradores (2007b) fizeram esta análise com este mesmo procedimento utilizando os dados das gerações 3 da FWA, 48 da TW, 94 da NW e 184 da NB. Nesta análise os resultados obtidos foram semelhantes aos descritos em Matos *et al.* (2004), sendo que nas trajectórias evolutivas das características ligadas à fecundidade se observava um padrão de convergência, o que não se observava nas resistências.

Isto indica que a fundação CW poderá ser a causa da disparidade de resultados entre as duas análises, levando a que não se possa traçar um padrão evolutivo, para as populações da Adraga presentes no laboratório, utilizando o método comparativo quando se inclui esta nova fundação. De facto, ao contrário do observado nas restantes fundações introduzidas no laboratório, as populações CW caracterizam-se por inicialmente apresentarem valores de idade da primeira reprodução e fecundidade precoce e de pico muito semelhantes, ou mesmo superiores às do controlo. Esta discrepância de valores nas gerações iniciais pode ser a responsável pela falta de um modelo adequado, resultando nas diferenças observadas entre este estudo e os anteriores (Matos *et al.*, 2004; Simões *et al.*, 2007b)

O problema aqui apresentado apenas reforça o cuidado a ter com a leitura dos resultados obtidos através do método comparativo pois, embora neste caso, em particular, se consiga identificar a razão pela qual a dinâmica traçada não é a correspondente às trajectórias evolutivas, outros casos haverá em que não é utilizado nenhum método adicional ao comparativo e poderá levar a falsas identificações de dinâmicas evolutivas ou falta delas.

3. Diferenciação Inicial na Adaptação ao Laboratório

3.1 - Introdução

A diferenciação inicial de populações corresponde ao estado inicial de adaptação a um novo ambiente e pode ser definida como uma comparação de diferenças quantitativas em parâmetros relacionados com a *fitness* em populações recém-introduzidas com populações já adaptadas. Esta diferenciação inicial tem um grande impacto na trajetória evolutiva das populações, uma vez que poderá ter uma influência directa na sua taxa de resposta evolutiva (Matos *et al*, 2000a, 2002, 2004; Simões *et al*, 2007b).

A diferenciação pode ser medida através de diversos parâmetros, sendo, normalmente, utilizadas as características da história da vida, devido à sua relação directa com a *fitness*. As características directamente seleccionadas num regime natural são aquelas que têm efeito directa ou indirectamente na *fitness*, pelo que a resposta selectiva da população está dependente destas características e a taxa evolutiva da população poderá ser calculada pela taxa evolutiva da *fitness*, dependendo da intensidade da selecção e da sua variância genética aditiva. Assim é interessante estudar características como a fecundidade, que representam uma medida da adaptação ao ambiente, ou então características directamente envolvidas na sobrevivência do indivíduo, como por exemplo resistência à inanição, dessecação, temperaturas extremas, componentes tóxicos do meio (Service *et al*, 1985; Chippindale *et al*, 1996, 1997; Chippindale, 2006), etc. Como características com efeito indirecto na *fitness* temos por exemplo o tamanho dos indivíduos, que se pensa estar relacionado com a adaptação ao stress térmico (Santos *et al*, 1988; Sgrò & Partridge, 2000; Griffiths *et al*, 2005), ou então, apesar de não muito utilizado, o comportamento (Service, 1989, 1993; Sokolowsky *et al*, 1997; Morgan *et al*, 2003; Losos *et al*, 2004; Wilkinson *et al*, 2005).

No género *Drosophila* o comportamento de acasalamento está bem descrito e foi estudado devido ao facto de poder ser um modelo para estudar a arquitectura genética de características complexas (Moehring *et al*, 2004). Para o caso específico da *Drosophila subobscura* a descrição da corte foi feita por Steele (1986a). Quando um macho encontra uma fêmea, aproxima-se dela por um dos lados e coloca-se à frente dela (fase de orientação), dando pequenos toques na fêmea com as patas da frente, podendo também abanar ligeiramente as asas, ou rodar as patas do meio. A fêmea entra então na fase da “dança”, em que se desloca rapidamente de um lado para o outro, enquanto o macho tenta manter-se à sua frente. Quando a fêmea pára, ou a meio da fase da dança, o macho dispõe as asas em V

(chamado o *display* de asas). Após isto a fêmea poderá estender o proboscis para tocar no proboscis do macho (que poderá ou não conter uma gota de comida), e de seguida o macho movimenta-se rapidamente para a zona posterior da fêmea e inicia a cópula. Comportamentos de rejeição por parte da fêmea incluem voar para longe, fugir, extrusão do ovipositor ou dobrar o abdómen. Na *Drosophila subobscura* o estímulo visual é de extrema importância para a corte, por isso o comportamento de acasalamento está directamente relacionado com a luz, que serve como estimulante e sem a qual não há início de corte (Philip *et al*, 1944), embora haja estudos em que se observa a existência de cópula mesmo sem luz, mas apenas após selecção para esta característica (Pinsker & Doschek, 1980; Kleist, 1985). A maioria dos estudos comportamentais em *Drosophila* focam-se na determinação genética da corte e cópula (Kleist, 1985; Noor, 1997; Lawniczak & Begun, 2004; Moehring & Mackay, 2004; Markow & O'Grady, 2005) ou na correlação do comportamento com características sobre selecção directa (Service, 1989, 1993; Sokolowski *et al*, 1997; Sgrò *et al*, 2000) ou o seu papel no isolamento reprodutor (Korol *et al*, 2000; Kauer & Schlötterer, 2004).

O comportamento de fuga é uma outra característica comportamental que é de esperar que sofra alterações aquando da introdução das populações em laboratório, uma vez que, enquanto na natureza, indivíduos mais activos neste tipo de comportamento teriam mais vantagem na procura de recursos, na saída de adultos recém emergidos de frutos, etc. No entanto no laboratório este tipo de comportamento é fortemente contra-seleccionado por escaparem de tubos, ou caixas populacionais. Apesar de haver observações *ad libitum* deste tipo de comportamento, que se saiba ainda não foi feito nenhum estudo para o caracterizar durante o processo de adaptação ao laboratório.

Na literatura existem diversos estudos de características morfológicas que relacionam o aumento do tamanho do corpo do indivíduo adulto com a latitude (Santos *et al*, 1992, 2004; Gilchrist *et al*, 2001), ou que relacionam o aumento/diminuição do corpo com a selecção para resistência a diferentes tipos de stress (Hoffmann *et al*, 1999; Huey *et al*, 2000; Schiffer *et al*, 2004) ou ainda que relacionam o tamanho do corpo com a *fitness* (Hedge & Krishna, 1999). Os poucos estudos existentes que caracterizam o tamanho do adulto durante a adaptação ao cativeiro não indicam alterações evolutivas no tamanho deste (Hoffmann *et al*, 1999; Sgrò & Partridge, 2000, Griffiths *et al*, 2005, Chippindale, 2006).

Em estudos de adaptação ao laboratório, Matos e colaboradores (2002, 2004) têm vindo a estudar a evolução de populações com um número variado de gerações em laboratório, procurando caracterizar as taxas evolutivas de características como a idade da primeira

reprodução, fecundidade precoce, fecundidade de pico e resistência à inanição, em estudos envolvendo diversas fundações, diferindo quer no espaço quer no tempo (Matos *et al* 2000a, 2002, 2004; Simões *et al* 2007a).

Neste trabalho será analisada a diferenciação inicial, relativamente a populações já estabelecidas no laboratório, de uma nova fundação, CW, envolvendo quer as características da história da vida, que têm caracterizado os estudos anteriores da equipa, quer novas características, comportamentais e morfológicas. Os objectivos deste capítulo serão então o de caracterizar as diferenças existentes entre populações recém introduzidas no laboratório (CW) e 1) Populações já estabilizadas no laboratório (NW) ao nível de características comportamentais; 2) Populações já introduzidas há um número variável de gerações no laboratório, derivadas de diferentes fundações, ao nível de uma característica morfológica e ao nível da diferenciação inicial de várias características da história da vida.

3.2 - Materiais e Métodos

Fundação e manutenção das populações

Neste estudo são apenas utilizadas as populações provenientes de colheitas na Adraga (perto de Sintra). Para além dos regimes NB, NW, TW, FWA já presentes no laboratório, foi feita uma nova fundação a partir da população de Sintra, em finais de Outubro e princípios de Novembro de 2006. Foram utilizadas 58 fêmeas capturadas para fundar a população CW, que após duas gerações em laboratório, foi replicada em em 3 populações réplica, designadas CW₁₋₃. Assim as populações utilizadas são: NB₁₋₃, NW₁₋₃, TW₁₋₃, FWA₁₋₃ e CW₁₋₃.

A manutenção das populações é semelhante à descrita anteriormente no capítulo 1.

Ensaio de Comportamento de Fuga

Este ensaio envolveu os regimes NW, FWA e CW, nas gerações 114, 23 e 3, respectivamente. Para este ensaio recolheram-se 8 tubos extra com 70 a 80 ovos, utilizando o procedimento normal de manutenção de populações. Dois dias antes da emergência colocou-se a grade com os 8 tubos num garrafão de 10L transparente, cobrindo de seguida a parte cortada (correspondente ao fundo) com uma rede, para possibilitar a livre circulação do ar e minimizar as diferenças entre as populações de manutenção e as que estavam a ser ensaiadas. Colocaram-se, então, os garrafões na incubadora, sendo a sua posição relativa mudada todos os dias de modo a homogeneizar as condições entre populações. Após os primeiros 4 dias de emergências das moscas, os garrafões foram colocados no congelador, contando-se depois o

número de indivíduos e separando-se os sexos das moscas que estavam fora dos tubos. Da grade de cada população retiraram-se três tubos a partir dos quais se definiu o *sex-ratio* das emergências. Dos restantes tubos contou-se o número de indivíduos.

O objectivo deste ensaio foi quantificar o grau de diferenciação do comportamento de fuga em populações com um número variado de gerações em laboratório.

Ensaio de Características da História da Vida

O primeiro ensaio envolveu os regimes CW, FWA, TW, NW e NB que estavam nas gerações 4, 24, 69, 115 e 205, respectivamente. O segundo ensaio envolveu as gerações 7 da CW, 27 da FWA e NARA, 72 da TW e AR, 118 da NW e 208 da NB.

A metodologia destes ensaios é semelhante à já apresentada anteriormente, com a diferença de, adicionalmente, ter sido feito um estudo da fecundidade e resistência de casais heterogâmicos CW e NW. Casais homogâmicos consistem em casais da mesma população (por exemplo: ♀CWx♂CW) e casais heterogâmicos são constituídos por uma fêmea de uma população e um macho de outra, ambos com o mesmo número de réplica (por exemplo: ♀CW₁x♂NW₁). O objectivo destes ensaios é caracterizar as populações há diferentes gerações em laboratório em características relacionadas com a adaptação em laboratório. Com a adição do estudo de homogamia *versus* heterogamia pretende-se testar se existe influência do macho nos vários parâmetros da fecundidade da fêmea.

