Genética de populações de anofelinos IV. Estudos eletroforéticos das populações naturais de **Anopheles nuneztovari** e **Anopheles darlingi**. Correlação genética entre espécies[1]

Sudhir Narang (*), Joselita M. M. Santos (**), João C. Garcia (***), Helena D. Cristakou (*) e Neelam Narang (**)

Resumo

Estudou-se a variação genética em 26 **loci** de uma população natural de **A. nuneztovari** e 19 **loci** de **A. darlingi** pela técnica de zimograma. A proporção média de **loci** polimórficos, proporção de indivíduos heterozigotos por **locus** e proporção de genoma heterozigoto por indivíduo é 0,54, 0,111 e 0,171 em **A. nuneztovari** e 0,632, 0,125 e 0,21 em **A. darlingi**, respectivamente. O grau de variabilidade genética varia de **locus** para **locus**. De modo geral, esterases são bem mais polimórficos do que as desidrogenases. **A. darlingi** tem maior identidade genética com **A. aquasalis** (I = 0,624) do que com **A. nuneztovari** (I = 0,497).

Introdução

Como foi descrito anteriormente (Narang *et al.*, 1977 a, b e c), existem várias diferenças entre populações naturais de espécies de anofelinos. Estas diferenças podem ser dos tipos: fisiológico, comportamental, ecológico e também na capacidade vetorial. Essas populações geralmente não exibem diferenças morfológicas nítidas. Encontram-se 16 espécies de anofelinos do subgênero *Nyssorhynchus* em território brasileiro e só 3 espécies deste subgênero transmitem a malária, ou seja, *A. darlingi*, *A. arbistarsis* e *A. aquasalis*. Existem 2 cepas de *A. albitarsis* sem diferenças morfológicas durante seu estádio aquático, e com uma diferença mínima no tamanho da mancha preta no segundo segmento do tarso posterior. Estas 2 cepas foram identificadas como subespécies *A. albitarsis albitarsis* e *A. albitarsis domesticus* (Galvão & Damasceno, 1944). A primeira cepa é exofílica e zoofílica e a segunda é endofílica e antropofílica, sendo esta considerada como vetora da malária nas regiões costeiras do Brasil. Dentro da subespécie *A. albitarsis albitarsis*, há dois tipos de populações facilmente distinguíveis pelos cromossomos politênicos (Kreutzer *et al.*, 1976).

Um outro exemplo de diferenças populacionais encontra-se em populações de *A. nuneztovari* do Amazonas (Brasil) e da Colômbia e Venezuela. Na Colômbia e na Venezuela, essas populações são antropofílicas e endofílicas, sendo os principais vetores da malária naqueles países. Já a população do Brasil desta espécie é principalmente zoofílica, alimenta-se sobre animais domésticos mas picam o homem somente fora de casa (exofílicas). Essas populações nunca foram encontradas infectadas com plasmódios humanos nas condições naturais. Kreutzer *et al.* (1976) descobriram que as populações colombianas e venezuelanas são facilmente distinguíveis das brasileiras pelos padrões de cromossomos politênicos, embora não existam diferenças morfológicas entre as populações dos três países. Portanto, todos esses fatos acima citados sugerem que há diferenças genéticas/fisiológicas marcantes, porém, sem que haja diferenças morfológicas nítidas dentro das populações naturais desta espécie de anofelinos. Diferenças cromossômicas entre as populações naturais das várias espécies foram descritas pelo grupo de Kitzmiller (Kreutzer *et al.*, 1972 e Kreutzer *et al.*, 1976).

Nosso laboratório na Universidade de Brasília dedica-se ao estudo da estrutura genética das populações naturais das espécies de anofelinos a fim de buscar uma possível correla-

(1) — Trabalho realizado com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) a Sudhir Narang.

(*) — Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, D. F.
(**) — Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.
(***) — Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, D. F.

ção entre estrutura genética e vários parâmetros tais como, biológicos, fisiológico, incluindo a capacidade vetorial, ecológicos e meteorológicos, etc. Queremos saber se há um gene, grupo de genes, "supergene" ou segmento de genoma que possamos correlacionar com tais parâmetros. Será que existem "populações isoladas" dentro da distribuição geográfica de uma espécie? Se há, será que tem acompanhado mudanças genéticas? Quais os genes que podem ser usados como diagnóstico para distinguí-las? Será que o princípio de Wahlund (subdivisões dentro do conjunto gênico) se aplica às populações naturais dos anofelinos? Será que a variabilidade genética tem algum valor adaptativo e até que ponto a espécie pode suportar a carga genética? Será que as espécies anofelinas estreitamente relacionadas possuem um conjunto gênico comum? Usando a técnica de zimograma para estudo da estrutura genética (Hubby & Lewontin, 1966) podemos estudar "random" amostra do genoma das populações, das espécies, etc. Isto também fornecerá dados básicos para o estudo de relações filogenéticas entre os vários graus das taxas evolucionais dos anofelinos. Mas, todos estes estudos têm um pré-requisito; que, em 1.º lugar, o tipo, grau e natureza da variabilidade das populações devem ser estudados (Wagner & Selander, 1972).

