Lilian Madi-Ravazzi

Estudo da Diferenciação entre Isolinhagens da Superespécie Drosophila Serido, com Base em Aspectos Reprodutivos e Citogenéticos

unesp

1910000624

LILIAN MADI-RAVAZZI

ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO ENTRE ISOLINHAGENS DA SUPERESPÉCIE *Drosophila serido*, COM BASE EM ASPECTOS REPRODUTIVOS E CITOGENÉTICOS.

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

624/93

São José do Rio Preto

1992

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Orientadora: Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Aos meus Pais,
Adibo e Alice

Ao meu esposo,
José Martinho

E filhos,
Henrique, Gustavo
e Sabrina

"forças propulsoras
da minha vida"

dedico.

...porque tudo na vida reflete um ato de amor do Pai a seus filhos e neles Ele deposita a sua confiança e esperança para um amanhã de paz e luz.

...o barro sofre a quentura da fornalha para transformar-se na argila produtiva.

...o carvão espera a ação do tempo para torna-se precioso brilhante.

...a madeira suporta as rajadas do machado a fim de formar estruturas úteis.

...o homen para burilar-se necessita de experiências que coloquem a prova o seu potencial de espírito eterno.

AGRADECIMENTOS

Ao término desse trabalho, gostaria de expressar a minha gratidão as pessoas que, direta ou indiretamente, participaram na sua realização.

A Professora Hermione E.M.C. Bicudo, orientadora, mestre e amiga, sem a qual o fruto desse trabalho não teria o mesmo gosto. Agradeço, de coração, esses dez anos de convivência e aprendizado.

Aos Professores do Departamento de Biologia, pelo apoio e incentivo constantes desde 1982, quando iniciei nesse Departamento, o estágio de Iniciação Científica, na área da Genética de **Drosophila**, que despertou em mim o interesse pela pesquisa.

Em especial aos Professores: Adelina Buzini da Costa e Silva, Celso Abbade Mourão (**in memorian**), Claúdia Márcia Carareto, Eliana Morielle Versute (Departamento de Zoologia), Maria Astride Saad Corradi, Maria Tercília V.A. Oliveira, Marileila Varella Garcia, Marlene K. Hosaki Kobayashi , Wlademir João Tadei e Marina Colemann (Departamento de Botânica).

Aos Professores Claúdia Márcia Carareto, Fábio de Melo Sene, João Stenghel Morgante e Maria Augusta Q. Pereira, pela análise criteriosa da pro forma e sugestões importantes que muito contribuíram para a melhoria da forma definitiva dessa Tese.

Ao Professor Antônio José Manzatto, do Departamento de Ciências da Computação e Estatística, deste Instituto, pela colaboração significativa na análise estatística.

Ao Professor James R. Colemann, do Departamento de Botânica, deste Instituto, pela revisão cuidadosa do Summary.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, deste Instituto, pela troca de sugestões, solidariedade nos momentos difíceis e na horas alegres. Em especial aos pós-graduandos: Alba de Abreu Lima Catelani, Ana Maria Alves de Oliveira, Ana Sílvia Lapenta, Cibele Rocha A. Banhos, Elza Vetorrazi, Fádua Rosana Coelho Hittz, Marcelo Ferreira Lourenço, Mary Matsumi Itoyama, Sheila Adami Vaygo e Sirlei Branco.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, Josué Rodrigues dos Santos, Laura Nascimento Pinheiros, Olga Brizotti Pelicer, Paulo Antônio Mazieiro, Rosana Selestino de Souza, Sebastião Dias Barbosa e Simone Carvalho Fernandes, pela colaboração na parte técnica desse trabalho.

Às senhoras Palmira G. Gonçalvez e Bernadete D. Tevisan, responsáveis pela limpeza do ambiente.

Aos funcionários do Laboratório de Computação, Getúlio A. Salinas, Guilherme Dworak e Romildo O. Rodrigues.

Às senhoras Nancy Q. A. Pereira, Onilda A. Oliveira Akazaki e Rosangela Simonato, do setor de Pós-Graduação, pela atenção e disponibilidade com que sempre nos atendeu.

Aos funcionários da biblioteca, em especial, Maria Helena Lima, Maria do Carmo Junqueira, Olinda Vacari Luchesi, Wilse T.B. Azevedo Soares e Gislaine Gameiro, pela gentileza e prontidão dos pedidos solicitados.

À direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UNESP, pela disposição das condições materiais para a execução desse trabalho.

Aos meus irmãos Leila, Eliana e Paulo; sogros, Gercy e Therezinha; cunhados, Mônica, Délcero, Kelvin, Vanessa, Marco, Dirce e Inocêncio pelo incentivo constante.

A ti Senhor, Deus Pai, pela oportunidade da vida, pela saúde física e mental, que proporcionou a concretização desse estudo.

"Pela infinita Misericórdia com que nos ensinas a encontrar os caminhos da conciliação;

Pelas possibilidades que nos forneces para sustentar o silêncio quando o silêncio se faça preciso;

Pela palavra justa com que nos inspiras a tratar dos assuntos alusivos ao nosso aperfeiçoamento espiritual;

Pelo convite reiterado à paciência e à tolerância que nos envias através dos companheiros que nos partilham a experiência;

E pelo endereço da paz que nos fazes descobrir, por dentro de nós próprios;

Obrigado, Deus!"

(Petição do Servidor, Emmanuel)

I. INTRODUÇÃO

Para Sewall Wrigth (1940), "O primeiro passo na aplicação da genética ao problema da especiação é indubitavelmente a descoberta da natureza real das diferenças genéticas entre sub-espécies relacionadas... . Diferenças que tendem a impedir os cruzamentos são obviamente as que melhor poderão esclarecer o processo da especiação".

De acordo com Mayr (1970), "espécies são grupos de populações naturais potencialmente intercruzantes, reprodutivamente isolados de outros grupos de populações com as mesmas características". Embora esse conceito de espécie seja de ampla aceitação entre os pesquisadores, ainda hoje, permanece como uma das questões mais significativas e não resolvidas da biologia evolutiva, a maneira pela qual as espécies são formadas e também o tipo e a magnitude das diferenças genéticas que caracterizam a formação das espécies.

É aceito entre os evolucionistas que populações geograficamente separadas podem diferenciar-se geneticamente, como resultado de sua adaptação às condições ambientais locais. Se duas populações que têm estado isoladas geograficamente por certo tempo, entram novamente em contato, entre outras, duas situações podem ocorrer: elas poderão fundir-se em uma só população, intercruzando-se, ou, se converterem em duas espécies diferentes, reforçando o isolamento reprodutivo entre elas.

O isolamento reprodutivo ocorre devido a vários mecanismos denominados mecanismos de isolamento, para os quais existem várias classificações (Dobzhansky, 1937, 1973; Mayr, 1970;

Merrel, 1981).

Merrel (1981), por exemplo, distingue três grupos desses mecanismos. Um deles refere-se aos mecanismos pré-acasalamento e pré-zigóticos que abrangem, isolamento ecológico ou de habitat, isolamento sazonal ou temporal e isolamento etológico ou sexual. Outro grupo, inclue os mecanismos pós-acasalamento, mas pré-zigóticos, que abrangem, isolamento estrutural, mecânico ou morfológico e incompatibilidade gamética. O terceiro grupo é composto dos mecanismos pós-acasalamento e pós-zigóticos que abrangem, inviabilidade, esterilidade e degeneração do híbrido.

As populações de espécies diferentes estão isoladas, em geral, por mais de um tipo de mecanismo de isolamento reprodutivo, de modo que cada um dos mecanismos proporciona um isolamento parcial e o efeito combinado de todos eles acaba por impedir o intercâmbio gênico entre duas populações (Merrel, 1981).

O desenvolvimento do isolamento reprodutivo é uma das etapas ou a parte mais importante do processo de especiação.

Várias hipóteses têm sido levantadas para a explicação da origem do isolamento reprodutivo. A idéia mais aceita é que os mecanismos de isolamento surgem como um "subproduto incidental da reconstituição genética em populações isoladas, que ocorre em resposta ao evento do fundador e adaptação ao ambiente local" (Mayr, 1963).

Mayr (1963,1970,1982) enfatizou que a especiação resulta usualmente da "revolução genética" gerada pelo efeito do fundador. Uma população isolada, pequena em número e na sua extensão geográfica, coloniza uma nova área. Mudanças por pressão da seleção

e deriva genética resultam em uma substituição rápida de muitos genes para uma nova combinação coadaptada, a qual é reprodutivamente isolada da população ancestral.

Mayr considera a redução na quantidade de variação genética como o efeito mais importante do evento do fundador. Ele argumenta que, as forças seletivas alteradas pelo aumento da homozigoze podem afetar todos os loci de uma única vez, desestabilizando antigos complexos gênicos coadaptados. Deste modo, a especiação surgiria como consequência da aquisição de novos complexos gênicos coadaptados.

Carson (1975) e Templeton (1980) propõem modelos semelhantes. Carson (1975) sugeriu a existência de dois sistemas de variabilidade genética para espécies diplóides: o sistema aberto e o sistema fechado. O sistema aberto consiste de locos gênicos polimórficos que recombinam livremente, sem efeitos drásticos na viabilidade. Constituem exemplos a variabilidade eletroforética, poligênica, clinal e subespecífica. O sistema fechado consiste de blocos de genes que formam complexos gênicos internamente balanceados, coadaptados, com ou sem a presença de inversões como mecanismo estabilizador. Quando a seleção natural é relaxada, como durante um ciclo populacional "flush-crash-founder", os equilíbrios coadaptados do sistema fechado podem tornar-se desorganizados e um ou mais indivíduos diferentes podem sobreviver. O autor propõe que a especiação pode ocorrer pela ação da seleção, sobre o sistema genético perturbado, na organização de novos sistemas fechados coadaptados, que podem vir a caracterizar novas espécies.

Templeton (1980) sugere que o desenvolvimento do

isolamento reprodutivo evolue antes por mudanças em alguns dos principais loci, seguidas por coadaptação dos loci modificados, do que através de uma única "revolução genética".

Um outro modelo, baseado no efeito do fundador, foi proposto por Kaneshiro (1976,1980). Este autor sugere que populações originadas a partir de pequeno número de indivíduos, poderiam apresentar alterações no seu padrão de corte, devido a perda de parte da variabilidade genética da população ancestral. Os machos da população derivada não seriam reconhecidos pelas fêmeas da população ancestral por apresentarem uma corte "incompleta", o mesmo não acontecendo com as fêmeas das populações derivadas em relação aos machos ancestrais, que apresentariam uma corte mais "completa". Assim, os machos das populações derivadas não seriam aceitos pelas fêmeas da população ancestral, enquanto os machos da população ancestral o seriam, pelas fêmeas das populações derivadas. Esta teoria tem estimulado muita discussão (por exemplo, Gidding & Templeton, 1983), bem como o aparecimento de teorias opostas (Watanabe & Kawanishi, 1979; Wasserman & Koepfer, 1980).

Templeton (1981) dividiu a genética da diferenciação específica em três arquiteturas básicas: O tipo I que inclue diferenças causados por muitos genes de efeitos pequenos, o tipo II que inclue diferenças causadas por um ou poucos genes principais e muitos modificadores epistásticos e o tipo III que inclue diferenças causadas por um ou dois loci principais.

Templeton sugere que diferentes tipos de especiação mostram diferentes probabilidades de envolvimentos dessas arquiteturas e, embora muitos estudos tenham encontrado todos os

tipos de arquiteturas genéticas, a maioria deles são do tipo I e II. Existe pouca indicação de que diferenças morfológicas sejam devidas a um ou dois loci de efeitos importantes (Coyne, 1983).

O estudo da base genética do isolamento reprodutivo pode esclarecer o processo da especiação. Tal análise pode revelar se o isolamento entre espécies intimamente relacionadas resulta da divergência em um ou poucos loci, como sugerido, por Gould (1980) ou se muitos genes estão envolvidos. Esses estudos podem também determinar se alguns cromossomos tendem a divergir mais rapidamente do que outros e assim ter um papel maior na especiação.

O estudo clássico de Dobzhansky (1936), sobre a esterilidade de machos híbridos descendentes dos cruzamentos entre as espécies crípticas **D. pseudoobscura** e **D. persimilis**, indica que a esterilidade é determinada por interações de fatores localizados no cromossomo X com fatores localizados nos autossomos, e que a fertilidade dos machos híbridos destas espécies aumenta com o número de autossomos que são coespecíficos com o cromossomo X. Este trabalho mostra, também, que o cromossomo Y não está relacionado com a esterilidade dos híbridos entre essas duas espécies.