Ensaio de Comportamento de Acasalamento

Para todos os ensaios de comportamento foi feita uma recolha extra de 6 a 8 tubos com 70 a 80 ovos das populações a ensaiar e utilizou-se o procedimento habitual de manutenção de populações. No segundo ou terceiro dia de emergências foi feita a separação de indivíduos virgens de cada sexo utilizando o método de anestesia por CO₂ (a separação foi feita nas primeiras 6 horas após a emergência para garantir que os indivíduos eram virgens). No dia antes dos ensaios os indivíduos eram novamente separados, desta vez um adulto por tubo (com excepção do ensaio de re-acasalamento).

→ Ensaio de acasalamento de homogâmicos *versus* heterogâmicos

Foram feitos dois ensaios de acasalamento, nas gerações 4 e 6 das populações CW (115 e 117 de NW). Para cada ensaio foram utilizados adultos separados com 6 dias de idade e foram feitos casais homogâmicos (utilizando machos e fêmeas da mesma população) e casais

heterogâmicos (com machos e fêmeas de populações diferentes, por exemplo: fêmea NW_1 com macho CW_1 e vice versa). Para o primeiro ensaio foram feitos três blocos de oito séries (em cada bloco apenas eram observados casais da mesma réplica). Em cada série observaram-se oito casais que incluíam 2 casais homogâmicos NW e CW e dois casais heterogâmicos $NW \times CW$ e $CW \times NW$. Para o segundo ensaio foram feitos 3 blocos (em cada bloco observavam-se casais com a mesma réplica) com 5 séries, mantendo-se o número de casais por série. A observação foi dada por terminada quando todos os casais acabaram a cópula ou caso passassem duas horas de observação (excepto se a cópula excedeu o tempo máximo de observação, em cujo caso registou-se sempre o seu final).

→ Ensaio de competição

Neste ensaio foram utilizadas as populações CW e NW nas gerações 6 e 117, respectivamente. Os machos deste ensaio foram marcados com pós de modo a permitir a distinção quando em competição. Os pós utilizados foram das cores vermelha e azul (ex ref Hoechst Artengesellschaft, Rojo Hostasol GG-K type 8081) e metade dos machos da amostra de cada população foram pintados de azul e a outra metade de vermelho, para poder-se extrair o possível efeito que os pós tivessem sobre os machos e/ou as fêmeas. Foram feitos 3 blocos de observações, cada um com 5 séries e em cada série foi feita a observação de 4 tubos. Em cada tubo foi colocada uma fêmea (CW ou NW) e dois machos (um CW e outro NW), sendo que cada série envolveu dois tubos com fêmeas CW e dois tubos com fêmeas NW. Cada vez que se observou um acasalamento num tubo, mesmo que não houvesse corte pelo outro macho, deu-se por terminada a observação naquele tubo. As observações foram terminadas ou quando todos os casais acabassem de acasalar, ou caso passasse uma hora e meia de observação.

→ Ensaio de Re-acasalamento

Para este ensaio não foi efectuada a separação das fêmeas no dia anterior, mantendo-se os grupos de 4 fêmeas, e foram utilizadas as populações CW e NW nas gerações 6 e 117, respectivamente. Neste ensaio foram feitas 10 observações de cada população, em conjuntos de oito tubos distribuídos por 8 séries (em que a última série tinha apenas 4 tubos). Dentro da mesma série observaram-se populações com o mesmo número de réplica. A observação foi dada por terminada quando os machos em todos os tubos já tinham acasalado com as

quatro fêmeas (quatro cópulas), ou caso passassem duas horas de observação (mesmo que a cópula excedesse o tempo máximo de observação, registava-se sempre o seu final).

Estudos de morfologias

Para este estudo fez-se a medição de 30 indivíduos de cada sexo de todas as populações fundadas a partir de Sintra e presentes no laboratório, correspondendo à geração 4 da CW₁₋₃, G24₁₋₃ FWA, G69₁₋₃ TW, G115₁₋₃ NW e G205₁₋₃ NB. Como medida do tamanho foi utilizado o comprimento do tórax, tendo como pontos de referência o extremo anterior do mesonoto e o extremo posterior do escutelo (e.g. Ruiz *et al*, 1991). As medições foram efectuadas com microscópio estereoscópico utilizando uma escala arbitrária de 120 divisões aplicada na ocular. A ampliação da ocular utilizada era 10x e a da objectiva era 25x, ficando no total 250x.

Tratamentos estatísticos

Todas as análises de dados foram feitas utilizando o software *Excel* e *Statistica 7.0*.

→ Comportamento de fuga

A partir do número de adultos contado nos tubos dos vários regimes fez-se uma estimativa da média (\pm erro) do número de adultos por população. Foram feitos teste t para testar a existência de diferenças na densidade de indivíduos dentro dos tubos: entre cada réplica, utilizando a média do número de adultos em cada réplica do mesmo regime; e entre regimes, utilizando os valores médios de cada regime. Para testar diferenças entre o número de fugas foi feito um teste t utilizando a média do número de fugas em cada regime.

→ Acasalamentos Homogâmicos *versus* Heterogâmicos

Nestas análises foram utilizadas 5 características temporais (em segundos): A₁ – tempo desde o início do ensaio até ao começo da corte pelo macho; A₂ – tempo desde o início do ensaio até a fêmea aceitar o macho, ou seja até ao início da cópula; A₃ – tempo desde o início do ensaio até ao término da cópula; DCt – duração da corte; DCp – duração da cópula.

a) Para testar os efeitos dos diferentes regimes nos tempos obtidos foi utilizado o seguinte modelo:

$$Y = \mu + M + F + B + M * F + F * B + M * B + M * F * B + \epsilon$$

sendo M e F os factores fixos macho e fêmea, respectivamente, cada um com dois níveis (CW e NW) e B o factor aleatório bloco, com três níveis (1, 2 e 3). A existência de

influências do macho nos parâmetros obtidos será dada pelo factor M, e o da fêmea pelo F, a interacção entre os dois factores irá testar se existem efeitos significativos do regime a que pertence o macho sobre o desempenho da fêmea (ou vice-versa), ou seja, indica as diferenças entre casais homogâmicos e heterogâmicos.

Foi ainda feita uma ANCOVA com seguindo o modelo:

$$Y = \mu + M + B + G + M*G + M* B + M* B*G + \varepsilon$$

sendo R e B (regime do macho e bloco, respectivamente) as variáveis independentes; a geração (geração 4 e 7 das populações CW) o covariato, e as variáveis dependentes os diferentes parâmetros obtidos. Uma análise equivalente foi feita para o regime da fêmea. O parâmetro geração vai indicar se existem diferenças entre gerações para os vários parâmetros, e a interacção do covariato com o regime permite-nos saber se as diferenças entre os dois regimes variam entre gerações.

Foi, ainda, testada a diferença no número de cortes com e sem acasalamento utilizando a proporção de número de cortes com acasalamento sobre o número de cortes totais, para cada tipo de acasalamento (homogâmico vs heterogâmico). Para tal, foi efectuada uma transformação arcsen sobre os dados das proporções e foram efectuados testes t emparelhados.

b) Para testar a existência de diferenças nos tempos obtidos devido à direcção do cruzamento (NWxNW, NWxCW, CWxCW, CWxNW) foi utilizado o seguinte modelo de ANOVA:

1) ANOVA bifactorial mista, seguindo a expressão:

$$Y = \mu + C + B + C*B + \varepsilon$$

sendo a direcção do cruzamento, C, o factor fixo, com quatro níveis (N, C, CN, NC), e B o factor aleatório bloco, com três níveis (1, 2 e 3). A existência de diferenças significativas é dada pelo factor C e, caso este seja significativo, como existem 4 direcções diferentes, são feitas comparações entre cada par de cruzamentos, para ver quais são as que diferem.

Competição

Nas análises que se seguem utilizaram-se 3 características temporais (em segundos): T₁ – tempo desde o início do ensaio até ao início da primeira corte feita à fêmea; T₂ – tempo desde o início do ensaio até ao início da corte pelo macho que ainda não tinha cortejado; T₃ – tempo desde o início do ensaio até haver cópula por um dos machos. Adicionalmente

utilizaram-se ainda as características: C_1 – cor do primeiro macho que cortejou; C_2 – cor do segundo macho que cortejou; C_3 – cor do macho que copulou com a fêmea.

a) Inicialmente testou-se a existência do efeito da cor do macho na fêmea, no número de cortes e acasalamento. Para tal foram utilizadas porções do número de cortes com acasalamento/número total de cortes e foi aplicada a transformação arcsen. De seguida foi feito um teste t sobre os dados transformados, para cada um dos regimes. Para ver as diferenças entre os machos dos dois regimes foi feito um teste binomial ao regime CW, tendo como pressuposto a igualdade do número de cortes ou acasalamentos para cada tipo de fêmea, sendo testada também a existência de um desvio no número de acasalamento do macho de uma cor para as duas populações das fêmeas (exemplo: diferenças no número de acasalamentos do macho azul CW com a fêmea CW e depois com a fêmea NW).

b) Foi também testado o efeito da cor nos tempos da corte e do acasalamento, tanto nos machos como nas fêmeas, para tal foram utilizadas as seguintes ANOVAs:

1) ANOVA trifactorial mista, seguindo a expressão:

$$Y = \mu + M + C + B + M * C + M * B + M * C * B + \varepsilon$$

sendo M o factor fixo macho (com dois níveis CW e NW), C o factor fixo cor (com dois níveis: azul e vermelho) e B o factor aleatório bloco, com três níveis (1, 2 e 3). A existência de diferenças entre os regimes foi dada pelo parâmetro M, enquanto que para a influência da cor do macho nos tempos foi utilizado a interação macho*cor. Este mesmo modelo foi utilizado para testar a influência do regime das fêmeas nos parâmetros obtidos, substituindo o factor M na expressão por F.

Depois de testar a influência do factor cor foi então utilizado o seguinte modelo ANOVA:

2) ANOVA trifactorial mista, seguindo a expressão:

$$Y = \mu + M + F + B + M * F + M * F * B + \varepsilon$$

sendo M e F os factores fixos macho e fêmea, respectivamente, com dois níveis (CW e NW), e B o factor aleatório bloco, com três níveis (1, 2 e 3). Tal como anteriormente, a existência de diferenças entre regimes foi dada pelos factores M, para machos, e F, para fêmeas. Por outro lado, o termo de interação macho*fêmea indica a existência, ou não, de efeitos significativos do regime do macho sobre a fêmea e vice-versa (diferenças entre casais homogâmicos e heterogâmicos). Foi utilizado método descrito em Sokal e Rohlf, (Sokal & Rohlf, 1981) para fazer o *pool* de dados, para retirar o factor cor do modelo de ANOVA.