O presente trabalho visa a estudar os vários sistemas gene-enzimáticos das populações naturais de *A. nuneztovari* e *A. darlingi* para que se obtenham dados sobre a genética de seus eletromorfos, freqüências alélicas, grau de heterozigosidade das populações, grau de polimorfismo e proporção de indivíduos heterozigotos, etc. Esperamos que todos estes parâmetros da estrutura genética das populações naturais, forneçam os requisitos necessários para futura comparação das estruturas genéticas dessas populações dentro da distribuição geográfica das espécies, a fim de esclarecer os objetivos citados acima.

Materiais e métodos

A maior parte dos estudos sobre *A. nuneztovari* foi feita com relação à população existente nos limites da cidade de Manaus-Amazonas. As larvas, das várias espécies foram identificadas segundo a chave preparada por "Comunicable Discase Center Atlanta — USA". Algumas larvas foram criadas até pupa e adultos para estudo de determinadas enzimas. A população de Lagoa das Pedras — perto da cidade de Formosa (Goiás), foi usada para comparação com a de Manaus. Para os estudos sobre *A. darlingi*, os adultos foram coletados ao risco humano numa estação de campo do INPA, Manaus, situado a 153 km na Estrada Manaus-Caracarai. As fêmeas coletadas desovaram no laboratório e então se criaram larvas, pupas e adultos. Algumas coleções de larvas foram feitas no campo, no mesmo local de coleta de adultos. As técnicas de zimogramas são as mesmas descritas anteriormente (Galler *et al.*, 1977). Os métodos estatísticos de análise dos dados são os mesmos de outras publicações (Narang *et al.*, 1977a) e Nei, 1972.