O trabalho de Orr (1987) faz uma reanálise experimental da esterilidade dos hibrídos entre **D. pseudoobscura** e **D. persimilis.** Este autor avaliou a fertilidade dos machos pela produção de espermas móveis e os seus resultados se assemelham aos de Dobzhansky (1936), de muitos modos. Primeiro, os quatro cromossomos maiores afetam a fertilidade dos machos híbridos de **D. pseudoobscura** e **D. persimilis.** Dobzhansky (1936), similarmente, mostrou que todos os segmentos cromossômicos marcadores afetavam o tamanho do

testículo dos hibrídos. Segundo, ambas as análises mostraram que o cromossomo X tem um grande efeito sobre a esterilidade dos machos hibrídos F1. Entretanto, os resultados de Orr (1987), sugerem que a esterilidade é mais devida à incompatibilidade entre loci dos cromossomos X e Y das duas espécies, do que a um desequílibrio X-autossomos como sugerido por Dobzhansky (1936).

Segundo Orr (1987), as diferenças entre as conclusões de seu trabalho e as de Dobzhansky (1936) são, quase certamente, devidas ao fato de Dobzhansky ter usado o tamanho do testículo como uma medida da fertilidade e Orr (1987) pondera que fertilidade e tamanho do testículo não são suficientemente bem correlacionados para permitir o uso de um como indicador do outro.

A esterilidade dos machos híbridos originados de cruzamentos entre **D. pseudoobscura pseudoobscura** (algumas vezes chamada de Continental ou USA) e **D. pseudoobscura bogotana** (Bogotá) foi investigada por Prakash (1972) e Dobzhansky (1974). Prakash (1972) atribuiu a esterilidade dos machos híbridos a quatro loci presentes nas populações de Bogotá, sendo dois no cromossomo X e dois nos autossomos.

Dobzhansky (1974), por outro lado, sugeriu que o efeito materno é a explicação mais provável para as diferenças de fertilidade nos retrocruzamentos.

O trabalho de Orr (1989) demonstra que a fertilidade dos machos híbridos é afetada pelo genótipo do macho e pelo de sua progenitora. Segundo este autor, o efeito materno parece ter um papel significativo na esterilidade dos machos híbridos de USA-Bogotá e o cromossomo X tem um efeito maior que qualquer outro

cromossomo, os autossomos mostram um efeito pequeno, mas significante e o cromossomo Y não tem, aparentemente, qualquer efeito sobre a esterilidade desses híbridos.

Estudos genéticos dos mecanismos de isolamento reprodutivo mostram que existem mutações únicas que podem sobrepujar os mecanismos de isolamento pré ou pós-zigóticos.

Um exemplo notável de uma mutação que pode anular a inviabilidade dos híbridos foi caracterizado por Hollingshead (1930, **apud** Hutter, 1990) em **Crepis** (Compositae). Os híbridos entre **Crepis capillaris** e **C.tectorum** são normalmente inviáveis; as sementes morrem no estágio de dois cotilédones. Algumas populações de **C. tectorum**, entretanto, produzem alguns híbridos viáveis com **C. capillaris**, enquanto que outras originam 50% de híbridos viáveis e 50% de híbridos inviáveis. Esse autor mostrou que isto é devido a um polimorfismo genético, em **C. tectorum**, para um par de alelos, os quais não possuem um efeito evidente dentro da espécie. Qualquer híbrido que carrega o alelo dominante sobrevive e o que carrega o alelo recessivo morre.

Segundo Coyne & Orr (1989) dentro do gênero **Drosophila**, cerca de 1/5 dos exemplos de hibridização interespecífica listados por Bock (1984) originam progênie inviável de um ou ambos os sexos. Estes exemplos incluem o subgrupo **melanogaster**. **D. melanogaster** tem proximidade filogenética com **D. simulans**, **D.mauritiana** e **D. sechellia**. As quatro espécies são morfologicamente semelhantes e as três últimas possuem padrões de bandas homossequenciais nos cromossomos politênicos, diferindo de **D. melanogaster** por uma inversão longa no cromossomo 3R e outras pequenas inversões

(Lemeunier & Ashburner, 1984). Fêmeas híbridas interespecíficas entre **D. simulans**, **D. mauritiana** e **D. sechellia**, são usualmente férteis com machos estéreis (Lachaise **et al.**, 1986). Quando estas espécies são intercruzadas com **D. melanogaster** todos os híbridos são estéreis e somente um dos sexos sobrevive até a fase adulta.

Sturtevant (1920, **apud** Hutter **et al.**, 1990) notou que os machos híbridos, do cruzamento entre fêmeas de **D. melanogaster** com machos de **D. simulans**, morrem no estádio de larva ou pupa inicial, enquanto no cruzamento recíproco, as fêmeas híbridas morrem no estádio de embrião.

Segundo Hutter **et al.** (1990), as causas genéticas da inviabilidade dos híbridos no complexo de espécies **melanogaster** incluem interações entre o genótipo do zigoto e fatores maternos.

Watanabe (1979) e Takamura & Watanabe (1980) descobriram uma linhagem de **D. simulans** que origina híbridos adultos viáveis, de ambos os sexos, quando cruzada com **D. melanogaster**. Análises genéticas identificaram uma mutação no cromossomo 2R desta linhagem a qual, quando em heterozigose em um zigoto híbrido, torna-o viável. Watanabe chamou esta mutação de Lhr (salva híbrido letal) e esta linhagem (Ki8) tem sido distribuída e suas propriedades confirmadas.

Hutter & Ashburner (1987) encontraram uma linhagem de **D. melanogaster** em Umain, Ucrânia (URSS), que produz cerca de 5% de machos híbridos quando cruzada com **D. simulans**. Foi demonstrado, que isto se deve à presença, em baixa frequência, nessa linhagem, de uma mutação "salvadora". Esta mutação foi mapeada no cromossomo X e chamada de Hmr (salva machos híbridos). Hmr pode ser consequência da inserção de elemento P. Ela salva machos híbridos de cruzamentos

entre **D. melanogaster** e as três espécies crípticas, **D. simulans**, **D. mauritiana** e **D. sechellia**. Este salvamento é recessivo, desde que machos híbridos que transportam Hmr e uma duplicação Hmr+ não são viáveis.

Em suas conclusões, esse autores dizem acreditar que estas mutações únicas constituem um modelo genético formal para a base da letalidade em híbridos. Este modelo é consistente com idéias anteriores de que a inviabilidade dos híbridos surgiu como uma consequência de mutações com efeitos aditivos surgidas em espécies isoladas.

Vários autores têm sugerido que elementos transponíveis, os quais causam vários graus de esterilidade dos híbridos, podem ser um dos mecanismos responsáveis pela especiação (**e.g.** Bingham **et al**, 1982; Rose & Doolittle, 1983). A hipótese é simples e consiste de duas etapas:

1. Os genomas de duas populações, isoladas geograficamente, são independentemente "contaminados" por elementos transponíveis diferentes. Estas "infecções" espalham-se nas respectivas populações, apesar da diminuição do valor adaptativo mostrada pelos indivíduos que carregam os transposons. Esta perda do valor adaptativo é bem caracterizada nos casos de disgenesia de P-M e IR, sistemas que reduzem substancialmente a fertilidade entre os indivíduos que carregam os transposons em questão.

2. A perda do valor adaptativo dos híbridos, devido a efeitos acumulativos da combinação de elementos transponíveis não correlacionados faz com que o isolamento reprodutivo efetivo entre essas duas populações (especiação) continua, mesmo que elas,

subsequentemente, tornem-se simpátricas.

Existem evidências circunstanciais de que famílias de transposons "invadem" populações naturais e que tais invasões, são rápidas. Além disso, estas invasões podem ser comuns, como sugerido para duas famílias diferentes de elementos transponíveis (famílias do elemento P e I), em populações naturais de **D. melanogaster**. Estas invasões rápidas e comuns são frequentemente associadas com esterilidade híbrida.

Também tem sido observado que a inserção de transposons pode ser uma fonte importante de mutação em várias populações (Bingham **et al.**, 1982; Rubin **et al.**, 1982). Se as taxas de mutações forem substancialmente elevadas, como resultado da invasão de famílias de transposons, levando à uma divisão da população invadida em duas linhas de descendência, os elementos transponíveis podem ser considerados responsáveis pela criação potencial de novas espécies.

A disgenesia de híbridos em **Drosophila** é uma síndrome complexa, com elevada taxa de mutação, distorção da segregação, recombinação no macho, esterilidade e disgenesia gonadal sensível à temperatura, e que ocorre em híbridos de algumas linhagens (Kidwell **et al.**, 1977; Kidwell, 1983).

A disgenesia é encontrada, frequentemente, em descendentes de um macho recentemente coletado na natureza cruzado com uma fêmea de uma linhagem antiga de laboratório. Pelo menos parte desta síndrome é causada pela presença de elementos transponíveis, segundo Kidwell (1983). Tem sido proposto que tal disgenesia tem um papel na especiação por causar perda diferencial e acúmulo de DNA devido aos

elementos móveis em populações isoladas geograficamente. Isto poderia causar desarmonia reprodutiva nas populações de híbridos (Engels & Preston, 1979; Kidwell, 1983; Rose & Doolittle, 1983; Ginzburg, **et al.**, 1984).

Devido ao conhecimento ainda limitado mas, também, pelo fato de que a evolução é um processo de mudança gradual e não pode ser observado integralmente, existem ambiguidades sobre o status de muitas espécies.

Duas populações que são membros de uma única espécie podem, eventualmente, divergir em duas espécies diferentes. Devido à natureza intrínseca do processo, não existe um ponto particular no tempo, no qual as duas populações, subitamente, tornam-se espécies diferentes.

Estágios transicionais da especiação são de considerável interesse, porque eles podem esclarecer o processo da origem das espécies e ajudar na identificação da sequência de eventos que originam novas espécies.

Embora seja difícil conhecer o grau de divergência genética que leva à especiação, algumas manifestações dessa divergência são frequentes ou constantes ao nível do conhecimento atual. Entre essas manifestações inclui-se a ocorrência de assinapse cromossômica em híbridos interespecíficos.

Apesar de não se conhecer suficientemente as bases genéticas do emparelhamento cromossômico, verifica-se que este é um aspecto morfológico dessas estruturas frequentemente mais afetado no processo de diferenciação das populações do que as próprias bandas ou mesmo o número e a forma cromossômica. Muitas vezes, espécies

muito próximas, não manifestam diferenças morfológicas detectáveis em seus cromossossomos mas, apresentam algum grau de assinapse.

O interesse em estudar o emparelhamento cromossômico vem de longa data. Metz (1916) menciona dados de M.M. Stevens realizados em 1907 e 1908, referentes ao emparelhamento de cromossomos em dípteros. O próprio trabalho de Metz (1916), está relacionado com esses estudos na mitose de ovogônias e espermatogônias e em vários tipos de tecidos somáticos em fases embrionárias, de 80 espécies de dípteros. Em 67 páginas, esse trabalho descreve suas observações e as discute ao nível do conhecimento da época.

Após a descoberta dos cromossomos politênicos nas glândulas salivares de **Drosophila** por Painter (1933), esse material tornou-se importante no estudo do emparelhamento cromossômico chamado no caso, sinapse somática.

Na literatura, a sinapse somática que ocorre nos cromossomos politênicos tem sido tomada como um modelo do que ocorre na meiose (Evgen'ev, 1971). Assim, podemos analisar alguns dados existentes na literatura sobre sinapse meiótica, na tentativa de conhecer o processo de sinapse somática. Por exemplo, há evidências que suportam a idéia de que a associação prévia de segmentos heterocromáticos homólogos, desempenha um papel no pareamento meiótico. Segundo John (1988), Chaunham & Abel (1968) observaram que em **Salvia nemorosa** cerca de 50% das células pré-meióticas tinham cromocentros arranjados em sete grupos de dois (nessa espécie 2n=14). Devido ao tamanho diferente dos pares de cromossomos é possível confirmar que os cromocentros homólogos estavam de fato

pareados. Também, Macgregor & Kezer (1971, **apud** John, 1988) aventaram o possível papel da heterocromatina centromérica na promoção da sinapse das regiões cêntricas no início da prófase meiótica. Entretanto, a validade dessa conclusão tem sido discutida pois esse tipo de emparelhamento não ocorre em muitas espécies, nas quais, o emparelhamento é iniciado nos telômeros. Em ratos, as evidências indicam, também, que o pareamento homólogo não é determinado por associação prévia das regiões heterocromáticas. Comumente, a sinapse começa nas extremidades teloméricas e prossegue em direção aos centrômeros (Pathak & Hsu, 1976). O mesmo ocorre com o gafanhoto **Stauroderus scalaris** que tem grandes blocos de heterocromatina cêntrica em todos os autossomos mas essas regiões são as últimas a emparelhar (John, 1976).