Re-acasalamento

Nas análises que se seguem utilizaram-se 2 características temporais (em segundos): D_n – duração do acasalamento n ; $T_{(n,n+1)}$ – tempo entre o acasalamento n e o acasalamento $n+1$. Adicionalmente foi utilizado o número de fêmeas com as quais cada macho copulou (N).

a) Para testar a existência de diferenças, nos vários parâmetros, entre os regimes dos casais foi utilizado o seguinte modelo ANOVA:

1) ANOVA bifatorial mista, seguindo a expressão:

$$Y = \mu + R + B + R*B + \varepsilon$$

sendo R o factor fixo regime (com dois níveis CW e NW) e B o factor aleatório bloco, com três níveis (1, 2 e 3). A existência de diferenças significativas nos parâmetros obtidos, devido ao regime do casal, foi dada pelo factor R .

b) Adicionalmente, foi testada a diferença entre as durações das cópulas, utilizando o seguinte modelo ANOVA:

$$Y = \mu + R + B + X + R*X + R*B + R*X*B + \varepsilon$$

sendo R o factor fixo regime (com dois níveis CW e NW), B o factor aleatório bloco e o número de acasalamentos ocorridos, X , o covariato. Como anteriormente descrito, o termo R reporta as diferenças entre regimes. Para ver se existem diferenças entre os regimes na duração dos acasalamentos em função do número de acasalamentos já feitos pelo macho, foi utilizado o termo de interação regime*número de acasalamentos ($R*X$).

Morfologias

Nesta análise utilizaram-se duas características: M – medição do tamanho do indivíduo; S – sexo do indivíduo.

a) Para testar a existência de diferenças entre o tamanho dos indivíduos dos vários regimes utilizou-se o seguinte modelo de ANOVA:

1) ANOVA bifatorial mista, seguindo a expressão:

$$Y = \mu + R + B + R*B + \varepsilon$$

sendo R o factor fixo regime (com 5 níveis: NB, NW, TW, FWA e CW) e B o factor aleatório bloco (com três níveis 1, 2 e 3). Este modelo foi aplicado tanto a dados de machos como a dados de fêmeas. A existência de diferenças significativas de tamanhos, entre os vários regimes é dada pelo o factor R .

b) Testou-se ainda a existência de efeito do sexo nas diferenças entre o tamanho dos indivíduos dos vários regimes, utilizando o seguinte modelo ANOVA:

1) ANOVA trifactorial mista, seguindo a expressão:

$$Y = \mu + R + S + B + R*S + R*B + S*B + R*S*B + \varepsilon$$

Sendo R e S os factores fixos regime (com 5 níveis: NB, NW, TW, FWA e CW) e sexo (com dois níveis: macho e fêmea), respectivamente, e B o factor aleatório bloco (com três níveis 1, 2 e 3). A existência de diferenças significativas entre os sexos é dada pelo factor S e o termo de interacção sexo*regime diz-nos se as diferenças de tamanho dos indivíduos entre regimes varia com o sexo.

Características da História da Vida

Nesta análise utilizaram-se as 5 características da história da vida: idade da primeira reprodução (A1R), fecundidade precoce (F1-7), fecundidade de pico (F8-12), resistência dos machos à inanição (RM) e resistência das fêmeas à inanição (RF). Como foi dito anteriormente, estes dois ensaios utilizaram casais homogâmicos e heterogâmicos ♀CW*♂NW e ♀NW*♂CW, por isso foram feitos dois tipos de análises diferentes: análise às diferenças entre NW e CW, usando os dados dos casais heterogâmicos e homogâmicos correspondentes, e análise apenas com casais homogâmicos destes regimes e das gerações iniciais das populações NW, TW, FWA e CW.

a) Análise das diferenças entre CW e NW:

1) Para testar a existência de diferenças e da sua variação ao longo das gerações foram aplicados os seguintes modelos

→ para testar se existiam diferenças entre CW e NW na mesma geração foi aplicado um modelo de ANOVA bifactorial mista segundo o modelo:

$$Y = \mu + R + B + R*B + \varepsilon$$

Os valores das variáveis dependentes correspondem aos valores absolutos de cada casal da geração 4 e 7 do regime CW, o factor fixo R representa o regime e B representa o factor aleatório bloco.

→ para testar a existência de diferenças significativas entre gerações, para os dois regimes, foi aplicada uma ANOVA bifactorial mista segundo o modelo:

$$Y = \mu + G + B + G*B + \varepsilon$$

em que os valores das variáveis dependentes correspondem à diferença dos dados individuais de cada réplica à média da réplica do controlo correspondente (por exemplo: $\text{casal2}_{\text{CW1}} - \text{média}_{\text{NW1}}$). O factor fixo G representa a geração (4 ou 7) e vai indicar se existem diferenças ao longo das gerações e o factor aleatório B corresponde ao bloco (com três níveis: 1, 2 e 3).

2) para testar a existência de diferenças entre casais homogâmicos e heterogâmicos foi utilizado um modelo de ANOVA para as diferentes gerações.

→ inicialmente foi feita uma ANOVA trifactorial mista, seguindo a expressão:

$$Y = \mu + M + F + B + M * F + F * B + M * B + M * F * B + \epsilon$$

sendo M e F os factores fixos macho e fêmea, respectivamente, cada um com dois níveis (CW e NW) e B o factor aleatório bloco, com três níveis (1, 2 e 3). Este modelo foi utilizado com o intuito de verificar se existiam diferenças significativas entre os machos e fêmeas de cada regime e se a sua interacção seria significativa.

b) análise da diferenciação inicial das CW *versus* FWA, FWB, TW:

Para esta análise foram feitas regressões lineares para cada regime, utilizando como dados a diferença de cada réplica ao controlo (e.g. $CW_2 - NW_2$), no conjunto inicial de gerações ensaiadas. Foram utilizados os valores das gerações 3 à 14 da TW, 3 à 15 da FWA e FWB e 4 e 7 da CW, utilizando como controlo a população NW, uma vez que este estudo incide sobre a diferenciação da CW e tem sido utilizada a população NW como controlo para esta população. A diferenciação inicial das populações é dada pelo valor de intercepção da recta com o eixo das abcissas e, juntamente com a taxa evolutiva (que é dada pelo declive da regressão), pode ser um indicador do tipo de dinâmica evolutiva das populações no período inicial de adaptação ao laboratório. Para testar se existem diferenças significativas entre a diferenciação inicial das populações comparadas foram feitas ANOVAs simples relativas ao valor da intercepção dos modelos lineares de cada população réplica seguindo o modelo:

$$Y = \mu + F + \epsilon$$

em que o factor fixo fundação, F, indica os diferentes regimes analisados. Nos casos em que existiam diferenças significativas no factor fundação, foram feitos contrastes, para determinar entre que regimes é que existiam diferenças.

3.3 - Resultados

Comportamento

Comportamento de Fuga

Os resultados do teste às densidades indicam que há um desvio da densidade por tubo entre réplicas do regime FWA, CW e NW ($p=0.047$, $p= 0.020$ e $p=0.097$, respectivamente) e entre os três regimes ($p = 0.032$). Os desvios de densidade observam-se entre o regime CW e FWA (tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Teste t às diferenças de densidade e de número de fugas entre regimes

| | CW-NW | CW-FWA | NW-FWA |
|-------------|-------|--------|--------|
| densidade | 0.66 | 16.82* | 2.79 |
| nº de fugas | 1 | 1.85 | 1.99 |

* p<0.05.

Não foi observado um número de fugas diferencial dentro dos regimes (CW: p=0.98, FWA: p=0.20, NW: p=0.42) e ao comparar os pares de regimes também não se observaram diferenças (tabela 3.1).

Acasalamentos Homogâmicos versus Heterogâmicos

Não se observaram diferenças entre fêmeas dos regimes CW e NW para nenhuma das gerações (tabela 3.2). Por outro lado, observou-se que os machos NW da geração 4 apresentam um tempo significativamente menor desde o início do ensaio até iniciar a corte (A1), iniciar a cópula (A2) e finalizar a cópula (A3) e demoram menos a fazer a corte (DCt) do que os macho CW (tabela 3.2 e fig.3.1, esquerda). Por outro lado, a duração da cópula (DCp) é marginalmente maior que para os CW (tabela 3.2, fig. 3.1, esquerda). Na geração 7, observa-se que os machos NW continuam a demorar mais na cópula que os CW (tabela 3.2, fig. 3.1, direita), mas as restantes diferenças deixaram de ser significativas (tabela 3.2). Nos casais homo e heterogâmicos não se observam diferenças significativas para nenhuma geração (interacção fêmea*macho na tabela 3.2).

A preferência do macho, ou da fêmea, pelo sexo oposto de outro ou do mesmo regime pode manifestar-se não só nos tempos de acasalamento como no número de cortes (no caso do macho) e acasalamentos (no caso da fêmea). O macho aparenta não ter preferências no regime das fêmeas, uma vez que não houve casais em que o macho não tenha efectuado corte, em nenhuma das gerações. Por outro lado, houve casais em que não houve cópula, embora não tenha havido uma direcção preferencial na escolha dos machos nas duas gerações (tabela 3.3).

Tabela 3.2 – Valores dos testes ANOVA às diferenças entre fêmeas, machos e tipo de casal nas gerações 4 e 6 do regime CW. Valores de F e a sua significância são apresentados para os diferentes parâmetros medidos.

| | | A1 | A2 | A3 | DCt | DCp |
|----|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| G4 | Fêmea | ns | ns | ns | ns | ns |
| | Macho | 94.39** | 97.69** | 38.59** | 42.06** | 11.19* |
| | Fêmea*Macho | ns | ns | ns | ns | ns |
| G6 | Fêmea | ns | ns | ns | ns | ns |
| | Macho | ns | ns | ns | ns | 31.45** |
| | Fêmea*Macho | ns | ns | ns | ns | ns |

A1, A2, A3, DCt, DCp correspondem respectivamente a: tempo desde o início do

ensaio ao início da corte; tempo desde o início do ensaio até ao início da cópula; tempo desde o início do ensaio até ao fim da cópula; duração da corte; duração da cópula. ns $p>0.10$; * $0.05<p<0.10$; ** $p<0.05$.

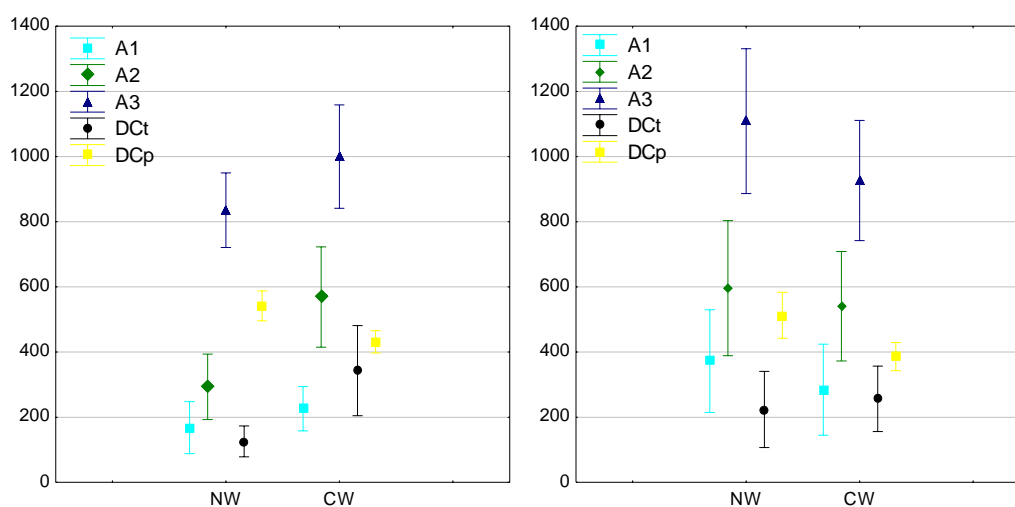


Fig. 3.1 – Valores médios de tempo dos machos NW e CW no ensaio da geração 4 (à esquerda) e na geração 6 (à direita). O erro apresentado corresponde a intervalos de confiança a 95%. Para ver abreviaturas consultar a tabela 3.2.