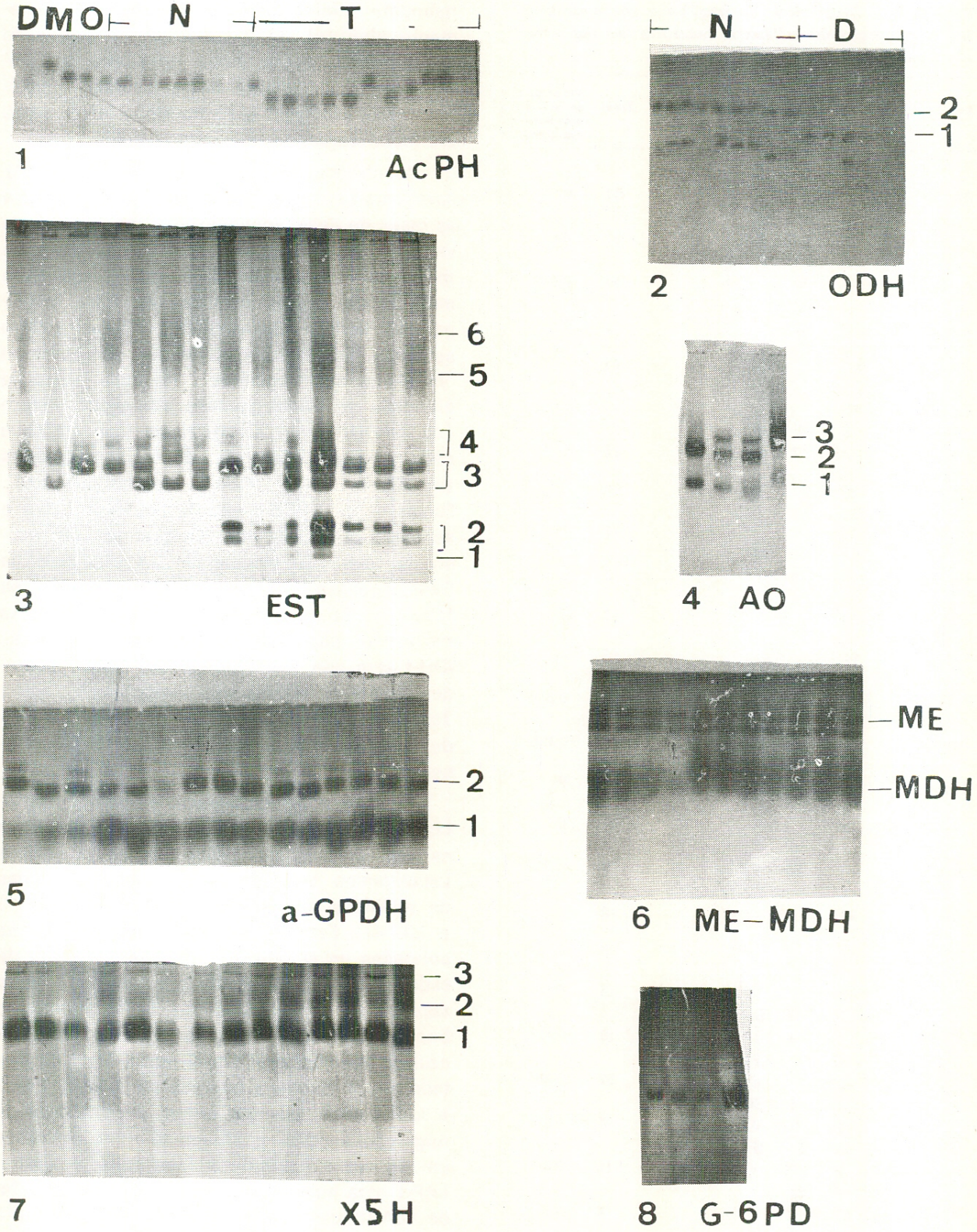
Resultados e discussão

Padrões eletroforéticos e distribuição dos eletromorfos

A): **A. nuneztovari:**

As figuras 1 a 8 e a tabela I mostram os diversos tipos de eletromorfos de vários sistemas gene-enzimáticos encontrados nas populações naturais de *A. nuneztovari*. Das 12 enzimas, com um total de 25 *loci* estudados, 12 *loci* (7 enzimas) são polimórficas (tabelas I e II). A atividade da enzima fosfata e ácida (ACPH) foi registrada em forma de faixa única em todos os estados de desenvolvimento (larva, pupa e adulto) sem qualquer variação na população de Manaus.

Com relação à atividade oxidase aldeído, (AO) na fase larvária, existem 3 zonas. A mais anódica (AO-1) tem baixa atividade e só aparece de modo claro no zimograma revelado após tempo prolongado. Na maioria dos *geis* corados rotineiramente somente faixas de AO-2 e AO-3 juntos podem ser vistos. A causa disso não é muito clara. Pode tratar-se de "null" alelos no *locus* na zona AO-3. É possível que o AO-3 represente uma zona de atividade secundária do enzima principal (AO-2) e então não seria um produto gênico. Ou fi-



P — I — Placa I com figuras 1 a 8 mostra padrões enzimáticos em **A. nuneztovari.** Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc., se referem aos respectivos **locus.** T — **A. triannulatus;** N — **A. nuneztovari;** O — **A. oswaldoi;** D — **A. darlingi;** M — **A. mattogrossensis.**

TABELA I — Distribuição de freqüência dos eletromorfos e proporção de indivíduos heterozigotos por locus **em população natural de** A. nuneztovari.

Locus	Eletromorfos						Total	Proporção de indivíduos heterozigotos
Acph	+							
	50						50	0
Ao-1	S	F	SF					
	2	29	0				31	0
Ao-2	S	I	F	SF				
	1	52	2	1			56	0,018
Ao-3	+	Null						
	13	22					35	0
G-6pdh	+							
	13						13	0
∝ Gpdh-1	+							
	16						16	0
∝ Gpdh-2	S	F	SF					
	2	17	3				22	0,136
GOT	+							
	16						16	0
Idh-1	+							
	12						12	0
Idh-2	S	F	SF					
	7	0	1				8	0,125
Ldh	+							
	13						13	0
Mdh	+							
	14						14	0
ME	S	F	SF					
	1	21	1				23	0,043
Odh-1	S	I	F	SI	IF			
	0	13	1	2	11		27	0,481
Odh-2	+							
	22						22	0
Odh-3	+							
	28						28	0
Xdh-1	S	+						
	1	23					24	0,042
Xdh-2	+							
	12						12	0
Xdh-3	+							
	12						12	0
Est-1	+							
	13						13	0
Est-2	S	I	SI	IF	SF			
	7	1	1	1	9		19	0,579
Est-3	S	I	F	SI	SF	IF		
	12	14	6	4	10	6	52	0,385
Est-4	S	F	SF					
	2	10	4				16	0,25
Est-5	F	SF	IF					
	9	5	1				15	0,40
Est-6	F	SF						
	13	1					14	0,071
Est-7	S	F	SF					
	2	12	2				16	0,125

Número de loci analisados = 26.
Número de enzimas analisadas = 12.
Média da proporção dos indivíduos heterozigotos por locus (excluinlo Odh-2 e Odh-3) = 0.111.

nalmente a faixa de AO-3 representa simplesmente alelo (s) do *locus* AO-2. A discussão em minúcias sobre estas possibilidades encontra-se mais adiante neste trabalho. Entretanto, nas tabelas I e II, tratamos AO-3 como um *locus* separado com alelos nulos.

Desidrogenase glicose-6-fosfato (G-6PD) apresenta-se como uma faixa nítida em todas as fases de desenvolvimento do mosquito, sem variações ontogenéticas. Em alguns zimogramas, com revelação prolongada, aparecem mais faixas menos anódicas da faixa principal com baixíssimas atividade. Não está claro se estas representam atividades do G-6PD ou "nenhuma desidrogenase". Há duas zonas de atividade da Desidrogenase alfa-glicerofosfato (∝ -GPDH-1 e ∝ -GPDH-2) na fase adulta e cada zona sob controle de *locus* separados (∝ -Gpdh-1 e ∝ -Ppdh-2, respectivamente). Faixas de ∝ -GPDH-1 são de atividade baixa e só estão presentes nos zimogramas com tempo de revelação prolongado. A atividade da Desidrogenase isocitóica (IDH) é ausente na fase larvária e apresenta-se com uma só faixa na fase de pupa (IDH-1 e IDH-2) nos adultos. IDH-1 tem alta atividade e suas faixas aparecem bastante nítidas nos zimogramas. IDH-2 (catódico em relação a IDH-1) possui atividade relativamente menor e é polimórfica (tabela I).