Também em **Drosophila melanogaster**, Yamamoto (1977,1979) mostrou que deleções ou rearranjos de blocos específicos de heterocromatina não causam problemas de sinapse, sendo esta dependente apenas da homologia eucromática. Contudo, não se sabe se toda a eucromatina é igualmente eficiente no pareamento ou se há segmentos mais importantes que outros. Há dados que indicam que esta última situação pode ser verdadeira. A remoção da eucromatina da extremidade distal do cromossomo IV de **Drosophila melanogaster** não causou problemas de sinapse meiótica, enquanto que a remoção de parte da eucromatina proximal desse cromossomo levou a distúrbios nesse processo (Yamamoto, 1979). Observações semelhantes foram feitas pelo mesmo autor no cromossomo II, no qual menos de cinco das vinte divisões da eucromatina do braço 2L e menos que sete das vinte divisões da eucromatina do braço 2R são importantes para o

pareamento meiótico no macho. Ainda, segundo Yamamoto (1979), as regiões eucromáticas envolvidas no pareamento autossômico são certamente específicas de cada cromossomo.

Verificou-se que híbridos interespecíficos de **Drosophila** apresentam emparelhamento dos cromossomos politênicos incompleto em comparação com o emparelhamento cromossômico dentro da espécie Pätau (1935), Kerkis (1936), Dobzhansky & Tan (1936), Horton (1939, **apud** Evgen'ev, 1971), Cordeiro (1968), Bicudo (1979), Madi-Ravazzi (1988), Madi-Ravazzi & Bicudo (1992).

Michailova & Fischer (1984) realizaram um estudo citogenético nos cromossomos politênicos de três populações geograficamente separadas de **Chironomus plumosus** e seus híbridos. Essa espécie encontra-se em um processo de divergência com uma grande variação em diferentes regiões da sua área de distribuição. Os seus resultados mostraram um extenso grau de assinapse nos cromossomos dos híbridos entre as populações de Vancouver X Wohlen. Além disso, encontraram diferentes arranjos da heterocromatina (evidenciados por Banda-C) e de inversões homozigotas. Aqueles autores admitem que essas diferenças gênicas fornecem bases para considerar a população do Canadá (Vancouver) como uma espécie independente. Ainda, segundo esses autores, a perda do emparelhamento homólogo nos híbridos é a primeira diferença visível entre populações que evoluem independentemente.

Dobzhansky & Tan (1936) apresentaram três causas possíveis para a assinapse dos cromosssomos politênicos em híbridos interespecíficos: (1) rearranjos heterozigotos muito pequenos causando "conflitos das forças atrativas", (2) interações

específicas de genes e (3) mutações de ponto, pertubando a identidade de loci homólogos e levando ao seu não reconhecimento.

O fenômeno da assinapse foi estudado por Evgen'ev & Polianskaya (1976) em híbridos de **D. melanogaster** e **D. simulans.** O estudo da frequência e extensão da assinapse revelou uma distribuição não casual ao longo dos braços cromossômicos. Os autores sugeriram que regiões cromossômicas definidas, que exibem alto grau de emparelhamento, servem como sítio de iniciação da sinapse nos cromossomos das glândulas salivares.

Com o objetivo de explicar a distribuição da assinapse observada, aqueles autores propuseram que o emparelhamento somático nos cromossomos das glândulas salivares é um processo unidirecional, iniciando em sítios específicos (denominados por eles de "buttons") ao longo do cromossomo. Entretanto, não se pode afirmar com certeza se ele se extende da região proximal para a distal ou vice-versa. Os "buttons" de acordo com a hipótese daqueles autores, coincidem com bandas limitantes de assinapse. Essas regiões (usualmente heterocromáticas) podem ser ricas em sequências repetidas de nucleotídeos que fornecem alta afinidade ao emparelhamento. A presença de repetições nos sítios de iniciação (buttons) não permite uma rápida alteração, por mutação de ponto, das sequências de nucleotídeos em loci homólogos , no processo de divergência entre espécies relacionadas. Portanto, os sítios de iniciação do emparelhamento poderão ser ainda parcialmente homólogos em espécies relacionadas e como resultado preservar sua afinidade de sinapse em híbridos interespecíficos, enquanto outras secções cromossômicas podem perder a habilidade para emparelhar apesar do fato de

possuirem padrões de bandas aparentemente idênticos.

Riede & Renz (1983) utilizaram hibridação "in situ" com sonda de DNA de **D. virilis** em cromossomos politênicos de híbridos dessa espécie com **D. lummei**, **D. novamexicana**, e **D. lacicola**, procurando relacionar o grau de homologia das bandas das espécies e seu grau de emparelhamento. Concluiram que o emparelhamento decresce com o decréscimo da homologia do DNA nas bandas. Verificaram ainda, entre outros detalhes, que as inversões perturbam o processo de emparelhamento somático mas não são a causa primária do não-emparelhamento nos híbridos.

Mayfield & Ellison (1975) propuseram que proteínas específicas que se ligam a determinadas sequências de DNA poderiam estar envolvidas na assinapse cromossômica. Assim, regiões homossequenciais dos cromossomos politênicos de duas espécies poderiam mostrar assinapse como resultado de mudanças evolutivas nessas proteínas (NHC) os seus sítios de ligação no DNA específico dessas regiões, as quais mostram exatamente o mesmo conteúdo e ordem genéticos. O emparelhamento interespecífico seria, portanto, alterado sem que tenha ocorrido mudança na morfologia e função da banda.

Podem ocorrer porém, mudanças nas bandas não detectadas ao nível da microscopia óptica. Por exemplo, em **D. melanogaster**, transposons podem ser inseridos em sítios cromossômicos sem mudar visivelmente a estrutrura da banda. A heterozigose foi mostrada por hibridização **in situ** com sondas contendo sequências de elementos transponíveis.

O envolvimento de proteínas de ligação aos sítios

específicos de DNA (denominadas proteínas nucleostéricas), com os mecanismos moleculares do emparelhamento pré-meiótico e somático foi também, previamente discutido por Comings & Riggs (1971). Esses autores consideram que um dos aspectos mais importantes do emparelhamento cromossômico meiótico é o relacionado com o mecanismo pelo qual os cromossomos homólogos tornam-se parcialmente alinhados, antes da formação do complexo sinaptonêmico. Esse mesmo mecanismo pode ser o responsável pelo emparelhamento somático preciso que ocorre em dípteros. Esses autores sugerem que existem genes que codificam proteínas de emparelhamento que se ligam especificamente a uma única sequência de DNA. Ao se ligar ao DNA de cromossomos homólogos, os pares de proteínas sofrem mudanças alostéricas em sua configuração superficial o que acentua sua complementariedade. Sua associação subsequente causa o emparelhamento homólogo entre segmentos específicos dos cromossomos. Haveria uma série desses sítios de DNA aos quais se ligam as proteínas de emparelhamento específico, ao longo de cada cromossomo.

O grupo **repleta** do gênero **Drosophila**, no qual se incluem as linhagens isofêmeas analisadas no presente trabalho, possue um grande número de espécies intimamente relacionadas (Throckmorton, 1975; Wasserman, 1982), sendo também um dos grupos com maior número de espécies dentro do genêro. O grupo é originário do continente americano onde são encontrados representantes de todas as espécies. Cinco delas **D. repleta, D. hydei, D. mercatorum, D. aldrichi e D. buzzatii** ocorrem também em diversos lugares fora deste continente, aonde, provavelmente, chegaram acompanhando as atividades humanas. As espècies do grupo **repleta** ocupam diferentes habitats, mas, sem

dúvida, a característica mais notável do grupo é a capacidade de muitas espécies utilizar, como nicho trófico, os tecidos de cactos em decomposição. Esta adaptação é que tem permitido ao grupo ocupar os desertos e as zonas áridas do Novo Mundo (Ruiz & Fontdevila, 1981).

O grupo **repleta**, ainda que conservado citologicamente, está em processo ativo de especiação (Wasserman, 1982). Segundo este autor, esse grupo apresenta uma média de 1,7 inversões homozigotas fixas diferentes entre as espécies e não tem sofrido uma "revolução citológica" semelhante às propostas por White (1978) e Bush **et al.** (1977) para outros organismos. Além disso, não foi encontrada correlação entre isolamento reprodutivo e diferenciação citológica, em algumas espécies deste grupo.

Por exemplo, **D. mulleri** e **D. aldrichi**, embora citologicamente idênticas, acasalam-se com dificuldade e produzem descendentes estéreis. Por outro lado, **D. mojavensis** difere de **D. arizonensis** (atualmente **arizonae**, em Ruiz **et al.**,1990) no mínimo por sete inversões, e, ao menos sob condições de laboratório, acasalam-se e produzem híbridos férteis (Wasserman, 1982).

Zouros (1981) estudou a base cromossômica do isolamento sexual presente entre **D. mojavensis** e **D. arizonensis** e mostrou que a discriminação pelos machos era controlada pelos cromossomos Y, e os autossomos 4 ou 5, enquanto a discriminação pelas fêmeas era controlada por dois outros autossomos, o cromossomo 2 e o cromossomo 4 ou o 5 (diferente dos autossomos envolvidos no comportamento dos machos). **D. mojavensis** e **D. arizonensis** diferem entre si por inversões nos cromossomos X, 2 e 3, enquanto os cromossomos 4 e 5

são citologicamente idênticos. Estes dois últimos, porém, são os cromossomos que possuem muitos dos genes que determinam o grau de isolamento reprodutivo entre as duas espécies.

Patterson e Stone (1952) utilizando critérios morfológicos, cromossômicos e reprodutivos, dividiram o grupo **repleta** em 4 subgrupos: **melanopalpa** (atualmente **repleta**), **mercatorum, hydei** e **mulleri**.

Wasserman (1962), mediante a comparação da estrutura dos cromossomos politênicos estabeleceu as relações filogenéticas entre muitas espécies e descreveu um novo subgrupo, **fasciola**, estabelecido citologicamente. Cada subgrupo tem sido subdividido por sua vez em complexos, conjuntos de espécies que compartilham, em sua filogenia cromossômica, uma ou mais inversões, o que indica sua procedência de um mesmo ancestral. Além disso, cada complexo pode conter um ou mais **clusters** de espécies estreitamente relacionadas entre si.

Uma revisão do grupo **repleta**, foi feita por Vilela (1983), usando a morfologia da genitália do macho como principal característica para a diferenciação das espécies. A análise comparativa da genitália do macho, em geral, confirmou as relações filogenéticas previamente estabelecidas pela análise das inversões cromossômicas. A análise de moscas coletadas no campo em diferentes domínios morfoclímaticos aumentou o número de espécies do grupo **repleta**, registradas no Brasil, de 12, (Mourão **et al.**, 1965), para 23 espécies (Vilela **et al.**, 1983).

O subgrupo **mulleri** é o mais numeroso dos cinco; contém mais de 30 espécies descritas, caracterizadas por ter receptáculos ventrais relativamente curtos (de 15 a 35 voltas) e espermatecas não

esclerotizadas ou esclerotizadas ligeiramente, e que perderam a função de receptáculo de esperma (Patterson e Stone 1952). Doze são as espécies do subgrupo **mulleri** presentes na América do Sul (Ruiz & Fontdevila, 1981).

O subgrupo **mulleri** tem sido utilizado para incluir as espécies do grupo **repleta** que não possuem as características dos outros subgrupos. Por esta razão, o cariótipo ancestral do subgrupo **mulleri** é o mesmo cariótipo hipotético do qual derivam todas as espécies do grupo **repleta**. Este cariótipo difere do de **D. repleta**, usado como referência, por seis inversões paracêntricas: Xa, Xb, Xc, 2a, 2b e 3b.

Originariamente, o complexo mulleri foi definido citologicamente como integrado por aquelas espécies que compartilham em sua filogenia cromossômica uma ou mais das inversões : 2c, 2f, 2g, 2h e 3c (Wassermam, 1962). O ancestral do complexo **mulleri** foi provavelmente uma espécie politípica formada por várias raças ou subespécies diferenciadas citologicamente e que ocuparam os desertos desde o Nebraska até a Colômbia (Ruiz & Fontdevila, 1981).

Como já foi mencionado, as espécies do complexo **mulleri** têm sido agrupadas em **clusters** que melhor refletem a sua evolução citológica (Wasserman, 1982).

O **cluster buzzatii** que é o de interesse do presente trabalho, atualmente, consiste de quatro espécies: **D. buzzatii** Patterson & Wheeler, **D. serido** Vilela & Sene, **D. borborema** Vilela & Sene e **D. koepferae** Fontdevila **et al.**.

A espécie **D. serido**, objeto do presente estudo, foi descrita a partir de espécies coletadas no nordeste do Brasil

(Vilela & Sene, 1977) e é constituída por um conjunto de espécies ou ao menos é uma espécie politípica (Tosi & Sene, 1989; Sene **et al.**, 1982; Baimai **et al.**,1983; Wasseman **et al.**,1983; Wassermam & Richardson, 1987; Fontdevila **et al.**,1988; Sene **et al.**, 1988; Silva & Sene, 1991; Lapenta, 1991).