Na análise da variação dos tempos entre gerações observaram-se diferenças no tempo até início e fim de cópula e duração da cópula entre gerações, variando estas consoante o regime do macho (interacção macho*geração, tabela 3.4). Para além disso, houve também modificação do tempo até ao início da corte entre gerações, para machos e fêmeas (tabela 3.4). Nas fêmeas observou-se que a modificação do tempo de início da corte variava entre gerações e entre regimes (interacção fêmea*geração, tabela 3.4).

Para além de testar a existência de diferenças entre casais homogâmicos e heterogâmicos, é também interessante testar se existem diferenças entre as várias direcções que o casal pode tomar. A direcção de um acasalamento é dada pelo tipo fêmea e pelo tipo de macho que compõe o casal, existindo, neste caso, quatro direcções: N - ♀NW♂NW; C - ♀CW♂CW; NC - ♀NW♂CW; CN - ♀CW♂NW. Verificou-se que existem diferenças significativas na duração da cópula entre as direcções do cruzamento (tabela 3.5a). Esta diferença deve-se ao casal homogâmico NW demorar mais tempo a copular que os restantes (tabela 3.5b e fig. 3.2). Como foi observado anteriormente, o macho NW leva mais tempo a copular do que o macho CW e, comparando o acasalamento homogâmico NW com o outro acasalamento com o macho NW (acasalamento CN), verifica-se que existe uma grande discrepância entre os tempos destes dois (fig 3.2), sugerindo que a diferença poderá ser, não só devido ao macho, mas

também à fêmea NW e que a interação entre os dois é que leva ao aumento de tempo da duração da cópula. É também de notar que o acasalamento homogâmico CW é o que apresenta menor duração de cópula (fig. 3.2).

Tabela 3.3 – Valores do teste t feito às diferenças no número de cortes com cópula entre acasalamentos homogâmicos e heterogâmicos para as gerações 4 e 6. Os valores utilizados correspondem à transformação arcsen das proporções entre ‘nº de cortes com acasalamento/nº total de cortes’.

| | | |
|---------|-----------|-----------|
| | geração 4 | geração 6 |
| teste t | 1.37 | 0.1 |

* p<0.05

Tabela 3.4 – Valores dos testes ANCOVA às diferenças entre gerações para fêmeas, e machos. São apresentados valores de F e a sua significância.

| | | | | | |
|---------------|----------|---------|----------|-----------|-----|
| | A1 | A2 | A3 | DCt | DCp |
| Macho | ns | ns | ns | 19.7522** | ns |
| Geração | 9.4264** | ns | ns | ns | ns |
| Macho*Geração | ns | 6.5787* | 6.05339* | 8.009** | ns |

| | | | | | |
|---------------|-----------|----|----|----|----------|
| Femea | ns | ns | ns | ns | 15.4645* |
| Geração | 17.4771** | ns | ns | ns | ns |
| Femea*Geração | 7.4399* | ns | ns | ns | ns |

ns p>0.10; * 0.05<p<0.10; ** p<0.05.

Tabela 3.5 – Valores dos testes ANOVA às diferenças entre as direcções dos cruzamentos e os contrastes. São apresentados os valores de F e a sua respectiva significância, a) valores de ANOVA às diferenças entre direcções de cruzamentos para as gerações 4 e 6; b) contrastes feitos à duração da cópula na geração 6.

| | | | | | |
|----|----|---------|----|-----|----------|
| a) | A1 | A2 | A3 | DCt | DCp |
| G4 | ns | 3.7885* | ns | ns | 4.4290* |
| G6 | ns | ns | ns | ns | 6.9619** |

| | | | | |
|--------|---------|--------|--------|--------|
| b) | ♀NW♂NW | ♀CW♂CW | ♀CW♂NW | ♀NW♂CW |
| ♀NW♂NW | ---- | ---- | ---- | ---- |
| ♀CW♂CW | 19.53** | ---- | ---- | ---- |
| ♀CW♂NW | 6.79** | ns | ---- | ---- |
| ♀NW♂CW | 10.58** | ns | ns | ---- |

ns p>0.10; * 0.05<p<0.10; ** p<0.05.

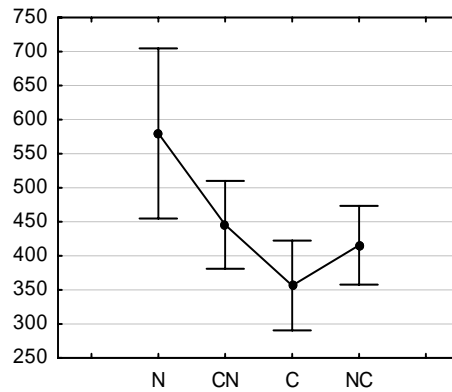


Fig. 3.2 – Valores médios das várias direcções dos cruzamentos, para a duração da cópula na geração 6. O erro apresentado corresponde a intervalos de confiança a 95%. N - ♀NW♂NW; C - ♀CW♂CW; NC - ♀NW♂CW; CN - ♀CW♂NW.

Competição

Devido ao delineamento experimental deste ensaio, nomeadamente, o facto de ter sido necessário pintar os machos para os poder distinguir, foi definido o parâmetro cor nas análises, de modo a tentar extrair o seu possível efeito no macho e na fêmea, no acasalamento e na corte. Devido ao aumento de complexidade dos modelos de ANOVA e à perda de graus de liberdade foi-se, inicialmente, determinar se havia diferenças significativas devido ao factor cor. Observou-se que os machos azuis, tanto CW como NW, cortejam mais do que os machos vermelhos (tabela 3.6) e que o macho azul CW acasala menos do que o vermelho, enquanto que o macho azul NW acasala mais (tabela 3.6). Embora os machos azuis consistentemente cortejem mais do que os vermelhos, verifica-se que não acasalam sempre mais do que os vermelhos. Esta inconsistência de resultados entre cores pode dever-se a um efeito aleatório e não necessariamente à cor com a qual o macho está pintado. Ao comparar o número de cortes/acasalamentos, vê-se que o macho CW corteja ligeiramente mais fêmeas do que o macho NW, mas que consegue acasalar com muito menos fêmeas.

Tabela 3.6 – Número de cortes e acasalamentos dos machos azuis CW e NW e para machos CW com *pool* de dados. São apresentados o número de cortes e acasalamentos feitos e a sua respectiva significância (valor esperado era 15 para os machos azuis CW e NW e para o macho CW era 30). A hipótese nula utilizada foi $H_0: \mu_{NW} = \mu_{CW}$.

| | Cortes | Acasalamentos |
|---------------|--------|---------------|
| Macho Azul CW | 17* | 11* |
| Macho Azul NW | 16* | 18* |
| Macho CW | 31* | 23* |

Desvios significativos aos valores esperados são assinalados por *.

Não se verificaram efeitos significativos da cor do macho (tabela 3.7a) para o tempo até ao início da corte/cópula (T1/T3), pelo que se fez o *pool* dos dados, retirando-se o factor cor. Não se observaram diferenças nem entre regimes de fêmeas (tabela 3.7b), nem entre casais homogâmicos e heterogâmicos (termo de interacção fêmea*macho, tabela 3.7b). No entanto verificou-se que o macho CW demora marginalmente mais tempo a iniciar a corte que o NW (tabela 3.7b e fig. 3.3). Observa-se ainda que, apesar de a interacção fêmea*macho não ser significativa, o macho CW demora sempre mais tempo a iniciar a corte/cópula com a fêmea CW e que o macho NW apresenta um tempo semelhante com qualquer fêmea (fig 3.3).

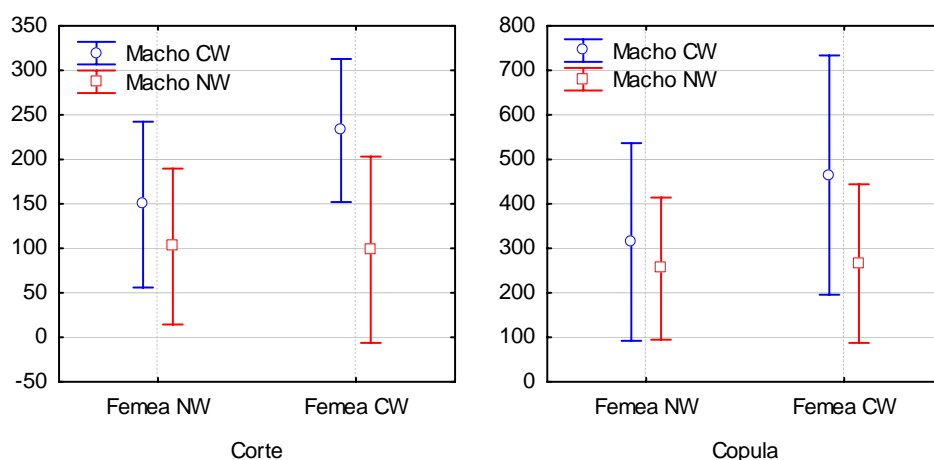


Fig. 3.3 – Valores médios no tempo de corte (esquerda) e cópula (direita), da interacção fêmea*macho. Os valores de erro apresentados correspondem a intervalos de confiança de 95%. No eixo dos X estão discriminados os regimes da fêmea.

Tabela 3.7 – Valores dos testes ANOVA ao efeito cor e às diferenças entre fêmeas, machos e tipo de casal para início de corte e cópula. São apresentados os valores de F e a sua significância. a) efeito do factor cor e à sua interacção com macho e fêmea; b) efeito macho, fêmea e casais homogâmicos e heterogâmicos (interacção fêmea*macho).

| a) | T1 | T3 | b) | T1 | T3 |
|-----------|----|----|-------------|--------|----|
| Cor | ns | ns | Fêmea | ns | ns |
| Fêmea*Cor | ns | ns | Macho | 12.81* | ns |
| Macho*Cor | ns | ns | Fêmea*Macho | ns | ns |

ns $p > 0.10$; * $0.05 < p < 0.10$; ** $p < 0.05$.

Re-acasalamento

Não se observaram diferenças significativas entre machos para o número de fêmeas acasaladas (N), tempo entre acasalamentos ($T_{(n,n+1)}$) e duração da segunda (D_2) e quarta (D_4) cópulas (tabela 3.8). No entanto observou-se que o macho NW demora marginalmente mais na primeira (D_1) e significativamente mais na terceira (D_3) cópulas (tabela 3.8 e fig 3.4).

Observou-se que a duração da cópula é significativamente diferente nos vários acasalamentos, mas não entre regimes (tabela 3.9). No entanto, não existem diferenças entre os regimes na duração da cópula nos vários acasalamentos (interacção regime*acasalamento, tabela 3.9).