A enzima Transaminase glutâmica oxalacetato (GOT) apresenta-se com uma só faixa na fase larvária, sem polimorfismo. A enzima Leucil-amino eptidade (LAP) mostra 4 zonas de atividade nas larvas (LAP-1, LAP-2, LAP-3 e LAP-4). Estudos das progênies de fêmeas coletadas no campo indicam que as faixas de cada zona são controladas por *genes* de *locus* separados. A atividade de LAP-1 mostra-se bem anódica logo atrás da linha do indicador azul de Bromophenol LAP-2 migra mais da metade que a distância migrada por LAP-1. LAP-3 e LAP-4 estão em sua ordem descendente de migração anódica e situam-se mais próximos um do outro. Durante a fase pupal e adulta, LAP-1 está ausente ou com baixíssima atividade. LAP-2 da fase larvária não está presente nas pupas nem em adultos. Existe uma outra zona chamada LAP-2 PA específica de pupas e adultos que que se situa um pouco catódica em relação ao LAP-2 das larvas. LAP-3 e LAP-4

TABELA II — Freqüência gênica, proporção de heterozigosidade de genoma, proporção de heterozigosidade máxima e proporção de loci polimórfico em população natural de A. nuneztovari.

Locus	Alelo	Freqüência	Proporção de heterozigosidade	Heterozigosidade máxima	**Locus** polimórfico Critério I*	Critério II**
Acph	+	1,00	0	0	—	—
	S	0,065				
Ao-1	F	0,935	0,122	0,50	+	+
	S	0,027				
	I	0,928				
Ao-2	F	0,045	0,136	0,667	+	+
	+	0,371				
Ao-3	Null	0,629	0,467	0,50	+	+
G-6PD	+	1,00	0	0	—	—
∝ Gpdh-1	+	1,00	0	0	—	—
	S	0,159				
∝ Gpdh-2	F	0,841	0,267	0,50	+	+
Got	+	1,00	0	0	—	—
Idh-1	+	1,00	0	0	—	—
	S	0,875				
Idh-2	F	0,125	0,219	0,50	+	+
Ldh	+	1,00	0	0	—	—
Mdh	+	1,00	0	0	—	—
	S	0,065				
Me	F	0,935	0,125	0,50	+	+
	S	0,037				
	I	0,722				
Odh-1	F	0,241	0,419	0,667	+	+
Odh-2	+	1,00	0	0	—	—
Odh-3	+	1,00	0	0	—	—
	S	0,958				
Xdh-1	F	0,042	0,080	0,50	—	+
Xdh-2	+	1,00	0	0	—	—
Xdh-3	+	1,00	0	0	—	—
Est-1	+	1,00	0	0	—	—
	S	0,632				
	I	0,105				
Est-2	F	0,263	0,520	0,667	+	+
	S	0,365				
	I	0,365				
Est-3	F	0,270	0,661	0,667	+	+
	S	0,25				
Est-4	F	0,75	0,375	0,5	+	+
	S	0,167				
	I	0,033				
Est-5	F	0,800	0,331	0,667	+	+
	S	0,036				
Est-6	F	0,964	0,069	0,5	—	+
	S	0,187				
Est-7	F	0,813	0,304	0,5	+	+

— = o locus não é polimórfico.
+ = o locus é polimórfico.
(*) — Critério I = o locus é polimórfico quando o alelo mais comum tem a freqüência igual ou menos de 0,95.
(**) — Critério II = o locus é polimórfico quando o segundo alelo mais comum tem a freqüência não menor de 0,01.
Média proporção do genoma heterozigoto por indivíduo (excluindo o locus Odh-2 e Odh-3) :-0,171.,
Média porporção de heterozigosidade máxima (excluindo Odh-2 e Odh-3) :-0,326.
Proporção do loci polimórfico (critério 1) : 0,46.
Proporção do loci polimórfico (critério 2) : 0,54.

da fase larvária estão presentes nas pupas e adultos, embora com atividades bem reduzidas. Além destas, foram observadas zonas de LAP com atividade bem fraca e que se localizam mais catódicas com relação ao LAP-4. Por falta de dados suficientes, os eletromorfos da enzima LAP não foram incluídos nas tabelas I e II.

Todos os estádios do mosquito (larva, pupa, adulto) possuem uma faixa nítida de atividade da enzima málica (ME). Além desta, as pupas e os adultos tem uma segunda zona de baixa atividade e com migração anódica mínima, que, portanto se situa perto da origem da migração das amostras no zimograma. Dois alelos (S e F) foram encontrados durante estudos da progenia das fêmeas coletadas no campo, nas quais todos F_1 possuiam dupla faixa na zona ME-1 (Fig. 6.). A desidrogenase málica (MDH) pode ser estudada juntamente com a ME no mesmo zimograma ao acrescentar-se mais NAD (DPN). As faixas de MDH aparecem mais anódicas do que as de ME. Estudos preliminares indicam mudanças durante o desenvolvimento. Os adultos têm eletromorfos diferentes de larvas e pupas, sendo que os primeiros migram menos que os últimos em relação ao anodo.