Posteriormente ao trabalho de Vilela & Sene (1977), **D. serido** foi encontrada do Brasil à Argentina e Paraguai (Vilela **et al.**, 1980; Ruiz **et al.**, 1982). Como a maioria das espécies do seu grupo, a sua presença está associada à climas secos e semidesérticos em locais onde existem cactáceas (Ruiz **et al.**, 1982; Pereira **et al.**, 1983). No Brasil ela é comum nas caatingas, nas dunas, em campos rupestres e em certas partes do Pantanal Matogrossense. Na Argentina e Paraguai foi encontrada nas bordas do chaco (Vilela **et al.**, 1980, 1983; Sene **et al.**, 1982, 1988).

O padrão atual de distribuição de **D. serido** é caracterizado por uma série de populações alopátricas, o que pode ser um reflexo das transformações ocorridas no cenário sul-americano entre 12.000 e 18.000 anos atrás, onde existiu uma grande expansão das áreas semi-áridas, com a presença de cactáceas (Ab'Saber, 1977). Os organismos associados aos cactos, como **D. serido**, devem ter acompanhado essa expansão e com o fim da glaciação houve um aumento da umidade, que determinou uma retração da semi-aridez. Segundo Bizzo (1983), isso explica a divisão das populações de **D. serido**, que ficaram restritas à caatinga, às bordas do chaco, à estreita faixa de dunas e a redutos de cactáceas no interior do continente (Vilela **et al.** 1980, 1983).

Estudos do cariótipo (Baimai **et al.**, 1983), mostraram uma

grande variação entre as populações de **D. serido**, tendo sido reconhecidos seis tipos de cariótipos que as diferenciam pela quantidade e distribuição de blocos heterocromáticos nos microcromossomos e cromossomos sexuais. O tipo I de cariótipo é considerado o cariótipo básico de **D. serido** e consiste de quatro pares de autossomos telocêntricos, um par de cromossomos em ponto (microcromossomos) e um par de cromossomos sexuais. O cromossomo X é telocêntrico com aproximadamente um terço de sua região proximal composta de heterocromatina. O cromossomo Y é quase inteiramente heterocromático. Este tipo, ocorre nas localidades B58 (Paulo Afonso-BA), B53 (Petrolina-PE), A19 (Ibotirama-BA), B49 (Barreiras-BA), B89 (Cariranha-BA), B98 (Cristalina-GO) e A55 (Bela Vista-MS). O cariótipo do tipo II difere do cariótipo básico (tipo I) por apresentar um microcromossomo maior e submetacêntrico. O tipo II foi encontrado apenas na Serra do Cipó-MG. O cariótipo do tipo III difere do tipo I quanto aos microcromossomos e cromossomos Y. O microcromossomo é um pequeno bastão telocêntrico e o cromossomo Y é submetacêntrico e aproximadamente do mesmo tamanho do cromossomo Y do tipo I. Este tipo de cariótipo foi encontrado no Arraial do Cabo-RJ (B97). O cariótipo do tipo IV difere do tipo I quanto aos microcromossomos, de maneira semelhante a do tipo III. O cromossomo Y parece ser acrocêntrico e do mesmo comprimento do ancestral mas com uma constrição secundária aproximadamente no meio do braço longo heterocromático. O tipo IV foi encontrado em Peruíbe-SP. O tipo V é o cariótipo com a mais extensa diferenciação já encontrada em populações de **D. serido**. Ele é bastante diferente do cariótipo do tipo I quanto aos microcromossomos, ao cromossomo Y e ao cromossomo

X. O microcromossomo, é neste caso, muito maior do que o microcromossomo do tipo I. Do mesmo modo, os cromossomos X e Y acrocêntricos são ligeiramente maiores do que o tipo básico I. O tipo V está presente desde Itu, no Estado de São Paulo, até Puerto Tirol na Argentina. O cariótipo do tipo VI difere do tipo básico I quanto ao cromossomo Y. Este é metacêntrico e tem, aproximadamente, o mesmo tamanho do ancestral. O tipo VI é aparentemente confinado a populações da Argentina, os quais estão isolados de Puerto Tirol (B31) por uma vasta área central do chaco (Vilela **et al.**, 1980).

O estudo da morfologia do aparelho genital masculino revelou a presença de 5 tipos distintos de edeagos (Silva, 1981, Silva & Sene, 1991). O tipo A ocorre na parte leste do Brasil, desde o Ceará até o litoral do Rio Grande do Sul. O tipo B ocupa a diagonal caatinga-pantanal matogrossense. O tipo C ocorre conjuntamente com o tipo A na Serra do Cipó-MG. O tipo D tem distribuição que vai do interior de São Paulo até a parte leste do Chaco Argentino. O tipo E ocorre ao leste do Chaco Argentino, já nas encostas dos Andes.

As populações de **D. serido** foram divididas em quatro tipos, com relação aos rearranjos cromossômicos (Tosi, 1982; Tosi & Sene, 1989). O tipo I é encontrado nas linhagens A77 (Carfanaum-BA), A16, B53 e B58 (as três de Milagres-BA). O tipo II é encontrado nas linhagens B31 (Puerto Tirol-Argentina). O tipo III é encontrado em B20 (Tapia-Argentina) e B26 (Famatina-Argentina). O tipo IV é encontrado em A19 (Ibotirama-BA), A53 (Bela Vista-Paraguai), A55 (Bela Vista-MS), A95 (Cardeal Mota-MG), B49 (Barreiras-BA), B50 (Ibotirama-BA) e B59 (Petrolina-PE).

Bizzo (1983) realizou experimentos para testar isolamento pós-cópula com diversas linhagens de **D. serido**, e os resultados mostraram a existência de três entidades distintas e bem delimitadas. Uma delas ocupa o lado leste da caatinga (Paulo Afonso-BA e Milagres-BA). Outra ocorre em Serra do Cipó-MG e a última no lado oeste do Chaco Argentino, nas encostas dos Andes (Famatina e Tapia- La Rioja).

Essa separação feita por Bizzo (1983) é semelhante à de Moraes (1992) que estudou o isolamento sexual de seis linhagens de **D. serido** e os seus resultados permitiram dividir estas isolinhagens em três grupos. O primeiro inclui as linhagens de Ibotirama-BA (B50), Milagres-BA (B53) e de Puerto Tirol-Argentina (B31). O segundo grupo inclui a linhagem B95 (ou A95) da Serra do Cipó-MG. A linhagem B26 de Famatina-Argentina compõe o terceiro grupo.

Fontdevila **et al.** (1988) estudando populações coletadas no Nordeste da Argentina e Bolívia Central, verificaram um alto grau de divergência entre estas populações e as do Brasil, das quais o material tipo de **D. serido** foi derivado (Vilela, 1983). Foram realizados testes reprodutivos utilizando linhagens de ambas as áreas e verificou-se um isolamento pré-zigótico quase completo sob condições artificiais. Estes dados e informações anteriores, levaram estes autores à conclusão que populações da Bolívia e Argentina são separadas das do Brasil, e descreveram as primeiras como uma nova espécie: **D. koepferae.**

Paralelamente, Madi-Ravazzi (1988) realizou um estudo sobre aspectos citogenéticos e reprodutivos com uma linhagem da região de Tapia-Argentina (B20D2) e uma da Serra do Cipó-MG (A95),

o qual mostrou diferenças acentuadas entre estas linhagens que permitiram classificá-las ao menos como semiespécies. As observações citogenéticas incluiram a detecção de material cromossômico adicional em híbridos dessas linhagens.

Lapenta (1992) realizou um estudo do padrão de esterases com seis linhagens isofêmeas classificadas como **D. serido**, uma linhagem classificada como **D. koepferae** e uma linhagem de **D. buzzatii**, que pertence ao mesmo **cluster** de **D. serido**. Os resultados deste trabalho permitiram dividir as linhagens analisadas em cinco classes, segundo os valores médios de IS (índice de similaridade). A classe I é constituída das linhagens B20D2 e B25D7, a classe II é constituída por B31D1, a classe III por A55F11, B59Q1 e B50Q3, a classe IV por A95F3 e a classe V por **D. buzzatii**. Estes mesmos resultados analisados pela Análise de Dependência (Cordeiro, 1991) permitiram agrupar as linhagens em quatro classes, sendo a diferença devida à reunião das linhagens das classes II e III em uma mesma classe, nessa análise.

O presente trabalho teve, por objetivo, contribuir para ampliar as informações referentes à diferenciação das populações classificadas como **D. serido**, visando a um melhor conhecimento de seu atual "status" evolutivo. Para tanto, foi realizado, basicamente, um estudo mais detalhado quanto ao isolamento reprodutivo (fertilidade e fecundidade), emparelhamento cromossômico e material cromossômico extra nas glândulas salivares de 7 linhagens isofêmeas da superespécie **D. serido** e uma de **D. buzzatii**.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Linhagens e Procedência Geográfica

Neste trabalho foram utilizadas oito linhagens isofêmeas, sendo uma de **Drosophila buzzatii** Patterson & Wheeler, 1942, cinco presentemente classificadas como **Drosophila serido** Vilela & Sene, 1977 e duas classificadas como **D. koepferae** Fontdevila **et al.**, 1988. Todas essas linhagens foram obtidas no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da USP, São Paulo, tendo sido fornecidas pelo Prof. Dr. Fábio de Mello Sene, atualmente no Departamento de Biologia da USP de Ribeirão Preto.

Na tabela 1 encontram-se relacionadas as linhagens isofêmeas estudadas, com suas procedências e códigos de referência.

2. Isolamento Reprodutivo

Para este estudo, o método utilizado foi o de cruzamentos individuais, realizados em tubos (40ml) contendo uma mistura de meio de cultura de cactos e banana, na proporção de 1:1 (Madi-Ravazzi, 1988). Fêmeas e machos virgens foram mantidos em frascos separados até atingirem a idade desejada, de sete a nove dias. Para cada tipo de cruzamento foram preparadas 50 réplicas (exceto em três intracruzamentos, nos quais foram preparadas 49 réplicas) e realizadas três transferências para meio novo (repiques) em intervalos de sete dias. Foram computados o número e o sexo dos descendentes em dois censos semanais, em um total de seis contagens.

Na tabela 2 estão representados os tipos de cruzamentos efetuados neste estudo.

Tabela 1. Origem geográfica das linhagens isofêmeas.

Classificação Atual	Linhagens	Procedência
Drosophila serido	A95F3	Serra do Cipó M. Gerais (Brasil)
	A55F11	Bela Vista M. Grosso Sul (Brasil)
	B50Q3	Ibotirama Bahia (Brasil)
	B59Q1	Petrolina Pernambuco (Brasil)
	B31D1	Puerto Tirol Chaco (Argentina)
Drosophila koepferae	B20D2	Tapia Tucuman (Argentina)
	B25D7	Famatina La Rioja (Argentina)
Drosophila buzzatii	R-74	Carfanaum (Bahia-Brasil)

Tabela 2. Tipos de cruzamentos efetuados.

Fêmeas	Machos							
	B5003	B5901	A55F11	A95F3	B31D1	B2002	B2507	BUZ
B5003	B5003/B5003	B5003/B5901	B5003/A55F11	B5003/A95F3	B5003/B31D1	B5003/B2002	B5003/B2507	B5003/BUZ
B5901	B5901/B5003	B5901/B5901	B5901/A55F11	B5901/A95F3	B5901/B31D1	B5901/B2002	B5901/B2507	B5901/BUZ
A55F11	A55F11/B5003	A55F11/B5901	A55F11/A55F11	A55F11/A95F3	A55F11/B31D1	A55F11/B2002	A55F11/B2507	A55F11/BUZ
B31D1	B31D1/B5003	B31D1/B5901	B31D1/A55F11	B31D1/A95F3	B31D1/B31D1	B31D1/B2002	B31D1/B2507	B31D1/BUZ
A95F3	A95F3/B5003	A95F3/B5901	A95F3/A55F11	A95F3/A95F3	A95F3/B31D1	A95F3/B2002	A95F3/B2507	A95F3/BUZ
B2002	B2002/B5003	B2002/B5901	B2002/A55F11	B2002/A95F3	B2002/B31D1	B2002/B2002	B2002/B2507	B2002/BUZ
B2507	B2507/B5003	B2507/B5901	B2507/A55F11	B2507/A95F3	B2507/B31D1	B2507/B2002	B2507/B2507	B2507/BUZ
BUZ	BUZ/B5003	BUZ/B5901	BUZ/A55F11	BUZ/A95F3	BUZ/B31D1	BUZ/B2002	BUZ/B2507	-----

A fertilidade de F1 foi testada em cruzamentos "em massa", preparando-se cinco garrafas com 10 casais em cada, com idades de sete a nove dias. Estes cruzamentos foram repicados duas vezes, com intervalos de sete dias.