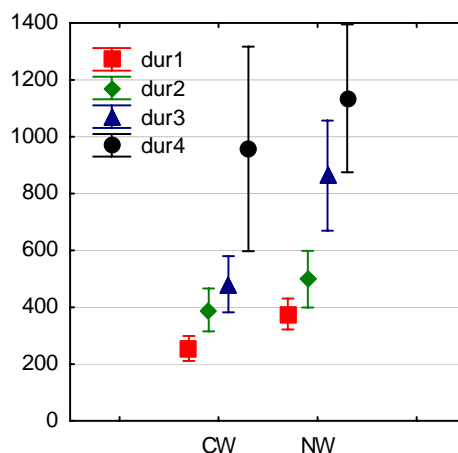


Fig. 3.4 – Valores médios da duração das cópulas para cada regime. Os valores de erro apresentados correspondem a intervalos de confiança de 95%. No eixo dos X estão discriminados os regimes do casal.

Tabela 3.8 – Valores do teste ANOVA às diferenças entre regimes para início, duração, número e tempo entre cópulas. São apresentados valores de F e as respectivas significâncias

| | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| D ₁ | D ₂ | D ₃ | D ₄ |
| 15.6705* | ns | 65.9795** | ns |
| T _(1,2) | T _(2,3) | T _(3,4) | N |
| ns | ns | ns | ns |

D_n - duração da cópula *n*; T_(n,n+1) - tempo entre o acasalamento *n* e o *n+1*; N - número de fêmeas com as quais cada macho copulou. ns $p > 0.10$; * $0.05 < p < 0.10$; ** $p < 0.05$.

Tabela 3.9 – Valores do teste ANCOVA às diferenças entre regimes para a duração da cópula tendo em conta o número de cópulas já feitas anteriormente.

| | | |
|--------|--------------|---------------------|
| Regime | Acasalamento | Regime*Acasalamento |
| ns | 2803.29** | ns |

ns $p > 0.10$; * $0.05 < p < 0.10$; ** $p < 0.05$.

Morfologia

Verificou-se que não existem diferenças significativas entre os vários regimes para nenhum sexo (tabela 3.10a). Como é de esperar, observa-se diferenças entre os sexos (tabela 3.10b), mas não existem diferenças entre sexos dos diferentes regimes (termo de interacção sexo*regime da tabela 3.10b).

Tabela 3.10 – Valores de teste ANOVA às diferenças de tamanho entre regimes, para machos e fêmeas, e entre machos e fêmeas. São apresentados os valores de F e respectiva significância, a) diferenças entre tamanhos de machos e fêmeas para os regimes NB, NW, TW, FWA e CW; b) diferenças de tamanho entre machos e fêmeas e entre cada regime.

| | | | |
|--------|--------|-------------|-------------|
| fêmeas | machos | sexo | regime*sexo |
| ns | ns | 10430.4517* | ns |

a) b)
* p<0.05

Características da História da Vida

Diferenças entre CW e NW

Nos casais homogâmicos não se observaram diferenças entre CW e NW nas gerações 4 e 7 para nenhuma das características da história da vida estudadas (A1R, F1-7, F8-12, RF e RM - tabela 3.11a), mas observou-se um aumento significativo da fecundidade de pico (F8-12) e resistência dos machos à inanição (RM) e um aumento marginalmente significativo da resistência das fêmeas à inanição (RF) entre as gerações 4 e 7 (tabela 3.11b). Ao testar, nos dois regimes, diferenças entre machos e fêmeas e entre casais homogâmicos e heterogâmicos, verificou-se que na geração 4 as fêmeas NW têm uma idade de reprodução marginalmente maior do que as CW, desaparecendo essa diferença na geração 7 (tabela 3.12). Verificou-se ainda que na geração 4 o macho NW tem maior resistência quando em homogamia, enquanto que o macho CW tem uma resistência semelhante em homo e heterogamia. Por outro lado na geração 7 os papéis invertem-se, tendo o macho NW um desempenho semelhante (mas baixo) em hetero e homogamia e o macho CW melhor desempenho em homogamia (figura 3.5).

Tabela 3.11 – Valores de teste ANOVA às diferenças entre regimes na geração 4 e 7 e entre as gerações para casais homogâmicos dos regimes CW e NW. a) valores de F correspondentes às diferenças entre CW e NW na geração 4 e 7, utilizando valores individuais; b) valores de F correspondente à variação dos valores da diferença de cada casal CW à média do controlo, entre as gerações 4 e 7.

| | | | | | |
|-----------|-----|------|-------|----|----|
| a) | A1R | F1-7 | F8-12 | RF | RM |
| Geração 4 | ns | ns | ns | ns | ns |
| Geração 7 | ns | ns | ns | ns | ns |

| | | | | | |
|---------|----|----|---------|-------|-----------|
| b) | | | | | |
| Geração | ns | ns | 19.17** | 8.65* | 1284.13** |

ns p>0.10; * 0.05<p<0.10; ** p<0.05.

Tabela 3.12 – Valores dos testes ANOVA às diferenças entre os regimes das fêmeas, machos e tipo de casal nas gerações 4 e 7. As fêmeas e machos têm dois regimes, CW e

NW, e a interação fêmea*macho indica diferenças entre casais homogâmicos e heterogâmicos. Valores de F e a sua significância são apresentados para os diferentes parâmetros medidos.

| | | A1R | F1-7 | F8-12 | RF | RM |
|-----------|-------------|-------|------|-------|----|-----------|
| Geração 4 | Fêmea | 9.18* | ns | ns | ns | ns |
| | Macho | ns | ns | ns | ns | ns |
| | Fêmea*Macho | ns | ns | ns | ns | 12.63* |
| Geração 7 | Fêmea | ns | ns | ns | ns | ns |
| | Macho | ns | ns | ns | ns | ns |
| | Fêmea*Macho | ns | ns | ns | ns | 1190.22** |

ns $p > 0.10$; * $0.05 < p < 0.10$; ** $p < 0.05$.

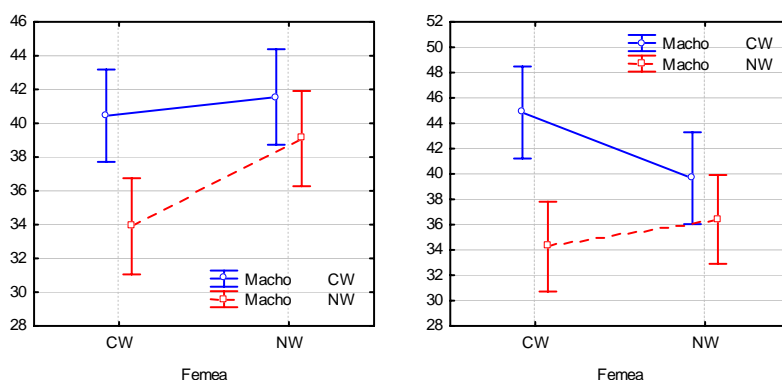


Fig. 3.5 – Valores médios da resistência dos machos à inanição na geração 4 (esquerda) e 7 (direita). Os valores de erro correspondem a intervalos de confiança de 95%.

Diferenciação inicial CW versus TW, FWA e FWB

Na comparação dos vários regimes, verifica-se que TW, FWA e FWB têm uma diferenciação inicial ao controlo significativamente positiva para a idade da primeira reprodução (A1R), e significativamente negativa para fecundidade precoce (F1-7) e para a fecundidade de pico (exceptuando TW que é marginalmente significativa), enquanto que o regime CW não apresenta diferenças significativas ao controlo (tabela 3.13). Não existem diferenças significativas entre nenhum dos regimes e o controlo para a resistência dos machos e fêmeas à inanição (tabela 3.13).

Na comparação das diferenciações iniciais entre os regimes observaram-se diferenças entre valores da idade da primeira reprodução, fecundidade precoce e de pico (tabela 3.14a). Ao fazer as comparações entre pares de regimes, verificou-se que o regime CW diferia significativamente dos restantes (tabela 3.14b) pois apresentava uma diferença ao controlo negativa na idade da primeira reprodução enquanto que os restantes apresentavam uma diferença positiva. O regime CW apresentava, ainda, uma diferença positiva na fecundidade

precoce ao contrário dos restantes regimes (tabela 3.13). Na fecundidade de pico diferia apenas da FWB (tabela 3.14b), apresentando valores negativos, mas baixos, enquanto que o regime FWB apresentava valores mais negativos (tabela 3.13). Os regimes FWA e FWB não apresentaram diferenças significativas entre elas (tabela 3.14b), embora apresentassem valores de fecundidade de pico marginalmente (tabela 3.14b, FWB – $0.1 < p < 0.05$) e significativamente (tabela 3.14b, FWA – $p < 0.05$) mais negativos do que a TW (tabela 3.13).

Tabela 3.13 – Valores de diferenciação inicial de cada população ao controlo NW e sua significância. Os valores de diferenciação dos regimes correspondem à aplicação de uma regressão com os dados das réplicas do regime.

| | A1R | F1-7 | F8-12 | RM | RF |
|----|----------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 2.3885 | -79.907 | -47.138 | -1.0214 | 3.9474 |
| 2 | 1.7458 | -56.63 | -13.803 | 6.7975 | 2.6772 |
| 3 | 1.4172 | -53.083 | -8.5833 | 1.3016 | -0.8599 |
| TW | 1.8505** | -63.2067** | -23.1749* | 2.3592 ns | 1.9216 ns |

| | | | | | |
|-----|---------|-----------|----------|------------|---------|
| 1 | 2.0331 | -75.957 | -56.233 | -2.4948 | -1.2009 |
| 2 | 0.9953 | -52.867 | -46.023 | -3.4605 | -2.5396 |
| 3 | 1.6095 | -73.246 | -74.025 | 0.4643 | 9.1705 |
| FWA | 1.546** | -67.357** | -58.76** | -1.8303 ns | 1.81 ns |

| | | | | | |
|-----|----------|-----------|-----------|------------|-----------|
| 1 | 1.9673 | -84.766 | -62.784 | 1.8938 | -1.9058 |
| 2 | 3.0867 | -83.983 | -98.815 | -6.049 | -1.2994 |
| 3 | 1.0193 | -67.846 | -69.782 | -2.8547 | 6.3633 |
| FWB | 2.0244** | -78.865** | -77.127** | -2.3367 ns | 1.0527 ns |

| | | | | | |
|----|------------|-----------|-------------|------------|------------|
| 1 | -0.6521 | -16.59 | -55.782 | -16.83 | -19.25 |
| 2 | -1.2038 | 38.257 | -8.4283 | -4.4444 | 9.8222 |
| 3 | 0.2537 | 15.546 | -50.648 | -3.0291 | -2.8328 |
| CW | -0.5341 ns | 12.404 ns | -38.2863 ns | -8.1012 ns | -4.0868 ns |

ns $p > 0.1$, * $0.1 > p > 0.05$, ** $p < 0.05$.