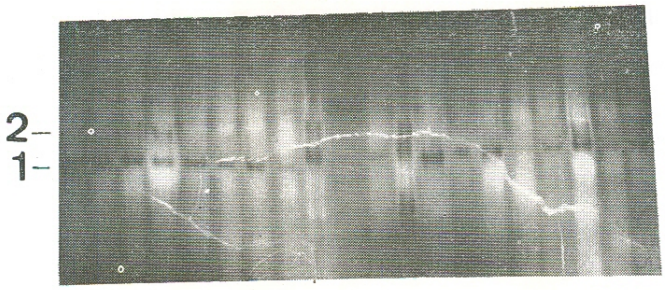
Há 3 zonas de atividade de desidrogenase octanólica (ODH). A zona mais anódica é polimórfica e apresenta três alelos distribuídos em todos os tipos de eletromorfos (tabela I e II). ODM-2 e ODH-3 em ordem decrescente de migração, em relação ao lado do anodo, são monomórficos de atividade baixíssima. ODH-3 localiza-se bem perto da origem das amostras e apresenta faixa dupla bem próxima nas larvas e faixa tripla, com faixas de mesma intensidade, nas pupas e adultos. Entretanto, não é em todos os zimogramas que a zona de ODH-3 aparece com nitidez. A atividade da Xantino desidrogenase (XDH) nas larvas possui 3 zonas: XDH-1, XDH-3 e XDH-3 em sua ordem decrescente de migração em relação ao anodo. XDH-1, XDH-2 e XDH-3 designam os *locus* Xdh-2 e Xdh-3, respectivamente. Somente as faixas correspondentes ao XDH-1 são mais nítidas em cada zimograma. Eletromorfos de Xdh-3 migram pouquíssimo para o lado do anodo, mas são polimórficos. De modo geral, a penetração e a expressão gênica dos *locus* Xdh-2 e Xdh-3 é fraca e variável.

Esterase apresenta o maior número de zonas de atividade. Estas podem ser divididas em 3 grupos, segundo sua migração relativa (Rf.). O primeiro grupo (A) possui faixas mais escuras e nítidas, correspondendo ao *locus* Est-1 e Est-2. O segundo grupo apresenta um mínimo de 2 e um máximo de 4 faixas de atividade (grupo B). Estudos genéticos confirmam que estas faixas do grupo B estão sob controle de genes (freqüentemente com migração relativa superposta em algumas regiões) correspondendo aos *loci* Est-3 e Est-4. As faixas do último *locus* possuem menor atividade que Est-3. O terceiro grupo (C) apresenta de 4 a 5 faixas e estão sob controle de 3 *loci* Est-5, Est-6 e Est-7. Todos esses possuem atividade baixa e só Est-5 e Est-6 podem ser estudados em zimogramas com revelação prolongada.

B) — **A. darlingi** :

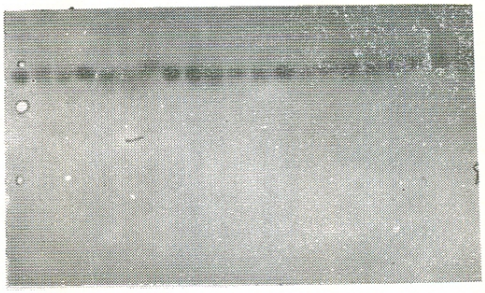
Figuras 9 a 14 e tabelas III e IV demonstram a distribuição de eletromorfos e freqüência alélica dos vários sistemas gene-enzimáticos. ACPH apresenta um só *locus* com 3 alelos. O quadro geral de AO, G-6PD, ME, XDH, ODH, LAP é semelhante ao do *A. nuneztovari*. Em *A. darlingi* XDH-2 é mais proeminente. XDH-1 e XDH-3 não foram incluídos nos resultados uma vez que estes sistemas apresentam baixíssima atividade e os resultados não são confiáveis. α-GPDH só possui uma zona com um só *locus* chamado α-Gpdh-1. As larvas e adultos tem uma zona nítida de atividade desidrogenase lática correspondente ao *locus* Ldh-2. Além disso, ocorre nos adultos uma segunda zona LDH-1, anódica ao LDH-2. Este enzima é monomórfico na população estudada. O padrão Esterase é relativamente complicado com muitas zonas de atividade. Estudos da herança confirmam que há 6 *loci* ativos em ambos, adultos e larvas (Fig. 3) Est-2 e 4 são muito mais nítidos em adultos, enquanto que Est-1 e Est-2 têm alta atividade em larvas.