Os intercruzamentos com **Drosophila buzzatii** foram realizados preparando-se três garrafas com 20 casais de sete a nove dias de idade, para cada tipo de cruzamento. Estas garrafas foram repicadas duas vezes, com intervalos de cinco dias.

3. Análise citológica

O estudo citológico das linhagens isofêmeas e seus híbridos foi realizado em preparações cromossômicas das glândulas salivares de larvas de terceiro estadio tardio, coradas com orceína lacto-acética, objetivando observar emparelhamento cromossômico e diferenciação no padrão de bandas.

Para esta análise foram feitos intercruzamentos em massa das linhagens, em garrafas de 1/4 de litro, com 20 casais de sete a nove dias de idade, por garrafa.

3.1. Preparações de glândulas salivares para coloração pela orceína lacto-acética

As larvas foram dissecadas em solução de DEMEREC e as glândulas salivares transferidas para uma lâmina contendo uma gota de ácido acético (45%) onde permaneciam por 2 minutos. O ácido acético foi substituído por uma gota de orceína lacto-acética (2%) onde as glândulas ficavam por 5 minutos. Em seguida, substituia-se a orceína por ácido lático (50%), deixando-o agir por 8 minutos. A

seguir, o material foi recoberto com uma lamínula e submetido ao processo de esmagamento. As lâminas foram, em seguida, lutadas com esmalte incolor e mantidas em geladeira.

3.2. Gelatinização das lâminas para a técnica de bandas-C

As lâminas utilizadas na técnica de bandamento-C foram previamente lavadas e recobertas com uma camada de gelatina. O processo de gelatinização consistia em submergir as lâminas limpas em um banho preparado pela mistura de duas soluções:

a) 0,10 g de gelatina dissolvida em 50 ml de água desionizada morna e,

b) 0,01 g de alúmen de cromo dissolvido em 50 ml de água desionizada.

A mistura destas duas soluções foi mantida em banho-maria durante o uso. Após o banho de gelatina, as lâminas foram secas ao ar, podendo-se usá-las após 4 horas.

3.3. Preparações de glândulas salivares a serem submetidas ao bandamento-C

As larvas foram dissecadas em solução fisiológica (DEMEREC), e as glândulas salivares retiradas e colocadas em uma lâmina gelatinizada com uma gota de ácido ácetico (45%) por 2 minutos. Decorrido este tempo, o ácido foi removido com o auxílio de papel absorvente e substituído por uma gota de ácido lático (50%), deixando-o agir por 10 minutos. O excesso de ácido lático foi retirado, colocava-se uma gota de ácido acético, cobrindo-se o material com uma lamínula e submetendo-se ao esmagamento.

As lâminas assim preparadas foram colocadas em câmara úmida por 20 minutos, quando então as lamínulas foram retiradas com o auxílio do nitrogênio líquido e guardadas no freezer por aproximadamente uma semana, antes da aplicação da técnica de bandas-C.

3.4. Bandamento-C

No presente trabalho, foi utilizada a técnica de bandamento-C de Michailova (1987), com algumas modificações. Esta técnica consiste em tratar as lâminas preparadas, (conforme ítem 3.3) e envelhecidas por 5 a 6 dias, com uma solução de bário saturada (5%), por 15 minutos a 70 C. Feito isto, as lâminas foram lavadas duas vezes com água desionizada gelada misturada com 2 ml de ácido acético puro para ajudar a remover o excesso de bário. A seguir, as lâminas foram incubadas em 2XSSC por 2 horas a 65 C. Na etapa seguinte, as lâminas foram lavadas em água desionizada e passadas por um banho de álcool 70% e outro de álcool 95%. Após secagem ao ar, as lâminas foram coradas com GIEMSA 1:10, durante 20 minutos.

3.5. Fotomicrografias

As lâminas foram analisadas em Fotomicroscópio Zeiss II (doação FAPESP-Processo Biológicas número 70/562). Os filmes utilizados para a elaboração das fotografias foram o Kodak Panatomic-X, 32 ASA e o Ilford PANF, 50 ASA. O papel fotográfico empregado foi o Kodabrome Print RC F-3.

4. Análise Estatística

Os dados obtidos no presente trabalho foram submetidos às seguintes análises estatísticas:

1. Análise exploratória de dados (estatísticas descritivas), Ramos e folhas (Tukey, 1977; Mc Neil, 1977);

2. Técnicas aglomerativas: "Cluster analysis", método de agrupamento "Average linkage", medida de dissimilaridade (distância Euclidiana) (Everitt, 1974; Manzato, 1983; Sokal & Sneat, 1963; Sokal & Rohlf, 1962);

3. Análise de variância e comparações múltiplas de Tukey (Neter, 1974; Peres & Saldiva, 1983; Fleiss, 1981).

4.1. Recursos Computacionais Utilizados

Para o desenvolvimento dos tratamentos estatísticos foram utilizados os programas constantes do Software SAS, instalado no Polo Computacional do IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto.

III. RESULTADOS

1. Isolamento reprodutivo

Foram analisados dois parâmetros do isolamento reprodutivo: a fertilidade e a fecundidade. A fertilidade é entendida como porcentagem de cruzamentos férteis e a fecundidade como número médio de descendentes produzidos por casal. Os resultados obtidos, referentes à fertilidade, estão apresentados nas Tabelas 3 a 10, e os referentes à fecundidade constam das Tabelas 3 a 15.

1.1. Fertilidade

Para efeito de classificação da fertilidade dos cruzamentos foram considerados de alta fertilidade os que apresentaram 70% ou mais de cruzamentos férteis, de fertilidade regular os que apresentaram entre 40 e 69% e de baixa fertilidade os que apresentaram de 1 a 69%.

a. Intracruzamentos

Os intracruzamentos mostraram uma alta fertilidade, variando de 82% a 100% entre os sete tipos diferentes de cruzamentos (Tabela 3). Os intracruzamentos mais férteis foram os da linhagens A55F11 e B50Q3 (100%) e aqueles que apresentaram as menores porcentagens foram os das linhagens B20D2 (82%) e B25D7 (90%).

A análise estatística por X de homogeneidade e comparações múltiplas de Tukey mostraram que são significativas as diferenças entre os intracruzamentos da linhagem B20D2 e os demais,

Tabela 3. Fertilidade e fecundidade dos sete tipos de intracruzamentos realizados no estudo do isolamento reprodutivo. F: fêmeas; M: machos; N: número total de cruzamentos; %: porcentagem de cruzamentos férteis; X: média e S: desvio padrão da amostra do número de descendentes produzidos por casal; t1-t4: sequência de tubos.

Cruzamentos		Fertilidade		Fecundidade									
				t1		t2		t3		t4		Total	
F	M	N	%	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
B50Q3	B50Q3	49	100	28,98	17,46	15,76	17,50	12,31	19,09	15,00	25,14	72,04	45,57
A55F11	A55F11	50	100	15,62	16,29	22,02	12,94	14,16	13,63	13,20	16,71	65,00	33,87
B59Q1	B59Q1	50	98	20,96	13,82	28,79	18,01	10,15	12,15	4,96	13,37	64,85	36,11
A95F3	A95F3	49	96	0,67	3,21	23,14	17,58	24,94	13,21	18,57	14,10	67,33	31,06
B31D1	B31D1	49	96	1,49	4,05	10,41	7,26	12,38	11,77	10,45	10,20	34,72	19,98
B25D7	B25D7	50	90	21,87	19,06	23,05	17,00	10,49	16,42	6,60	13,16	62,00	40,57
B20D2	B20D2	50	82	14,22	8,20	15,81	13,34	10,10	12,21	5,05	11,59	45,17	27,37

exceto os da linhagem B25D7, e as diferenças entre os intracruzamentos da linhagem B25D7 e os das linhagens B50Q3 e A55F11 (DMS=0,09; P < 0,05). O nível de significância P < 0,05 foi adotado em todas as análises do presente trabalho.

b. Intercruzamentos

Para análise dos intercruzamentos, foram considerados, separadamente, os que envolvem uma mesma linhagem com as demais, como se encontra apresentado nas Tabelas 4 a 10. Para facilidade do leitor, em cada tabela foram incluídos os dados dos intracruzamentos controle. Também neste caso, foi utilizada a análise estatística por X de homogeneidade e comparações múltiplas.

b.1. Cruzamentos da linhagem isofêmea B50Q3

A comparação dos recíprocos neste grupo de intercruzamentos (Tabela 4), mostra que os que apresentaram maior fertilidade, nas duas direções, foram os da linhagem B50Q3 com B59Q1 (98% de cruzamentos férteis nas duas direções), com A55F11 (94% e 96% de cruzamentos férteis) e com B31D1 (82% e 94% de cruzamentos férteis). Neste grupo de maior fertilidade não houve diferença significativa entre os recíprocos.

O intercruzamento de B50Q3 com A95F3 mostrou fertilidade que pode ser considerada regular nas duas direções de cruzamento:48% e 68%. Mas, a diferença entre as duas direções foi significativa.

Cruzamentos com diferença acentuada entre os recíprocos foram os que envolveram B50Q3 com B20D2 e com B25D7. No primeiro caso, a direção que utilizou fêmeas B50Q3 foi totalmente estéril,

Tabela 4. Fertilidade e fecundidade dos intercruzamentos realizados com a linhagem B50Q3. **F:** fêmeas; **M:** machos; **N:** número de cruzamentos férteis em 50, **X:** média e **S:** desvio padrão do número de descendentes produzidos por casal. **V.A:** valores absolutos dos contrastes (X-72,04) para comparações múltiplas de Tukey quanto à fecundidade. DMS=24,65; *: p<0,05; #: número total de cruzamentos.

Cruzamentos		Cruzamentos Férteis		Fecundidade			Fertilidade
F	M	N	%	X	S	V.A	de F1
B50Q3	B50Q3	49#	100	72,04	45,57		+
B50Q3	B59Q1	49	98	93,18	44,45	21,14	+
B59Q1	B50Q3	49	98	113,25	35,17	41,20*	+
B50Q3	A55F11	47	94	76,13	35,89	4,08	+
A55F11	B50Q3	48	96	84,21	31,32	12,16	+
B50Q3	B31D1	41	82	96,39	42,80	24,34	+
B31D1	B50Q3	47	94	69,75	34,19	2,29	+
B50Q3	A95F3	24	48	81,71	62,83	9,66	-
A95F3	B50Q3	34	68	32,35	32,69	39,68*	-
B50Q3	B20D2	0	0	-	-		
B20D2	B50Q3	43	86	35,84	24,83	36,20*	-
B50Q3	B25D7	7	14	11,86	7,93		-
B25D7	B50Q3	41	82	44,27	21,85	27,77*	-

enquanto a direção recíproca produziu 86% de cruzamentos férteis. No segundo caso, a mesma direção estéril no cruzamento anterior produziu 14% de cruzamentos férteis contra 82% na direção recíproca.

Comparações da fertilidade dos intercruzamentos com o controle mostraram o seguinte:

- Comparando-se os resultados dos intercruzamentos que envolveram fêmeas B50Q3, com os cruzamentos controle B50Q3, além dos intercruzamentos com machos B20D2 (que não produziram descendentes) foram significativas as diferenças com os intercruzamentos envolvendo machos B31D1, A95F3 e B25D7.
- Comparando-se com o controle, os resultados dos intercruzamentos que envolveram os machos B50Q3, foram significativas as diferenças dos intercruzamentos com fêmeas A95F3, B20D2 e B25D7.

Os valores de DMS nas comparações dos intercruzamentos foram variáveis, da mesma maneira que nas demais comparações de todos os intercruzamentos deste trabalho.

b.2. Cruzamentos da linhagem isofêmea B59Q1

A comparação entre os recíprocos nestes intercruzamentos (Tabela 5) mostrou duas situações:

- Cruzamentos altamente férteis nas duas direções. Aqui se incluem, cruzamentos de B59Q1 com B50Q3 (já mencionado no ítem anterior), com A55F11 (100% e 96%) e com B31D1 (98% e 96%). Em nenhum desses casos, houve diferença significativa entre os recíprocos.
- Cruzamentos com uma direção altamente fértil e a outra pouco fértil. Esta situação foi encontrada nos intercruzamentos com A95F3

Tabela 5. Fertilidade e fecundidade dos intercruzamentos realizados com a linhagem B59Q1. **F:** fêmeas; **M:** machos; **N:** número de cruzamentos férteis em 50, **X:** média e **S:** desvio padrão do número de descendentes produzidos por casal. **V.A:** valores absolutos dos contrastes (X-64,85) para comparações múltiplas de Tukey quanto à fecundidade. DMS=23,67; *: p<0,05.