Tabela 3.14 – Valores dos testes ANOVA e contrastes da diferenciação inicial dos regimes. A) Valores de F correspondem às diferenças entre as diferenciações iniciais dos regimes TW, FWA, FWB e CW ao controlo (NW); b) Comparações de regimes para os parâmetros com diferenças significativas e marginalmente significativas.

| a) | A1R | F1-7 | F8-12 | RM | RF |
|--------|----------|-----------|---------|----|----|
| Regime | 7.9434** | 17.0203** | 3.9741* | ns | ns |

| b) | TW*FWA | TW*FWB | TW*CW | FWA*FWB | FWA*CW | FWB*CW |
|-------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|-----------|
| A1R | ns | ns | 16.0258** | ns | 12.1939** | 18.4489** |
| F1-7 | ns | ns | 28.0638** | ns | 31.2290** | 40.8909** |
| F8-12 | 4.5266* | 10.4049** | ns | ns | ns | 5.3926** |

ns $p > 0.1$, * $0.1 > p > 0.05$, ** $p < 0.05$.

3.4 - Discussão

Quantificar diferenças: comportamento, morfologia, fecundidade e resistência à inanição

É de esperar que quando se expõe uma população a um novo ambiente, esta sofra alterações evolutivas devido às pressões ambientais, que serão tanto maiores quanto menor for a adaptação da população a esse ambiente. Essas alterações reflectir-se-ão nas características directa ou indirectamente ligadas à *fitness*. Normalmente, são feitos estudos com características da história da vida, como fecundidade, resistência à dessecação e inanição, etc (Matos *et al*, 2000a, 2002, 2004; Griffiths *et al*, 2005; Simões *et al*, 2007a). O comportamento é uma característica que poderá ter um impacto não negligenciável no desempenho das populações e que poderá apresentar variações quando os indivíduos são introduzidos num novo ambiente devido a diferenças de, por exemplo, espaço, luz, nutrientes disponíveis, densidade, etc. É de notar que, caso haja selecção desta característica durante a adaptação, a maior alteração será provavelmente observada no comportamento de acasalamento. Dentro deste será difícil prever qual dos sexos, ou se os dois, irá/irão sofrer alterações. O tamanho do adulto pode também influenciar as componentes das características da história da vida. Características como a fecundidade e resistência ao stress podem ser directamente influenciadas pelo tamanho, devido à relação 'recursos necessários/recursos disponíveis' variar com as necessidades fisiológicas do indivíduo.

Ao comparar populações recém introduzidas em laboratório (CW), com populações já estabilizadas neste ambiente (NW), é de esperar que existam diferenças a vários níveis, devido à forte pressão ambiental que as populações CW poderão sofrer por terem sido colocadas num novo ambiente. A nível do comportamento de fugas verificou-se que o regime CW não apresentou fugas, facto algo inesperado já que, em fundações anteriores, foi visto que os adultos recém-emergidos tentavam fugir do tubo nas gerações iniciais.

No comportamento de acasalamento é de esperar um melhor desempenho por parte de populações já estabilizadas no ambiente laboratorial. Nos ensaios para testar diferentes desempenhos na corte e cópula de casais homo e heterogâmicos não se observaram preferências de regimes em machos e/ou fêmeas., apesar de se observar uma maior duração da cópula em casais homogâmicos NW. Como a duração da cópula está positivamente correlacionada com a quantidade de esperma transferido para a fêmea (Singh & Singh, 1999), quanto maior for o tempo de cópula, maior será a quantidade de esperma inseminado na fêmea e maior será a *fitness* do macho. Ao contrário do esperado, o desaparecimento das diferenças entre machos nos vários parâmetros, entre gerações, não foi devida a uma

melhoria por parte dos machos CW, mas sim a uma diminuição no desempenho dos machos NW, em particular no início da corte e cópula. Uma possível razão será a diferença na temperatura durante os dois ensaios, já que o primeiro ensaio foi feito na primavera e o segundo no verão. Assim, apesar das tentativas para manter a igualdade de temperaturas, no segundo ensaio a temperatura laboratorial seria entre os 23°C e os 25°C, o que poderá influenciar o desempenho das populações NW, que estão habituadas a ser mantidas numa temperatura mais baixa, enquanto que as populações CW, por estarem há pouco tempo em laboratório, poderão apresentar maior tolerância a variações na temperatura ambiental.

Uma componente importante da *fitness* no macho de *D. melanogaster* é a sua capacidade de competição no acasalamento (Service, 1993). Esta capacidade poderá ter uma especial relevância em laboratório uma vez que o número de fêmeas disponíveis para acasalar poderá, em qualquer altura, ser menor que o número de machos maduros (Sharp, 1982). Os resultados obtidos no ensaio de competição de machos entre os dois regimes em estudo sugerem que machos do regime NW copulam mais vezes do que os machos CW, e que os machos CW demoram mais tempo a iniciar a corte e cópula com fêmeas CW. Estes resultados sugerem que, embora não se observem diferenças temporais, estas poderão existir no número de acasalamentos entre populações há mais e menos tempo em laboratório. Service (1993) obteve diferenças na capacidade competitiva para os machos de *D. melanogaster* de duas linhas diferentes, com selecção para maior e menor longevidade. O autor observou maior habilidade competitiva em machos seleccionados para menor longevidade, quando se testava 36 horas após emergência dos adultos. Por outro lado, quando se testava a competição em idade mais avançada os machos seleccionados para maior longevidade tinham melhor desempenho. Estes resultados sugerem que a capacidade competitiva dos machos pode depender da idade para a qual os machos são seleccionados para acasalar. Embora nas nossas populações não exista uma selecção activa para a longevidade, existe uma forte pressão para o ciclo de vida seja completado em 28 dias, o que pode explicar o facto de as populações NW apresentarem maior rapidez a iniciar a cópula.

A capacidade de re-acasalamento é também umas das componentes importantes na *fitness* do macho (Singh & Singh, 2000). Singh e Singh (2000) estudaram esta capacidade em *D. ananassae* num estudo envolvendo duas fêmeas por macho, observando diferenças no tempo de cópula entre o primeiro e segundo acasalamento e no tempo entre acasalamentos devidas a diferentes locais de fundação. O nosso estudo sugere uma correlação positiva entre o tempo de acasalamento e o número de acasalamentos, embora só se observem diferenças

entre regimes na duração do primeiro e terceiro acasalamentos, tendo os machos NW maior duração de cópula. Ao contrário do esperado, não foram encontradas diferenças entre os tempos entre acasalamentos para os machos dos dois regimes.

É frequente encontrar na literatura referências a correlações genéticas positivas entre o tamanho e a *fitness*, quer seja por efeitos na fecundidade, resistência a vários stresses ou rapidez de acasalamento (por exemplo, Ruiz *et al*, 1991), embora esta associação não seja consensual (e.g. Boake & Koenigsberg, 1998). Nos poucos estudos em que são estudadas alterações de tamanho, durante a adaptação a um novo ambiente, não foram observadas variações no tamanho do adulto (Hercus & Hoffmann, 1999; Sgrò & Partridge, 2000; Griffiths *et al*, 2005). Neste estudo também não foram encontradas diferenças entre populações há um número variado de gerações em laboratório, nem entre machos e fêmeas das diferentes populações. Foram, no entanto, observadas diferenças de tamanho entre machos e fêmeas.

Na comparação dos dados das várias características verifica-se alguma disparidade, uma vez que as poucas diferenças encontradas no comportamento não têm grande reflexo na fecundidade. Era de esperar que características como a idade da primeira reprodução e fecundidade precoce e de pico apresentassem grandes diferenças em populações há mais e menos tempo em laboratório (Matos *et al* 2000a, 2002, 2004; Simões *et al* 2007a). Embora não se observem diferenças entre os casais homogâmicos, NW e CW, verifica-se uma alteração temporal dos valores da fecundidade de pico e resistência à inanição entre regimes. Estas diferenças são devidas à variação dentro do mesmo regime, nomeadamente ao aumento do valor médio do regime CW nestas características. Por outro lado, na comparação dos casais homo e heterogâmicos observam-se diferenças na resistência dos machos à inanição, embora estas não sejam consistentes entre gerações. No entanto, devido ao padrão evolutivo inconstante desta característica (Matos *et al*, 2000a, 2002, 2004; Simões *et al*, 2007a), esta não pode ser utilizada como um bom indicador da diferença entre populações.

Estes resultados apontam para a necessidade premente duma análise com diversas características relevantes para a *fitness* que, individualmente, poderão dar uma informação muito incompleta da dinâmica complexa da característica multifactorial que é a *fitness*.

CW: um caso de *stasis* evolutivo?

É de esperar que quando populações são introduzidas num novo ambiente, estas apresentem um aumento temporal de *fitness*, devido à pressão ambiental inicial. É também

de esperar que à medida que as populações se vão adaptando, a sua resposta evolutiva vá diminuindo levando a estabilização da população (Matos *et al*, 2000a).

Em trabalhos prévios Matos e colaboradores (Matos *et al*, 2000a, 2002; Simões *et al*, 2007a) estudaram a diferenciação de populações recém introduzidas no laboratório relativamente a um controlo, relacionando esta diferenciação inicial com a taxa evolutiva dessas mesmas populações. Estes autores obtiveram resultados que indicam que quanto maior a divergência inicial nas populações, maior será a pressão ambiental a que estão sujeitas e maior será a taxa evolutiva.

Neste tipo de análise só é possível determinar a taxa evolutiva através do estudo duma trajectória evolutiva, o que se revelou impossível, devido ao baixo número de gerações ensaiadas do regime CW. No entanto, foi possível determinar, de forma aproximada, a diferenciação inicial destas populações ao controlo. Era de esperar que o regime CW estivesse diferenciado do controlo, uma vez que é um regime recém introduzido no laboratório. No entanto, os resultados obtidos indicam que as populações CW não estavam diferenciadas para nenhuma das características estudadas. Embora as resistências à inanição sejam parâmetros com uma resposta complexa durante a adaptação a um mesmo ambiente, as características relacionadas com a fecundidade têm, usualmente, trajectórias evolutivas robustas, logo seria de esperar uma diferenciação inicial elevada nestes parâmetros.

Este comportamento anormal das populações CW não foi observado ainda em nenhuma das outras populações introduzidas no laboratório, sendo que, até agora, as gerações iniciais de todas as fundações traduziam um intenso período de adaptação, caracterizado por um aumento das duas fecundidades e diminuição do dia da primeira reprodução. O facto de os resultados obtidos nestes ensaios iniciais apontarem para não haver diferenciação inicial por parte do regime CW, poderá indicar que a taxa evolutiva deste regime será muito baixa (Matos *et al*, 2002). Isto porque, como foi referido acima, a pressão ambiental que vai ser feita sobre as populações leva a um aumento de *fitness*, traduzido por um melhoramento nas características da história da vida. Assim, se as previsões feitas por Matos e colaboradores (2002) estiverem correctas, a CW aparenta estar em *stasis* evolutivo. Uma hipótese alternativa é a de que no decorrer do processo adaptativo este regime vá evidenciar uma melhoria progressiva de desempenho e que supere o de populações há mais gerações em laboratório, devido a efeitos de fundo genético favoráveis ao atingir um novo pico adaptativo (Wright, 1977). Só mais gerações analisadas permitirão analisar qual dos padrões evolutivos irá ocorrer.

Considerações Finais

Este trabalho demonstra que existe um fenómeno geral de convergência na adaptação ao laboratório por parte de populações fundadas até 2005, apesar de a dinâmica evolutiva das diversas populações poder ser afectada por efeitos de fundação, nomeadamente local e ano de fundação, e não por efeitos de amostragem. Embora não tenha sido observado um padrão evolutivo geral para a resistência à inanição, verificou-se em todas as fundações um padrão geral de diminuição da idade da primeira reprodução e de aumento da fecundidade precoce e de pico (exceptuando para a fecundidade de pico do regime NARA).