As Tabelas I e II mostram que, de acordo com o primeiro e segundo critério, a percentagem de *loci* polimórficos em população natural de *A. nuneztovari*, é 46 e 54, respectiva-

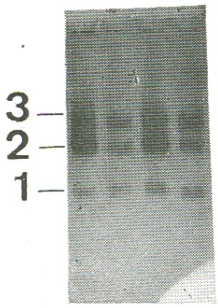


9 G-6PD

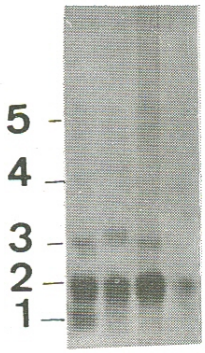
10 ME-MDH



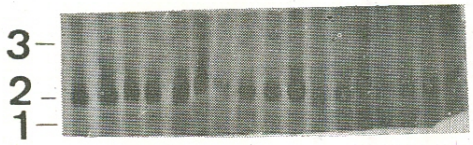
11 a-GPDH



12 AO



13 EST



14 XDH

P — II — Placa II com figuras 9 a 14 mostra zomogramas das respectivas enzimas de **A. darlingi**. Os números se referem ao número de **locus**.

TABELA III — Distribuição de freqüência dos eletromorfos e proporção de indivíduos heterozigotos por locus em população natural de A. darlingi.

Locus	Eletromorfos	Total	Proporção de indivíduos heterozigotos
Acph	S F IF 3 14 2	19	0,105
Ao-2	+ 23	23	0
Ao-3	S I F 2 18 3	23	0
G-6PD	S F 1 19	20	0
∝ Gpdh-1	S F 1 16	17	0
∝ Gpdh-2	+ 56	56	0
Got	+ 10	10	0
Ldh-2	+ 11	11	0
Mdh	+ 21	21	0
Me	S F 1 28	29	0
Odh-1	+ 31	31	0
Odh-2	I F SF 20 1 1	22	0,045
Xdh-2	+ 30	30	0
Est-1L	S F SF IF 25 5 4 2	36	0,167
Est-2L	S I F SI SF IF SF 13 1 11 2 13 2 2	44	0,432
Est-3L (Est-2A)	S I F SI SF IF 3 23 0 13 4 9	52	0,50
Est-4 LA	S F SF 2 25 3	30	0,10
Est-1A	S I F SI SF 3 2 0 3 6	14	0,643
Est-3A	S I F IF 2 1 6 3	12	0,25

L = Presente em larva
A = Presente em adultos.
LA = Presente em larvas e adultos.
Número de loci analisados = 19.
Número de sistemas gene-enzimáticos estudados = 11.
Média da proporção dos indivíduos heterozigotos por locus = 0,125.

TABELA IV — Freqüência gênica, proporção de heterozigosidade de genoma, proporção de heterozigosidade máxima, e proporção de loci polimórfico em população natural de A. darlingi.

Locus	Alelo	Freqüência	Proporção de heterozigosidade	Heterozigosidade máxima	Locus polimórfico Critério I	Locus polimórfico Critério II
Acph	S	0,158	0,349	0,667	+	+
	I	0,053				
	F	0,789				
Ao-2	+	1,00	0	0	—	—
Ao-3	S	0,087	0,362	0,667	+	+
	I	0,783				
	F	0,130				
∝ Gpdh-1	S	0,059	0,111	0,50	+	+
	F	0,941				
∝ Gpdh-2	+	1,00	0	0	—	—
G-6PD	S	0,05	0,095	0,5	+	+
	F	0,95				
Got	+	1,00	0	0	—	—
Ldh-2	+	1,00	0	0	—	—
Mdh	+	1,00	0	0	—	—
Me	S	0,034	0,066	0,5	—	+
	F	0,966				
Odh-1	+	1,00	0	0	—	—
Odh-2	S	0,023	0,168	0,667	+	+
	I	0,909				
	F	0,068				
Xdh-2	+	1,00	0	0	—	—
Est-1L	S	0,750	0,387	0,667	+	+
	I	0,028				
	F	0,222				
Est-2L	S	0,023	0,572	0,75	+	+
	S	0,466				
	I	0,068				
	F	0,443				
Est-3L (Est-2A)	S	0,221	0,508	0,667	+	+
	I	0,654				
	F	0,125				
Est-4LA	S	0,117	0,207	0,5	+	+
	F	0,883				
Est-1A	S	0,536	0,604	0,667	+	+
	I	0,250				
	F	0,214				
Est-3A	S	0,167	0,538	0,667	+	+
	I	0,208				
	F	0,625				

O significado do +, —, critério I e II, são os mesmos descritos no final da tabela II.

Média proporção do genoma heterozigoto por indivíduos = 0,210 Proporção de loci polimórfico (critério I) = 0,579

Média proporção de heterozigosidade máxima = 0,390 Proporção de loci polimórfico (criterio II) = 0,632

TABELA V — Distribuição de freqüência de eletromorfos em três espécies e sua homologia genética à loci individuais.