Cruzamentos		Cruzamentos Férteis		Fecundidade			Fertilidade
F	M	N	%	X	S	V.A	de F1
B59Q1	B59Q1	50	98	64,85	36,11		+
B59Q1	B50Q3	49	98	113,25	35,17	48,39*	+
B50Q3	B59Q1	49	98	93,18	44,45	28,33*	+
B59Q1	A55F11	50	100	95,64	30,41	30,78*	+
A55F11	B59Q1	48	96	76,65	39,03	11,79	+
B59Q1	B31D1	48	96	97,10	38,66	32,25*	+
B31D1	B59Q1	49	98	84,27	36,82	19,41	+
B59Q1	A95F3	44	88	84,14	48,78	19,28	-
A95F3	B59Q1	6	12	20,50	17,45		-
B59Q1	B20D2	10	20	4,00	4,88		-
B20D2	B59Q1	41	82	22,88	16,49	41,97*	-
B59Q1	B25D7	8	16	16,75	19,97	48,10*	-
B25D7	B59Q1	38	76	18,68	20,10	46,17*	-

(88% e 12%), B20D2 (82% e 20%) e B25D7 (76% e 16%), nos quais as diferenças, entre os recíprocos, foram significativas.

Em nenhum intercruzamento uma das direções foi totalmente estéril.

A comparação dos resultados dos intercruzamentos que envolveram fêmeas B59Q1, com os cruzamentos controle B59Q1, mostrou diferenças significativas para os intercruzamentos com B20D2 e B25D7. Quanto cruzamentos recíprocos, foram significativas, as diferenças dos intercruzamentos que envolveram fêmeas A95F3 e fêmeas B20D2.

b.3. Cruzamentos da linhagem isofêmea A55F11

Quanto às diferenças entre os recíprocos, neste grupo de intercruzamentos (Tabela 6) foram observadas as seguintes situações:

- Cruzamentos altamente férteis em ambas as direções. Nesta situação enquadram-se os intercruzamentos com B50Q3 (96% e 94%), com B59Q1 (100% e 96%) e com B31D1 (100% e 96%).
- Cruzamentos com fertilidade regular em uma direção e baixa na outra. Esta situação foi encontrada nos cruzamentos de A55F11 com A95F3 (40% e 20%).
- Cruzamentos em que uma direção apresentou fertilidade elevada e a recíproca foi estéril ou quase estéril. Este foi o caso dos intercruzamentos de A55F1 com B20D2 ou B25D7.

Nos cruzamentos em que foram utilizados machos A55F11 e fêmeas B20D2 ou B25D7, a fertilidade obtida foi alta (respectivamente 70% e 94%), mas os cruzamentos recíprocos foram estéreis (no caso de B20D2) ou quase estéreis (no caso de B25D7,2%).

Tabela 6. Fertilidade e fecundidade dos intercruzamentos realizados com a linhagem A55F11. **F:** fêmeas; **M:** machos; **N:** número de cruzamentos férteis em 50, **X:** média e **S:** desvio padrão do número de descendentes produzidos por casal. **V.A:** valores absolutos dos contrastes (X-65,00) para comparações múltiplas de Tukey quanto à fecundidade. DMS=20,45; *: p<0,05.

Cruzamentos		Cruzamentos Férteis		Fecundidade			Fertilidade
F	M	N	%	X	S	V.A	de F1
A55F11	A55F11	50	100	65,00	33,87		
A55F11	B50Q3	47	94	84,21	31,32	19,20	+
B50Q3	A55F11	49	96	76,13	35,89	11,12	+
A55F11	B59Q1	48	96	76,65	39,03	11,64	+
B59Q1	A55F11	50	100	95,64	30,41	30,64*	+
A55F11	B31D1	50	100	61,08	30,14	3,92	+
B31D1	A55F11	48	96	66,29	30,69	1,29	+
A55F11	A95F3	20	40	63,60	43,19	1,40	-
A95F3	A55F11	10	20	19,80	19,75	45,20*	-
A55F11	B20D2	0	0	-	-		
B20D2	A55F1	35	70	34,86	20,13	30,14*	-
A55F11	B25D7	1	2	8,00			-
B25D7	A55F11	47	94	26,47	13,44		-

Nas comparações entre os recíprocos, foram significativas as diferenças observadas nos intercruzamentos de A55F11 com A95F3, B20D2 e B25D7.

Comparando-se os resultados dos intercruzamentos que envolveram fêmeas A55F11, com os cruzamentos controle A55F11, além dos intercruzamentos com B20D2 (que não produziram descendentes) e com B25D7 (quase estéril), foi significativa apenas a diferença constatada nos intercruzamentos com machos A95F3.

Comparando-se os resultados dos intercruzamentos envolvendo os machos A55F11, com os do cruzamentos controle, foram significativas as diferenças obtidas nos intercruzamentos com fêmeas A95F3 e B20D2.

b.4. Cruzamentos da linhagem isofêmea B31D1

Como já foi mencionado nos ítens anteriores, ocorreu uma alta porcentagem de cruzamentos férteis nos intercruzamentos de B31D1 com B50Q3, B59Q1 e A55F11 nas duas direções (Tabela 7).

Outras situações encontradas foram as seguintes:

- Intercruzamentos em uma direção com alta fertilidade e a outra pouco fértil (é o caso dos cruzamentos com B25D7, 76% e 14%).
- Intercruzamentos em uma direção com fertilidade baixa ou regular e na outra estéril (fêmeas B20D2 com machos B31D1, com fertilidade de 46% e o recíproco estéril; fêmeas B31D1 com machos A95F3 com fertilidade baixa, 28% e o recíproco estéril). Todas essas diferenças entre os recíprocos foram significativas.

Observa-se que, em diferentes combinações, fêmeas ou machos B31D1 produziram cruzamentos estéreis.

Tabela 7. Fertilidade e fecundidade dos intercruzamentos realizados com a linhagem B31D1. **F:** fêmeas; **M:** machos; **N:** número de cruzamentos férteis em 50, **X:** média e **S:** desvio padrão do número de descendentes produzidos por casal. **V.A:** valores absolutos dos contrastes (X-34,72) para comparações múltiplas de Tukey quanto à fecundidade. DMS=19,38; *: p<0,05; #: número total de cruzamentos.

Cruzamentos		Cruzamentos Férteis		Fecundidade			Fertilidade
F	M	N	%	X	S	V.A	de F1
B31D1	B31D1	49#	96	34,72	19,98		
B31D1	B50Q3	47	94	69,75	34,19	35,02*	+
B50Q3	B31D1	41	82	96,39	42,80	61,66*	+
B31D1	B59Q1	49	98	84,27	36,82	49,54*	+
B59Q1	B31D1	48	96	97,10	38,66	62,38*	+
B31D1	A55F11	48	96	66,29	30,69	31,56*	+
A55F11	B31D1	50	100	61,08	30,14	26,35*	+
B31D1	A95F3	14	28	10,93	7,59		-
A95F3	B31D1	0	0	-	-		
B31D1	B20D2	0	0	-	-		
B20D2	B31D1	23	46	12,57	9,18	22,15	ovos
B31D1	B25D7	7	14	13,57	9,47	21,15	-
B25D7	B31D1	38	76	11,74	10,01	22,98*	-

Comparando-se os resultados dos intercruzamentos envolvendo fêmeas B31D1, com os resultados dos cruzamentos controle dessa linhagem, além dos intercruzamentos com machos B20D2, os quais não produziram descendentes, foram significativas as diferenças de fertilidade nas comparações com os cruzamentos envolvendo machos A95F3 e B25D7.

Quanto aos intercruzamentos com machos B31D1, além dos cruzamentos envolvendo fêmeas A95F3, os quais foram estéreis, foram significativas as diferenças, em relação aos cruzamentos controle, dos intercruzamentos com fêmeas B20D2 e B25D7.

b.5. Cruzamentos da linhagem isofêmea A95F3

Na comparação entre recíprocos, o padrão de fertilidade predominante apresentou uma direção altamente fértil e a outra com baixa fertilidade. Aqui se incluem os cruzamentos de A95F3 com B25D7 (94% e 8%), B20D2 (96% e 22%) e B59Q1 (88% e 12%), com diferenças significativas em todos os casos (Tabela 8).

Outras situações foram observadas nos intercruzamentos com B50Q3, A55F11 e B31D1, já referidas em ítens anteriores, com porcentagem regular de cruzamentos férteis em ambas as direções no primeiro caso, uma direção com fertilidade regular e a outra com baixa fertilidade, no segundo caso, e no terceiro caso, uma das direções com baixa fertilidade e o recíproco estéril. As comparações entre recíprocos na primeira e segunda situações não foram significativas.

As menores porcentagens de cruzamentos férteis bem como um caso de esterilidade completa foram obtidas nos intercruzamentos com fêmeas A95F3.

Tabela 8. Fertilidade e fecundidade dos intercruzamentos realizados com a linhagem A95F3. **F:** fêmeas; **M:** machos; **N:** número de cruzamentos férteis em 50, **X:** média e **S:** desvio padrão do número de descendentes produzidos por casal. **V.A:** valores absolutos dos contrastes (X-67,33) para comparações múltiplas de Tukey quanto à fecundidade. DMS=22,41; *: p<0,05; #: número total de cruzamentos.

Cruzamentos		Cruzamentos Férteis		Fecundidade			Fertilidade
F	M	N	%	X	S	V.A	de Fi
A95F3	A95F3	49#	96	67,33	31,06		+
A95F3	B50Q3	34	68	32,35	32,69	34,97*	-
B50Q3	A95F3	24	48	81,71	62,83	14,38	-
A95F3	A55F11	10	20	19,80	19,75	47,52*	-
A55F11	A95F3	20	40	63,60	43,19	3,72	-
A95F3	B59Q1	6	12	20,50	17,45		-
B59Q1	A95F3	44	88	84,14	48,78	16,81	-
A95F3	B20D2	11	22	2,36	1,81		-
B20D2	A95F3	48	96	32,60	21,23	34,72*	-
A95F3	B25D7	4	8	6,25	1,50		-
B25D7	A95F3	47	94	24,00	13,82	43,32*	ovos
A95F3	B31D1	0	0	-	-		
B31D1	A95F3	14	28	10,93	7,59		-

Comparando-se com os cruzamentos controle A95F3, intercruzamento envolvendo fêmeas A95F3 e machos de todas as demais linhagens, em todos os casos, as diferenças na fertilidade foram significativas.

Na comparação dos intercruzamentos recíprocos (machos A95F3) com os cruzamentos controle, foram observadas diferenças significativas nos intercruzamentos com fêmeas B50Q3, A55F11 e B31D1.

b.6. Cruzamentos da linhagem isofêmea B20D2

A linhagem B20D2, também, apresentou padrões distintos de fertilidade nos diferentes intercruzamentos (Tabela 9), quanto à comparação dos recíprocos. A maioria dos casos já foi mencionada na descrição das tabelas anteriores.

Os intercruzamentos com B25D7 foram os únicos que apresentaram fertilidade alta em ambas as direções (84% e 82%).

Intercruzamentos com uma direção altamente fértil e a outra com baixa fertilidade foram aqueles com as linhagens B59Q1 e A95F3. Outros mostraram uma direção com fertilidade elevada e o recíproco estéril; é o caso dos cruzamentos com B50Q3 e com A55F11. Foi observada, ainda, outra situação em que uma das direções apresentou fertilidade regular e o recíproco foi estéril; é o caso dos intercruzamentos com B31D1. Todas as diferenças entre os recíprocos foram significativas.

Comparando-se os resultados dos intercruzamentos envolvendo fêmeas B20D2 e machos de todas as outras linhagens, com os cruzamentos controle B20D2, foram observadas diferenças

Tabela 9. Fertilidade e fecundidade dos intercruzamentos realizados com a linhagem B20D2. **F:** fêmeas; **M:** machos; **N:** número de cruzamentos férteis em 50, **X:** média e **S:** desvio padrão do número de descendentes produzidos por casal. **V.A:** valores absolutos dos contrastes (X-45,17) para comparações múltiplas de Tukey quanto à fecundidade. DMS=13,95; *: p<0,05.

Cruzamentos		Cruzamentos Férteis		Fecundidade			Fertilidade
F	M	N	%	X	S	V.A	de F1
B20D2	B20D2	50	82	45,17	27,37		+
B20D2	B25D7	42	84	37,02	26,34	8,14	+
B25D7	B20D2	41	82	34,49	24,31	10,68	+
B20D2	A95F3	48	96	32,60	21,23	12,56	-
A95F3	B20D2	11	22	2,36	1,81		-
B20D2	B59Q1	41	82	22,88	16,49	22,29*	-
B59Q1	B20D2	10	20	4,00	4,88		-
B20D2	B50Q3	43	86	35,84	24,83	9,33	-
B50Q3	B20D2	0	0	-	-		
B20D2	A55F11	35	70	34,86	20,13	10,31	-
A55F11	B20D2	0	0	-	-		
B20D2	B31D1	23	46	12,57	9,18		ovos
B31D1	B20D2	0	0	-	-		

significativas apenas nos cruzamentos com machos B31D1. Na comparação, com o controle, dos cruzamentos recíprocos, isto é, intercruzamentos de machos B20D2, exceto os que envolveram fêmeas B25D7, todos os demais mostraram diferenças significativas.