Variações no fundo genético, devido a alterações ocorridas em diferentes anos de fundação ou à existência de diferentes fundos genéticos em populações separadas espacialmente, podem levar a alterações na rapidez e magnitude da resposta evolutiva das fundações durante a adaptação ao laboratório. É de salientar que as diferentes respostas evolutivas podem estar relacionadas com a variação na diferenciação inicial, a qual pode ser fruto da variação da composição das populações naturais. Embora estas contingências evolutivas não sejam visíveis em todas as características da história da vida estudadas, a sua existência poderá pôr de sobreaviso investigadores que queiram utilizar o método comparativo como descritor de dinâmicas evolutivas de populações a sofrerem adaptação a um novo ambiente. Também as alterações significativas observadas na taxa evolutiva entre fundações de diferentes anos para a fecundidade precoce, característica relevante para a *fitness*, reforçam as reservas à validade das proposições base do método comparativo (Matos *et al*, 2000b, Matos *et al*, 2004; Simões *et al*, 2007a, b, c).

O facto de o método comparativo poder ser problemático devido à existência de contingências evolutivas, foi reforçado pela introdução da fundação CW, uma vez que esta levou a que este método deixasse de ter capacidade de traçar padrões evolutivos para qualquer das características da história da vida estudadas. Por outro lado, a trajetória em tempo real do regime NW sugere que, para as características relacionadas com a fecundidade, existe um padrão claro de convergência ao controlo, o que não foi observado para nenhuma característica quando foi utilizado o método comparativo.

A discrepância existente nos resultados do método comparativo, antes e após introdução das populações CW, deve-se provavelmente ao facto de estas populações terem um comportamento anormal, para um regime recém introduzido no laboratório. Ao testar as diferenças entre a fundação CW e a fundação NW verificou-se que estas diferenças eram inexistentes para todas as características relacionadas com a fecundidade, resistência à

inanição das fêmeas e tamanho do corpo. Por outro lado, a nível do comportamento verificaram-se alguns indícios de melhor desempenho das populações há mais tempo em laboratório no acasalamento, nomeadamente na maior rapidez dos machos NW a iniciar cópula e maior quantidade de esperma transferido (relacionada com a cópula mais prolongada). É de notar que estas diferenças são consistente entre gerações e nos diferentes tipos de ensaios de comportamento, ao contrário das diferenças observadas na primeira geração amostrada, em que os machos das populações NW apresentam maior rapidez de início de corte, início de cópula e maior tempo de cópula. o que indica um melhor desempenho destas populações. Isto sugere que o início de corte poderá ter uma resposta evolutiva mais rápida, do que as restantes características comportamentais estudadas. No entanto, ao comparar a diferenciação inicial da fundação CW com as outras populações provenientes de Sintra, verificou-se que para as restantes populações havia uma diferenciação inicial muito grande ao controlo, nomeadamente em características relacionadas com a fecundidade, enquanto que para a CW tal não acontecia. Em outros trabalhos a equipa onde esta tese foi elaborada constatou que as populações recém introduzidas no laboratório possuem uma menor *fitness* no novo ambiente, o que é mostrado de maneira consistente pelo pior desempenho nos ensaios de características de história da vida (Matos *et al*, 2000a, 2002, 2004; Simões *et al* 2007a), o que não acontece com as populações CW.

A fundação CW não revela a diferenciação sugerida por estudos anteriores da equipa no estado inicial de adaptação ao laboratório. É de esperar que, segundo os resultados obtidos por Matos *et al* (2002) e Simões *et al* (2007), estas populações não apresentem, em gerações futuras, alterações evolutivas significativas, dado que não estão inicialmente diferenciadas das populações já adaptadas. No entanto, só a análise de mais gerações permitirá testar esta previsão

Algumas hipóteses a colocar para esta não diferenciação das populações CW, as quais deverão ser despistadas antes de aprofundar eventualmente as causas evolutivas, são por exemplo: contaminação das populações CW, antes da replicação, por populações do laboratório, as quais, mesmo em pequeno número, devido à *fitness* superior, invadiriam a nova população. Pode ser ainda devido à contaminação da população natural pelos investigadores durante as colheitas.

As contingências na evolução de populações colocadas no mesmo ambiente e o papel da selecção uniforme neste processo são temas que têm sido bastante discutidos (Cohan, 1984a; Cohan & Hoffmann, 1989; Travisano *et al*, 1995; Simões *et al*, 2007c). Os resultados deste

trabalho apontam para que, embora a selecção tenha um papel preponderante, existam diferenças importantes nas dinâmicas evolutivas entre populações devido a vários outros efeitos (Matos *et al*, 2002, 2004; Simões *et al*, 2007a, c). Uma questão que poderia ser interessante colocar seria se as contingências evolutivas seriam mais ou menos marcadas na adaptação ao laboratório de populações de uma latitude diferente das já amostradas, e estudar a adaptação através de critérios fenotípicos e moleculares, à semelhança do que foi feito por Simões e colaboradores (2007d). Para além disso, como o tamanho apresenta, normalmente, fortes correlações com os clines latitudinais (Huey *et al*, 2000; De Jong & Bochdanovits, 2003), provavelmente devido a diferenças de temperatura, seria relevante verificar se existiriam modificações a nível de tamanho na adaptação ao laboratório, já que foi verificado neste estudo que em populações amostradas de latitudes próximas não havia modificações.

A nível comportamental, este estudo aponta para que diferenças entre populações com tempos em laboratório distintos não são muito visíveis em ensaios comportamentais. No entanto, devido à singularidade das populações CW, seria interessante verificar se os resultados obtidos são ou não verdadeiramente artefactos desta fundação. Uma aproximação molecular, utilizando marcadores neutros (como por exemplo microssatélites) e comparando as populações com as populações há mais tempo em laboratório, poderia, também, ser utilizada para tentar descobrir a origem das populações CW.

Independentemente da origem da fundação CW, é importante ter presente que a imprevisibilidade da evolução é um factor não negligenciável no estudo da adaptação de populações a um novo ambiente e, também, que será importante determinar até que ponto a estrutura espacio-temporal subjacente à diversidade genético-evolutiva a nível intra e inter-populacional são relevantes no modo como as populações se adaptam a um novo ambiente. Isto poderá ser conseguido através da análise de diversas características, tanto fenotípicas, como moleculares ou cariológicas, de modo a obter uma caracterização mais fina dos processos subjacentes ao processo adaptativo.

Bibliografia

- Boake, C. R. B. & L. Koenigsberg. 1998. Inheritance of male courtship behaviour, aggressive success, and body size in *Drosophila silvestris*. *Evolution* 52: 1487-1492.
- Chippindale, A.K., Chu, T.J.F. & Rose, M.R. 1996. Complex trade-offs and the evolution of starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 50: 753-766.
- Chippindale, A.K., Alipaz, J.A., Chen, H.-W. & Rose, M.R. 1997. Experimental evolution of accelerated development in *Drosophila*. 1. Development speed and larval survival. *Evolution* 51:1536-1551.
- Chippindale A. K. 2006. Experimental Evolution. In: C.F. Fox and J.B. Wolf (eds.), *Evolutionary Genetics: Concepts and case studies*, pp. 482-501. Oxford Univ.Press, NY.
- Cohan, F. M. 1984a. Can uniform selection retard random genetic divergence between isolated conspecific populations? *Evolution* 38: 495-504.
- Cohan, F. M. 1984b. Genetic divergence under uniform selection. I. Similarity among populations of *Drosophila melanogaster* in their responses to artificial selection for modifiers of ciD. *Evolution* 38: 55-71.
- Cohan, F.M. & Hoffmann, A.A. 1989. Uniform selection as a diversifying force in evolution: evidence from *Drosophila*. *Am. Nat.* 134: 613-637.
- De Jong G. & Z. Bochdanovits. 2003 Latitudinal clines in *Drosophila melanogaster*: body size, allozyme frequencies, inversion frequencies, and the insulin-signalling pathway. *J. Genet.* 82: 207-223.
- Edwards, A. C., S. M. Rollmann, T. J. Morgan & T. F. C. Mackay. 2006. Quantitative Genomics of Aggressive Behaviour in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet* 2(9): e154. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020154.
- Folk, D. G. & Bradley, T. S. 2005. Adaptive Evolution in the Lab: Unique Phenotypes in Fruit Flies Comprise a Fertile Field of Study. *Integr. Comp. Biol.* 45:492-499.
- Fuller, R.C., Baer, C.F. & Travis, J. 2005. How and when selection experiments might actually be useful. *Integr. Comp. Biol.* 45: 391-404.
- Futuyma, D.J. 1998. *Evolutionary Biology*, 3rd edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Gilchrist, G. W., Huey, R. & Serra, L. 2001. Rapid evolution of wing size clines in *Drosophila subobscura*. *Genetica* 112-113: 273-286.
- Gilligan, D.M. & Frankham, R.. 2003. Dynamics of adaptation to captivity. *Conserv. Genet.* 4: 189-197.

- Grant, B. & Mettler, L. E., 1969. Disruptive and stabilizing selection on the "escape" behaviour on *Drosophila melanogaster*. *Genet* 62:625-637.
- Griffiths, J.A., Schiffer, M., & Hoffmann, A. A. 2005. Clinal variation and laboratory adaptation in the rainforest species *Drosophila birchii* for stress resistance, wing size, wing shape and development time. *J. Evol. Biol.* 18: 213-222.
- Harshman, L.G., Hoffmann, A.A. & Clark, A.G. 2000. Laboratory selection experiments using *Drosophila*: what do they really tell us? *Tree* 15: 32-36.
- Harshman, L.G., Moore, K.M., Sty, M.A., & Magwire, M.M. 1999. Stress resistance and longevity in selected lines of *Drosophila melanogaster*. *Neurobiology of Aging* 20, 521-29.
- Hegde, S. N. and Krishna, M. S. 1999. Body size and fitness characters in *Drosophila malerkotliana*. *Curr. sci.* 77(1): 178-179.
- Hercus, M. J. & Hoffmann, A. A. 1999. Does inter-specific hybridization influence evolutionary rates? An experimental study of laboratory adaptation in hybrids between *Drosophila serrata* and *Drosophila birchii*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266: 2195-2200.
- Hoffmann, A. A., R. Hallas, C. Sinclair, C. & L. Partridge. 2001. Rapid loss of stress resistance in *Drosophila melanogaster* under adaptation to laboratory culture. *Evolution* 55: 436-438.
- Hoffmann, A.A., Hallas, R., Sinclair, C. & Partridge, L. 2001. Rapid loss of stress resistance in *Drosophila melanogaster* under adaptation to laboratory culture. *Evolution* 55: 436-438.
- Huey, R. B., G. W. Gilchrist, M. L. Carlson, D. Berrigan & L. Serra. 2000. Rapid Evolution of a Geographic Cline in Size in an Introduced Fly. *Science* 287: 308-309.
- Huey, R. B., Hertz, P. E. and Sinervo, B., 2003. Behavioral drive versus behavioral inertia in evolution: a null model approach. *The Amer Nat.* 161-3: 357-366.
- Kauer, M. O. & Schlotterer, C. 2004. An analysis of genetic differentiation among assortatively mating *Drosophila melanogaster* in Zimbabwe. *Journ. Evol.. Biol.* 17: 493-500.
- Kennington WJ, Gilchrist AS, Goldstein DB, Partridge L (2001). The genetic bases of divergence in desiccation and starvation resistance among tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 87: 363-372.
- Kleist, R. A. 1985. Genetic analysis of the light dependence of courtship on *Drosophila subobscura*. *Behavior Genetics* 15(2): 123-134.
- Korol, A., Rashkovetsky, E., Iliadi, K., Michalak, P., Ronin, Y., and Nevo, E. 2000. Nonrandom mating in *Drosophila melanogaster* laboratory populations derived from closely adjacent ecologically contrasting slopes at "Evolution Canyon". *PNAS* 97(23): 12637-12642.