Acph							Homologia genética	
Espécies	1	2	3	4	2/3	Total	Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	32	0	0	0	0	32	0	0,978
Nun.	0	50	0	0	0	50		
Dar.	0	14	0	3	2	19		

Ao-1				Homologia genética	
Espécies	Tipo Nun.	Tipo Dar.	Total	Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	—	—	—	0	0
Nun.	+	—	—		
Dar.	—	+	—		

Ao-2				Homologia genética	
Espécies	Tipo Nun.	Tipo Dar.	Total	Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Dar.	—	+	—	1,00	0
Aq.	+	—	—		
Nun.	—	+	—		

Ao-3				Homologia genética	
Espécies	Tipo Nun.	Tipo Dar.	Total	Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	—	—	—	0	0
Nun.	+	—	—		
Dar.	—	+	—		

G-6pd				Homologia genética	
Espécies	1	2	Total	Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	—	—	—	—	0,052
Nun.	0	13	13		
Dar.	19	1	20		

∝ Gpdh-2					Homologia genética	
Espécies	1	2	1/2	Total	Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	37	0	0	37	1,00	
Nun.	17	2	3	22		
Dar.	56	0	0	56		

TABELA V (continuação)

Got			Total	Homologia genética	
Espécies	1	2		Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	0	16	16	0	1,00
Nun.	16	0	16		
Dar.	10	0	10		

Ldh (Lhd-2 Dar.)			Total	Homologia genética	
Espécies	1	2		Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	—	—	—	—	0
Nun.	0	13	13		
Dar.	11	0	11		

Me					Total	Homologia genética	
Espécies	1	2	3	1/3		Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	—	—	—	—	—	—	0,963
Nun.	21	0	1	1	23		
Dar.	28	1	0	0	29		

Odh-1							Total	Homologia genética	
Espécies	1	2	3	4	2/4	1/2		Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	0	0	22	0	0	0	22	1,00	
Nun	1	13	0	0	2	11	27		
Dar.	0	0	31	0	0	0	31		

Xdh-1					Total	Homologia genética	
Espécies	1	2	3	1/3		Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	0	13	2	0	15	0,996	0,994
Nun.	0	23	1	0	24		
Dar.	0	20	1	1	22		

Xdh-2			Total	Homologia genética	
Espécies	1	2		Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	41	2	43	1,00	0,999
Nun.	12	0	12		
Dar.	30	1	31		

TABELA V (continuação)

Est. Zona A (Est-1 do Aq.)			Homologia genética	
Espécies	Tipo Aq.	Total	Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	+	—		
Nun.	—	—	0	—
Dar.	—	—		

Est. Zona B (Est.2-Aq. Est.1 Dar. e Est-1 Nun.)								Homologia genética	
Espécies	1	2	3	1/2	1/3	2/3	Total	Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	33	0	9	0	127	0	169		
Nun.	0	0	13	0	0	0	13	0,802	0,548
Dar.	5	0	25	2	4	0	36		

Est. Zona B (Est-2 do Dar., Est-2 do Nun.)											Homologia genética	
Espécies	1	2	3	4	2/3	1/3	1/4	3/4	2/4	Total	Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Nun.	0	0	1	7	0	1	9	1	0	19	0	0,689
Dar.	0	11	1	13	2	0	0	2	13	42		

Est. Zona C (Est-3 do Aq. Est-3 do Dar. e Est-3 do Nun.)											Homologia genética	
Espécies	1	2	3	4	1/3	1/4	3/4	2/4	2/3	Total	Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Nun.	6	0	14	12	6	10	4	0	0	52	0	0,781
Dar.	0	0	23	3	0	0	13	4	9	52		

Est. Zona D (Est-5 do Aq. Adulto e Est-5 do Dar. larva e adulto)								Homologia genética	
Espécies	1	2	3	1/2	1/3	2/3	Total	Dar. - Aq.	Dar. - Nun.
Aq.	0	154	0	1	0	12	167		
Nun.	0	0	0	0	0	0	0	0,321	0
Dar.	0	4	23	0	0	8	35		

OBSERVAÇÕES — I^- Dar.-Aq. = 0,51%; D^- Dar.-Nun. = 0,673

(1) — I^- Dar.-Aq. = 0,49%; D^- Dar.-Nun. = 0,713

(2) — Uma vez que os dados de homologia de alelos do locidas esterases podem ser tendenciosos e se nós calcularmos I^- e D^- sem usar esterases, os valores são os seguintes:

I^- Dar.-Aq = 0,624; D^- Dar.-Nun. = 0,471

I^- Dar.-Aq. = 0,497; D^- Dar.-Nun. = 0,699

mente. A proporção dos indivíduos heterozigotos em vários *loci* se encontra também na tabela I, e a percentagem média é 11,1. De modo geral, a maior proporção de indivíduos são heterozigotos nos *loci* esteráticos. A tabela II apresenta resultados sobre a freqüência alélica, a proporção esperada de heterozigosidade do genoma a cada *locus*, segundo a regra de Hardy e Weinberg, juntamente com heterozigosidade máxima para cada *locus*.