Este grupo foi o que apresentou o maior número de tipos de intercruzamentos totalmente estéreis e todos os casos de esterilidade envolveram machos B20D2.

b.7. Cruzamentos da linhagem isofêmea B25D7

Neste grupo de intercruzamentos (Tabela 10) foram observadas duas situações quanto à fertilidade: intercruzamentos que são altamente férteis em ambas as direções e intercruzamentos com uma direção de fertilidade elevada e a recíproca de fertilidade baixa. O primeiro caso refere-se aos intercruzamentos com B20D2 e o segundo, com as demais linhagens, todos já referidos em ítens anteriores.

Os intercruzamentos que apresentaram baixa fertilidade ou quase esterilidade envolveram sempre os machos de B25D7 (com fêmeas B50Q3, B59Q1, A95F3 ou B31D1), sendo que os cruzamentos recíprocos tiveram fertilidade elevada.

Também neste grupo como no de B20D2, todos os recíprocos mostraram diferenças significativas, exceto nos intercruzamentos de B25D7 com B20D2.

Não houve diferenças significativas, quanto à fertilidade, na comparação dos resultados dos intercruzamentos que envolveram fêmeas B25D7 com o controle. Entretanto, todos os intercruzamentos envolvendo machos B25D7, quando comparados com o

controle, mostraram diferenças significativas, com exceção dos intercruzamentos de B25D7 com B20D2.

b.8. Cruzamentos da linhagem de **Drosophila buzzatii** (BUZ)

Apenas os intercruzamentos de fêmeas B25D7 ou B20D2 com machos BUZ mostraram alguma fertilidade, tendo produzido 6 e 2 pupas respectivamente, as quais não chegaram à fase adulta.

Tabela 10. Fertilidade e fecundidade dos intercruzamentos realizados com a linhagem B25D7. **F:** fêmeas; **M:** machos; **N:** número de cruzamentos férteis em 50, **X:** média e **S:** desvio padrão do número de descendentes produzidos por casal. **V.A:** valores absolutos dos contrastes (X-62,00) para comparações múltiplas de Tukey quanto à fecundidade. DMS=15,19; *: p<0,05.

Cruzamentos		Cruzamentos Férteis		Fecundidade			Fertilidade
F	M	N	%	X	S	V.A	de F1
B25D7	B25D7	50	90	62,00	40,57		+
B25D7	B20D2	41	82	34,49	24,31	27,51*	+
B20D2	B25D7	42	84	37,02	26,34	24,97*	+
B25D7	B50Q3	41	82	44,27	21,85	17,33*	-
B50Q3	B25D7	7	14	11,86	7,93		-
B25D7	B59Q1	38	76	18,68	20,10	43,31*	-
B59Q1	B25D7	8	16	16,75	19,97	45,25*	-
B25D7	A55F11	47	94	26,47	13,44		-
A55F11	B25D7	1	02	8,00			-
B25D7	A95F3	47	94	24,00	13,82		ovos
A95F3	B25D7	4	8	6,25	1,50		-
B25D7	B31D1	38	76	11,74	10,01		-
B31D1	B25D7	7	14	13,57	9,47		-

1.2. Fecundidade

A fecundidade dos intra e intercruzamentos foi avaliada, separadamente, em cada conjunto de tubos, na sequência dos repiques. Para fins de análise da fecundidade foram considerados os intracruzamentos (Tabela 3) e os mesmos conjuntos de intercruzamentos estabelecidos para análise da fertilidade, isto é, todos os intercruzamentos de uma linhagem com as demais (Tabelas 4 a 10). Os cruzamentos foram considerados de alta fecundidade quando o número médio de descendentes foi igual ou superior ao controle.

a. Intracruzamentos

Os valores de fecundidade dos intracruzamentos, representados pelas médias totais e desvio padrão da amostra, em cada conjunto de tubos e no total, estão na Tabela 3.

Considerando as médias totais, os intracruzamentos mais produtivos foram os de B50Q3 (X=72), seguidos, em ordem decrescente, dos de A95F3, de A55F11, de B59Q1 e B25D7 (com Xs variando de 67 a 62). As linhagens B20D2 e B31D1 apresentaram as fecundidades mais baixas (X=45 e X=35, respectivamente). Foram significativas as diferenças das médias de produtividade da linhagem B31D1 quando comparada com B50Q3, B59Q1, A55F11, A95F3 e também na comparação de B20D2, com B50Q3 e A95F3 (Tabela 11).

As curvas de distribuição da produtividade média dos diferentes intracruzamentos estão na Figura 1. Com base nas variações dos valores dessas médias, nas séries de tubos, foi estabelecida a comparação de que resultou a organização da figura, reunindo, em duplas, as de perfil mais parecido. Esta comparação

Tabela 11. Comparações múltiplas de Tukey, quanto à fecundidade, dos intracruzamentos. DMS=20 e P<0,05.

	B50Q3	B59Q1	A55F11	A95F3	B25D7
B31D1	37,31*	30,13*	30,27*	32,60*	27,27*
B20D2	26,87*			22,15*	

mostra que:

a- Os intracruzamentos de B50Q3 diferiram mais acentuadamente dos demais, na distribuição das médias ao longo da série de tubos, sendo que a maior média deste intracruzamento foi obtida no conjunto de primeiros tubos e a menor nos terceiros tubos (Figura 1A).

b- Os intracruzamentos de B20D2 e A55F11 mostraram padrões semelhantes na distribuição da produtividade média nos conjuntos de tubos (Figura 1B), sendo maior no conjunto de primeiros e segundos tubos e decrescendo nos conjuntos seguintes. A produtividade de A55F11, porém foi sempre superior à de B20D2, a qual mostrou diferenças significativas no conjunto de segundos tubos ($t=2,24$; $P<0,05$) e no conjunto de quartos tubos ($t=2,74$; $P<0,05$).

c- As linhagens B59Q1 e B25D7 assemelham-se também, quanto ao padrão de distribuição da produtividade média na série de tubos analisados, apresentando média superior nos conjuntos de primeiros e segundos tubos. No conjunto de segundos tubos, a produtividade de B59Q1 foi superior à de B25D7, entretanto, essa diferença de médias não foi significativa (Figura 1 C).

d- Também apresentaram semelhanças quanto ao perfil, as curvas de produtividade dos intracruzamentos de A95F3 e B31D1, embora a média de descendentes em cada série de tubos tenha sido superior nos intracruzamentos de A95F3, exceto no conjunto de primeiros tubos onde ambas as linhagens mostraram fecundidade muito baixa. As diferenças foram significativas no conjunto de segundos tubos ($t=3,61$; $P< 0,05$), terceiros tubos ($t=4,92$; $P< 0,05$) e quartos tubos ($t=3,25$, $P< 0,05$). Nas duas linhagens, a maior produtividade média foi atingida no conjunto de terceiros tubos (Figura 1D).

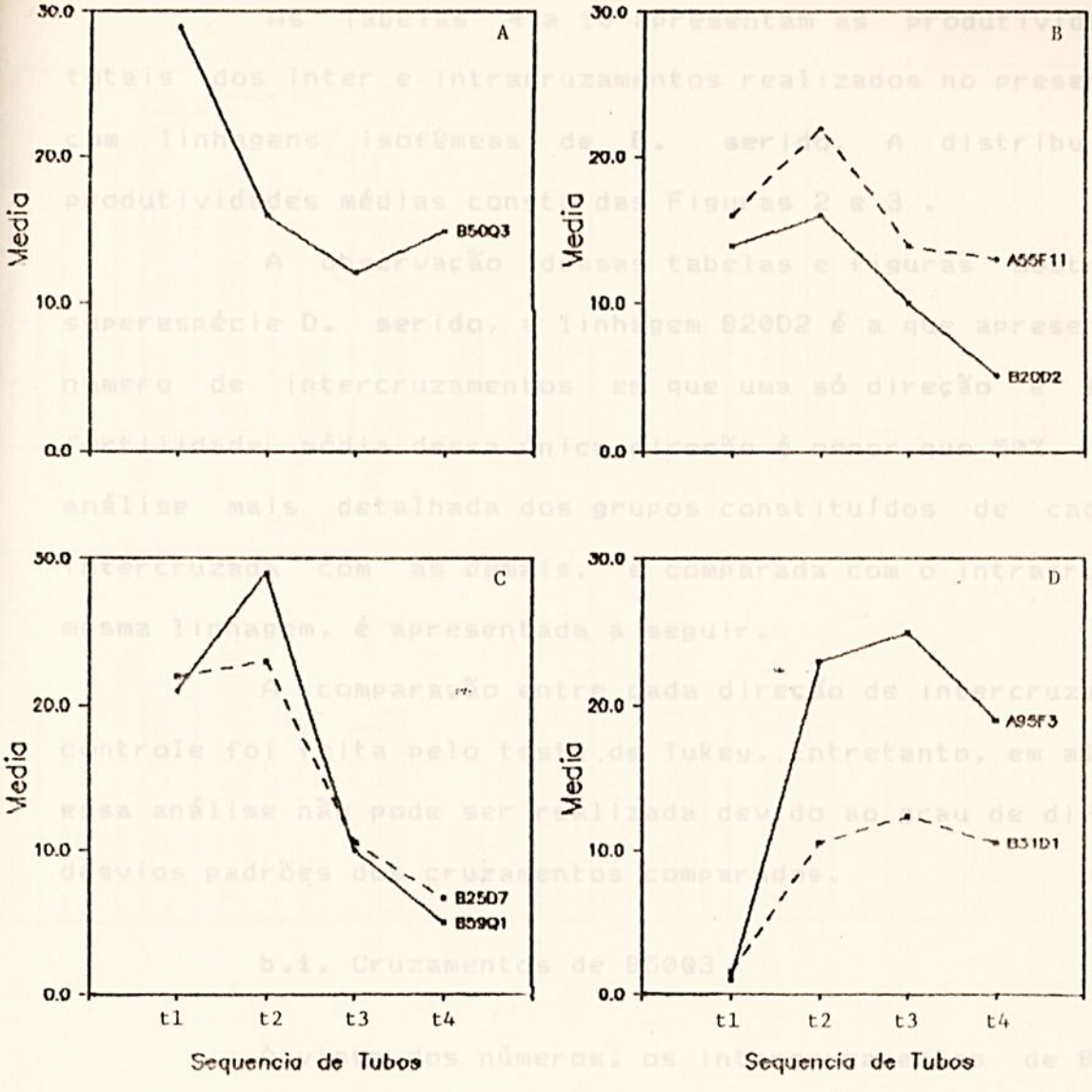


Figura 1A-D. Perfil da média de produtividade dos intracruzamentos nos quatro conjuntos de tubos, reunidas de acordo com a semelhança dos mesmos.

b. Intercruzamentos

As Tabelas 4 a 10 apresentam as produtividades médias totais dos inter e intracruzamentos realizados no presente trabalho com linhagens isofêmeas de **D. serido.** A distribuição dessas produtividades médias consta das Figuras 2 e 3 .

A observação dessas tabelas e figuras mostra que, na superespécie **D. serido**, a linhagem B20D2 é a que apresenta o maior número de intercruzamentos em que uma só direção é fértil e a fertilidade média dessa única direção é menor que 50%. Porém, uma análise mais detalhada dos grupos constituídos de cada linhagem intercruzada com as demais, e comparada com o intracruzamento da mesma linhagem, é apresentada a seguir.