- Korona, R. 1996 Genetic Divergence and Fitness Convergence Under Uniform Selection in Experimental Populations of Bacteria. *Genet.* 143: 637-644.
- Korona, R., Nakatsu, C. H., Forney, L. F. & Lenski R. E. 1994. Evidence for multiple adaptive peaks from populations of bacteria evolving in a structured habitat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9037-9041.
- Krebs, R.A., Roberts, S. P., Bettencourt, B. R., & Feder, M. E. 2001. Changes in thermotolerance and hsp70 expression with domestication in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 14: 75-82.
- Latter, B.D.H. & Mulley, J.C. 1995. Genetic adaptation to captivity and inbreeding depression in small laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. *Genet.* 139: 255-266.
- Lawniczak, M. K. N. and Begun, D. J. 2004. A genome-wide analysis of courting and mating responses in *Drosophila melanogaster* females. *Genome* 47: 900-910.
- Lenski, R.E., Rose, M.R., Simpson, S.E. & Tadler, S.C. 1991. Long term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2000 generations. *Am. Nat.* 138: 1315-1341.
- Losos, J. B., Schoener, T. W. & Spiller, D. A. 2004. Predator-induced behaviour shifts and natural selection in field experimental lizard populations. *Nature* 432: 505-508.
- M. Santos, Ruiz, A., Barbadilla, A., Quezada-Diaz, J. E., Hasson, E. & A. Fontdevila. 1988. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XIV. Larger flies mate more often in nature. *Heredity* 61:255-262.
- Mackay, T., S. Heinsohn, R. Lyman, A. Moehring, T. Morgan & S. Rollmann. 2005. Genetics and Genomics of *Drosophila* Mating Behaviour. *Proc.Natl. Acad.Sci. U.S. A.* 102 Suppl 1:6622-6629.
- Maclean, R. C., Bell, G. 2003. Divergent evolution during an experimental adaptive radiation. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270:1645-1650.
- Magiafoglou, A. & Hoffmann, A. 2003. Thermal adaptation in *Drosophila serrata* under conditions linked to its southern border: unexpected patterns from laboratory selection suggest limited evolutionary potential. *Journ. of Genet.*, 82(3): 179-189.
- Markow, T.A. & O'Grady, P.M., 2005. Evolutionary genetics of reproductive behaviour in *Drosophila*: connecting the dots. *Annu. Rev. Genet.* 39: 263-291.
- Matos, M., M.R. Rose, M.T. Rocha Pit e, C. Rego & T. Avelar. 2000a. Adaptation to the laboratory environment in *Drosophila subobscura*. *J. Evol. Biol.* 13: 9-19.

- Matos, M., Rego, C., Levy, A., Teotónio, H. & Rose, M.R. 2000b. An evolutionary no man's land. *Trends Ecol. Evol.* 15: 206.
- Matos, M. & Avelar, T. 2001. Adaptation to the laboratory: comments on Sgrò and Partridge. *Am. Nat.* **158**: 655-656.
- Matos, M., Avelar, T. & Rose, M. R.. 2002. Variation in the rate of convergent evolution: adaptation to a laboratory environment in *Drosophila subobscura*. *J. Evol. Biol.* 15: 673-682.
- Matos, M., P. Simões, A. Duarte, C. Rego, T. Avelar & M.R. Rose. 2004. Convergence to a novel environment: comparative method versus experimental evolution. *Evolution* 58: 1503-1510.
- Moehring, A. J. and Mackay, T. F. C. 2004. The Quantitative Genetic Basis of Male Mating Behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167: 1249-1263.
- Morgan, T. J., Garland Jr, T., Irwin, B. L., Swallow, J. G., Carter, P. A. 2003. The Mode of Evolution of Molecular Markers in Populations of House Mice Under Artificial Selection for Locomotor Behavior. *Journ of Heredity* 94(3):236-242.
- Mueller, L.D., D.G. Folk, N. Nguyen, P. Nguyen, P. Lam, M.R. Rose, and T. Bradley. 2005. Evolution of larval foraging behaviour in *Drosophila* and its effects on growth and metabolic rate. *Physiological Entomology* 30: 262-269.
- Noor, M. A. F. 1997. Genetics of sexual isolation and courtship dysfunction in male hybrid of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. *Evolution* 51(3): 809-815.
- Partridge, L., R. Langelan, K. Fowler, B. Zwaan & V. French. 1999. Correlated responses to selection on body size in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res., Camb.* 74: 43-54.
- Philip, U., Rendel, J. M., Spurway, H. And Haldane, J. 1944. Genetics and kariology of *Drosophila subobscura*. *Nature* 154: 260-262.
- Pinsker, W. and Doschek, E. 1980. Courtship and rape: the mating behaviour of *Drosophila subobscura* in light and in darkness. *Z. Tierpsychol.* 54: 57-70.
- Prasad, N. G. & A. Joshi. 2003. What have two decades of laboratory life-history evolution studies on *Drosophila melanogaster* taught us? *Journal of Genetics* 82:45-75.
- Reznick, D.N. & Ghalambor, C.K. 2005. Selection in nature: experimental manipulations of natural populations. *Integr. Comp. Biol.* 45: 456-462.
- Rose, M.R. 1984. Genetic covariation in *Drosophila* life history: untangling the data. *Am. Nat.* 123: 565-569.
- Rose, M.R., & Lauder. 1996. *Adaptation*. Academic Press, San Diego, CA.

- Santos, M., Fernández Iriarte, P., Céspedes, W., Balanyà, J., Fontdevila, A. and Serra, L. 2004. Swift laboratory thermal evolution of wing shape (but not size) in *Drosophila subobscura* and its relationship with chromosomal inversion polymorphism. *Journ. of Evol. Bio.* 17:841-855.
- Santos, M., Ruiz, A., Quezada Díaz, J. E., Barbadilla, A. and Fontdevila, A. 1992. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XX. Positive phenotypic covariance between field adult fitness components and body size. *Journ. of Evol. Bio.* 5:403-422.
- Schiffer, M., Carew, M. E. & Hoffmann, A. A. 2004 Molecular, morphological and behavioural data reveal the presence of a cryptic species in the widely studied *Drosophila serrata* species complex. *Journ. of Evol. Bio.* 17:2, 430-442.
- Schimdt, P. S., Matskin, L., Ippolito, M., and Eanes, W. F. 2005. Geographic variation in diapause incidence, life-history traits, and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 59(8):1721-1732.
- Service, P. M. 1989. The effect of mating status on lifespan, egg laying and starvation resistance in *Drosophila melanogaster* in relation to selection on longevity. *Journ. Insect Physiol.* 35(5):447-452.
- Service, P. M. 1993. Laboratory evolution of longevity and reproductive fitness components in male fruit flies: mating ability. *Evolution* 47(2):387-399.
- Service, P.M. & Rose, M.R. 1985. Genetic covariation among life-history components: the effect of novel environments. *Evolution* 39: 943-945.
- Sgrò, C. M. & L. Partridge. 2000. Evolutionary responses of the life history of wild-caught *Drosophila melanogaster* to two standard methods of laboratory culture. *Am. Nat.* 156: 341-353.
- Sharp, P. M. 1982. Competitive mating in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* 40: 201-205.
- Simões, P., Rose, M.R., Duarte, A., Gonçalves, R. & Matos, M. 2007a. Evolutionary domestication in *Drosophila subobscura*. *J. Evol. Biol.* 20: 758-766.
- Simões, P., Santos, J. & Matos, M. 2007b. Experimental domestication. In: *Experimental Evolution: Concepts, Methods, and Applications*. Garland, T. and M. R. Rose. California University Press (em impressão).
- Simões, P., Santos, J., Fragata, I., Mueller, L.D., Rose, M.R. & Matos, M. 2007c. How repeatable is adaptive evolution? The role of geographical origin and founder effects in laboratory adaptation. Submitted.

- Simões, P., Pascual, M., Santos, J., Rose, M.R. & Matos, M. 2007d. Evolutionary dynamics of molecular markers during laboratory adaptation in *Drosophila subobscura*. Submitted.
- Singh, B. N. and Singh, S. R. 1999 Female remating in *Drosophila ananassae*: shorter duration of copulation during second mating as compared to first mating. *J Biosci*, 24: 427-431.
- Singh, S. R. & B. N. Singh. 2003. Behavioral genetics of *Drosophila ananassae*. *Genet. Mol. Res.* 2(4): 394-409.
- Singh, S. R. and Singh, B. N. 2000 Male Remating in *Drosophila ananassae*: Evidence for Interstrain Variation in Remating Time and Shorter Duration of Copulation during Second Mating. *Zoological science* 17: 389-393.
- Smith, J. M., 1956. Fertility, mating behaviour and sexual selection in *Drosophila subobscura*. Republished in *J. Genet.* (2005) 84: 17-35.
- Sokal, R. R., and Rohlf, F. J. 1981. *Biometry*, 3rd ed. W. H. Freeman, San Francisco, CA USA.
- Sokolowsky, M. B., Pereira, H. S., and Hughes, K. 1997. Evolution of foraging behaviour in *Drosophila* by density-dependent selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7373-7377
- Steele, R. H., 1986a. Courtship feeding in *Drosophila subobscura*. I. The nutritional significance of courtship feeding. *Anim. Behav* 34:1087-1098.
- Steele, R. H., 1986b. Courtship feeding in *Drosophila subobscura*. II. Courtship feeding by males influences female mate choice. *Anim. Behav* 34:1099-1108.
- Teotónio, H. & Rose, M.R. 2000. Variation in the reversibility of evolution. *Nature* 408: 463-466.
- Teotónio, H., Matos, M. & Rose, M.R. 2002. Reverse evolution of fitness in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 15: 608-617.
- Travisano, M., Mongold, J.A., Bennett, A.F. & Lenski, R.E. 1995. Experimental tests of the roles of adaptation, chance, and history in evolution. *Science* 267:87-90.
- Wilkinson, G. S., Kahler, H., Baker R.H. 2005. Evolution of female mating preferences in stalk-eyed flies. *Integr. Comp. Biol.* 45(3):500 - 510.
- Wright, S. 1977 *Evolution and the genetics of populations. Volume 3. Experimental results and evolutionary deductions*. University of Chicago Press, Chicago.