No final da tabela II, encontram-se os valores médios de cada um destes parâmetros de estrutura genética da população natural de *A. nuneztovari*. Considerando os 26 *loci*, a proporção média do genoma de cada mosquito desta população que pode ser esperada em condições de heterozigosidade é 0,171. Portanto, somente 17,1% do genoma é variável nesta população. Do mesmo modo, todos os dados respectivos sobre estrutura genética do *A. darlingi* se encontram nas tabelas III e IV. A média da proporção dos indivíduos heterozigotos é 0,125. A proporção de *loci* polimórficos (critério I) 0,579 e (critério II) 0,632; 21% do genoma de cada indivíduo de *A. darlingi* pode estar em condição heterozigótica. A tabela V mostra que o grau de homologia do *A. aquasalis* e *A. nuneztovari* é 0,624% e 0,51%, excluindo os dados de esterases que na nossa opinião podem dar homologia genética tendenciosa. Os cuidados no uso da técnica de zimograma nos estudos comparativos de genomas, podem ser encontrados em publicações de Hubby & Lewontin (1966), Lewontin & Hubby (1966), Wagner & Selander (1972); os estudos minuciosos sobre base genética de várias zonas de atividades esteráticas nas espécies anofelinas do subgênero *Nyssorhynchus*, pela técnica de eletroforese, isoeletrofocalização e outros parâmetros físico-químicos tais como reações com diversos substratos inibidores e termostabilidade e, possivelmente, sua propriedade imunológica, estão sendo desenvolvidos para interpretação mais objetiva deste tipo de trabalho sobre genética de populações

Nosso trabalho sobre homologia genética entre as três espécies confirmam os trabalhos citogenéticos anteriores (Kreutzer *et al.*, 1972 e 1976).

Agradecimentos

Nossos agradecimentos ao Prof. Dr. Antônio R. Cordeiro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), por ceder-nos seu laboratório e ainda pelas sugestões apresentadas. Agradecemos também ao Prof. Dr. Warwick E. Kerr, Diretor do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pelas facilidades oferecidas em termos de transporte, laboratório e trabalho de campo durante nossa estada em Manaus; e Dra. Joselita Maria dos Santos (INPA), pelo apoio geral e sugestões. Agradecimentos especiais à SUCAN, do Ministério da Saúde, representada pelo Dr. Agostinho Marques, Dr. Ednaldo A. Pinheiro e Dr. Higino da S. G. Gil, referente ao apoio prestado nos trabalhos de campo.

Somos gratos à Srta. Marina de Lourde Fonseca pela assistência técnica e ao Sr. Nestor Lima pelas fotografias.

Summary

Genetic variation at 26 loci in a natural population of **A. nuneztovari** and 19 loci of **A. darlingi**, have been studied by zymogram techniques. Average proportions of polymorphic loci, heterozygous individuals per locus and heterozygosity of individual genomes are 0,54, 0,111 and 0,171 in **A. nuneztovari** and 0,632, 0,125 and 0,21 in **A. darlingi** respectively. The degree of genetic variability in each species varies from locus to locus. In general esterases are far more polymorphic than dehydrogenases. **A. darlingi** has more genetic identity with **A. aquasalis** (I = 0,624) tham with **A. nuneztovari** (I = 0,479).

Bibliografia

Galler, R.; Narang, S. & Narang, N.
1977 — Eletroforese em gel de acrilamida: Técnicas de zimograma de 27 sistemas gene-enzimáticas adotados para anofelinos (Subgêneros **Nyssorhynchus** and **Kerteszia**) e **Culex** (Diptera : Culicidae). **Acta Amazonica** (enviado para publicação).

Galvão, A.L.A. & Damasceno, R.G.
1944 — Observações sobre anofelinos do complexo **albitarsis** (Diptera : Culicidae). **Ann. Fac.** São Paulo, 20: 73-87.

Hubby, J.L. & Lewontin, R.C.
1966 — A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations.

I. The number of alleles at different loci in **Drosophila pseudoobscura. Genetics**, 54: 577-594.

KREUTZER, R.D.; KITZMILLER, J.B. & FERREIRA, E.
1972 — Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of **Anopheles darlingi** root. **Mosquito News**, vol. 32: 555-556.

KREUTZER, R.D.; KITZMILLER, J.B. & RABBANI, M.G.
1976 — Cytogenetically distinguishable sympatric and allopatric populations or **Anopheles albitarsis. Acta Amazonica**, 6: 473-481.

LEWONTIN, R.C. & HUBBY, J.L.
1966 — A molecular aproach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variatio and degree of heterozygosity in natural populations of **Drosophila pseudoobscura. Genetics** 54:595-609.

NARANG, S.; KITZMILLER, J.B.; COSTALONGA, M.S. & IGLESIAS, R.
1977a— Genética de populações natural de **Anopheles aquasalis** e correlações entre outras espécies do subgênero Nyssorhynchus **(Diptera : Culicidae).**

NARANG, S.; KITZMILLER, J.B.; SASAKI, J.I.; SASAKI, C.M. GALLER, R.
1977b— Population genetics of anophelines. I. Preliminary studies on genetic relationship between natural populations of **A. albitarsis** of B_1 type chromosomes. **Biochem. Genet.** (Enviado para publicação).

NARANG, S.; KITZMILLER, J.B.; YOSHIDA, N.; SILVA, A.A. & CRISTAKOU, H.D.
1977c— Population genetics of anophelines. II. Electrophoretic analysis of relationchips among three populations of A. argyritarsis. **Biochem. Genet.** (Enviado para publicação).

NEI, M.
1972 — Genetic distance between populations. Amer. Nature, 106: 283-292.

WAGNER, R.P. & SELANDER, R.K.
1972 — Isoenzymes in insects and their significance. **Ann. Rev. Entomol.** 19: 117-138.

(Aceito para publicação em 15/01/79)