A comparação entre cada direção de intercruzamento e o controle foi feita pelo teste de Tukey. Entretanto, em alguns casos, essa análise não pode ser realizada devido ao grau de diferença dos desvios padrões dos cruzamentos comparados.

b.1. Cruzamentos de B50Q3

À vista dos números, os intercruzamentos de B50Q3 com as linhagens B59Q1, A55F11 e B31D1 apresentaram fecundidade maior ou pelo menos igual à do controle. Diferenças significativas na comparação estatística com o controle foram obtidas em cruzamentos de machos B50Q3 com fêmeas B59Q1, A95F3, B20D2 e B25D7. A direção de cruzamento de machos B50Q3 com B20D2 e B25D7, de alta fertilidade, mostrou redução da fecundidade à aproximadamente metade da do controle. Quanto ao intercruzamento com A95F3, a direção mais fértil

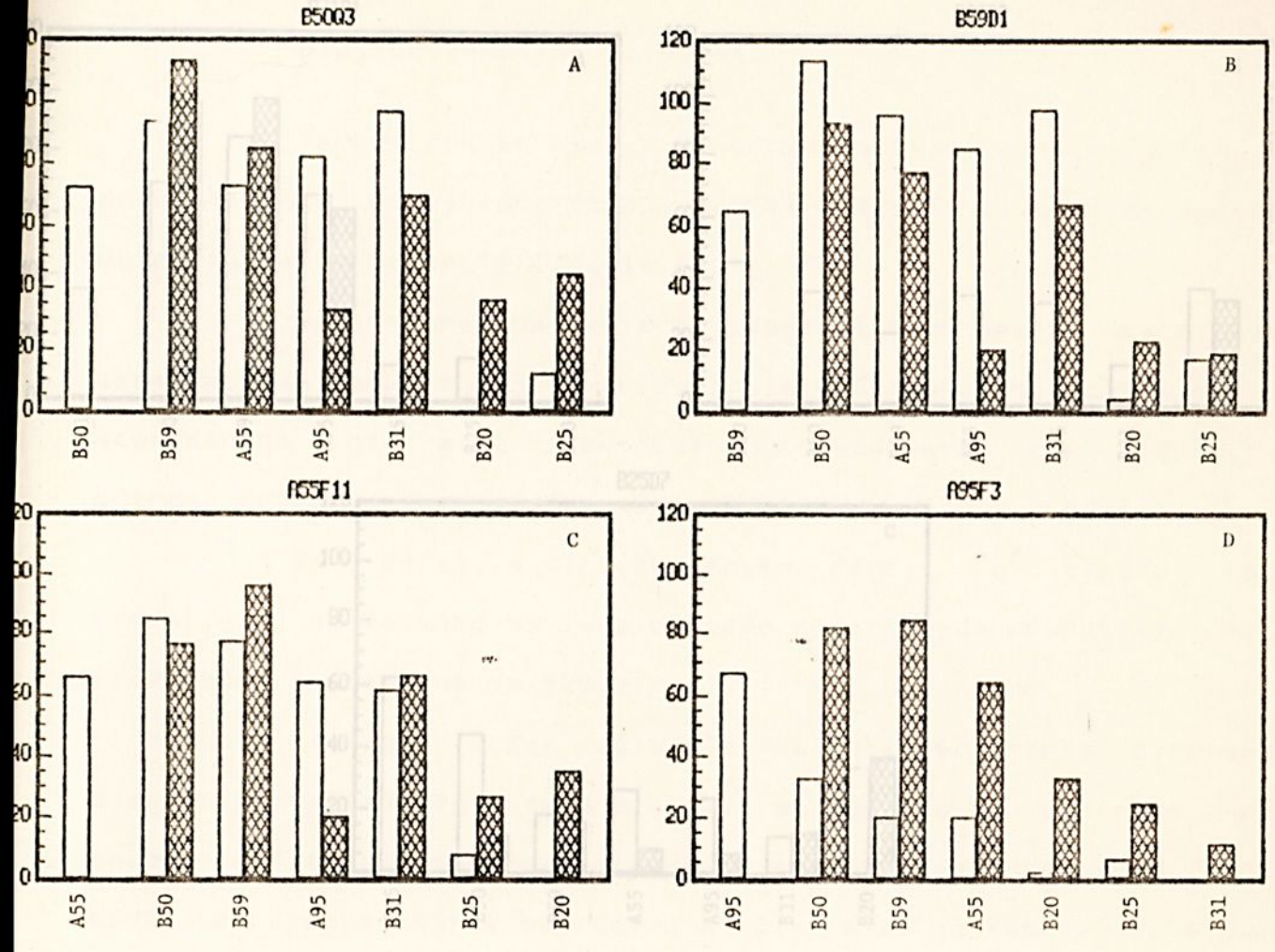


Figura 2A-D. Distribuição das produtividades médias totais dos intercruzamentos das linhagens: B50Q3, B59Q1 A55F11 e A95F3 nas duas direções. A coluna vazia refere-se em todos os casos, aos cruzamentos de fêmeas da linhagem referida com machos das demais, e a coluna cheia, aos recíprocos.

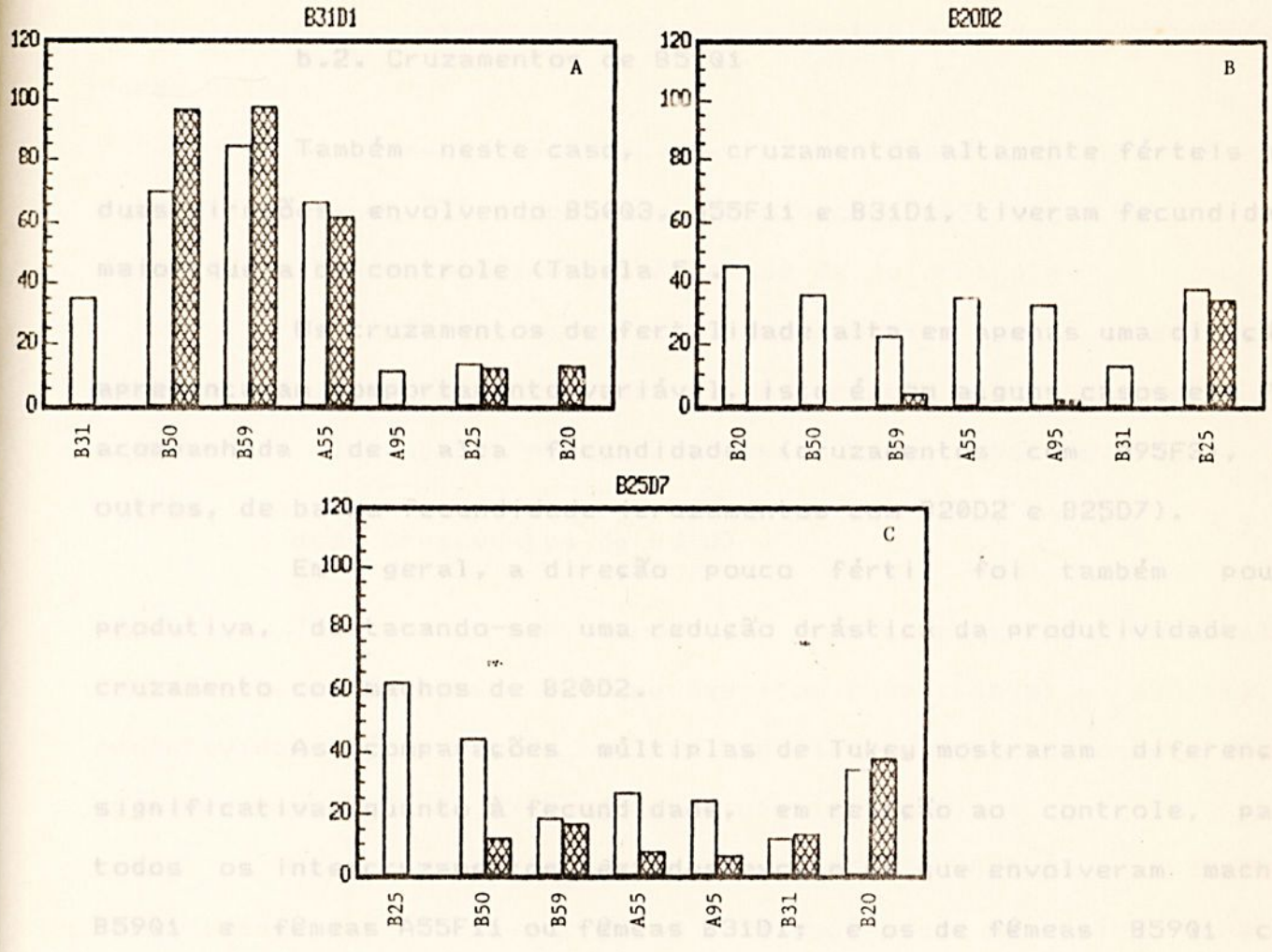


Figura 3A-C. Distribuição das produtividades médias totais dos intercruzamentos das linhagens: B31D1,B20D2 e B25D7. nas duas direções. A coluna vazia refere-se em todos os casos, aos cruzamentos de fêmeas da linhagem referida com machos das demais, e a coluna cheia, aos recíprocos.

(envolvendo machos B50Q3) apresentou produtividade média inferior à metade da observada na direção recíproca, menos fértil (Tabela 4).

b.2. Cruzamentos de B59Q1

Também neste caso, os cruzamentos altamente férteis nas duas direções, envolvendo B50Q3, A55F11 e B31D1, tiveram fecundidade maior que a do controle (Tabela 5).

Os cruzamentos de fertilidade alta em apenas uma direção, apresentaram comportamento variável, isto é, em alguns casos ela foi acompanhada de alta fecundidade (cruzamentos com A95F3), em outros, de baixa fecundidade (cruzamentos com B20D2 e B25D7).

Em geral, a direção pouco fértil foi também pouco produtiva, destacando-se uma redução drástica da produtividade no cruzamento com machos de B20D2.

As comparações múltiplas de Tukey mostraram diferenças significativas quanto à fecundidade, em relação ao controle, para todos os intercruzamentos testados exceto os que envolveram machos B59Q1 e fêmeas A55F11 ou fêmeas B31D1; e os de fêmeas B59Q1 com machos A95F3.

b.3. Cruzamentos de A55F11

Neste grupo, os intercruzamentos que apresentaram alta fertilidade em ambas as direções, mostraram padrões diferentes de fecundidade (Tabela 6). Também à vista dos números, nos cruzamentos envolvendo as linhagens B50Q3 e B59Q1 a fecundidade foi superior à do controle e nos cruzamentos com B31D1 a fecundidade obtida foi semelhante à do controle.

Os intercruzamentos com machos A95F3 apresentaram apenas 40% de cruzamentos férteis mas tiveram fecundidade semelhante à do controle. No cruzamento recíproco a fertilidade e a fecundidade foram baixas.

Na direção de cruzamentos com B20D2 e B25D7, de alta fertilidade (nos dois casos envolvendo machos A55F11), a fecundidade foi reduzida, aproximadamente, à metade da do controle.

A análise estatística comparativa mostrou diferença significativa da produtividade, em relação ao controle, nos cruzamentos de machos A55F11 com fêmeas B59Q1, A95F3 e B20D2.

b.4. Cruzamentos de B31D1

Em todos os tipos de intercruzamentos com alta fertilidade, em ambas as direções (com B50Q3, B59Q1 e A55F11), a produtividade média obtida foi bem superior (o dobro ou o triplo) à do intracruzamento de B31D1 (controle) (Tabela 7).

Nos intercruzamentos com A95F3, B20D2 ou B25D7 a fecundidade foi baixa em ambas as direções ou na única direção fértil, independentemente da fertilidade ser alta, média ou baixa.

Foram significativas, nas comparações múltiplas, as diferenças de fecundidade, em relação ao controle, de todos os intercruzamentos, exceto os de fêmeas B20D2 com machos B31D1 e de fêmeas B31D1 com machos B25D7.

b.5. Cruzamentos de A95F3

Também neste caso foram observados padrões variados na comparação da fertilidade com a fecundidade nos diferentes

intercruzamentos, relativamente ao controle (Tabela 8). Alguns desses padrões já foram destacados em ítens anteriores.

Nos intercruzamentos de machos A95F3 com fêmeas B50Q3 e B59Q1, o primeiro com fertilidade regular e o segundo, alta, a produtividade média obtida foi superior à do controle e no intercruzamento com fêmeas A55F11, de fertilidade também regular, a fecundidade foi semelhante à do controle.

Os intercruzamentos que apresentaram as menores produtividades foram aqueles envolvendo fêmeas A95F3 com machos B20D2 e B25D7 e os de fêmeas B31D1 com machos A95F3. Entre eles, os de mais baixa fertilidade foram os de fêmeas A95F3 com machos B25D7.

Os cruzamentos de machos A95F3 com fêmeas B20D2 ou B25D7, que apresentaram alta fertilidade, mostraram uma fecundidade inferior à metade da obtida na linhagem parental.

Nas comparações múltiplas, as diferenças de produtividade, com relação ao controle, foram significativas nos intercruzamentos envolvendo machos A95F3 e fêmeas B20D2 e B25D7 e de fêmeas A95F3 com machos A55F11 e B50Q3.

b.6. Cruzamentos de B20D2

Neste tipo de intercruzamentos não foi observado nenhum caso com produtividade superior à do controle (Tabela 9). Mas foram obtidas produtividades médias não muito inferiores à do controle nos intercruzamentos de fêmeas B20D2 com machos B25D7, B50Q3, A55F11, B20D2 e A95F3. Em todos estes intercruzamentos a fertilidade foi elevada.

Os intercruzamentos de machos B20D2 com fêmeas A95F3 ou

fêmeas B59Q1, que apresentaram baixa fertilidade também mostraram baixa fecundidade.

Este grupo de intercruzamentos foi, de modo geral, o que apresentou as menores médias de produtividade.

Além dos intercruzamentos que apresentaram diferenças óbvias de fecundidade média, com relação ao controle, entre as comparações estatísticas realizadas, apenas uma foi significativa, envolvendo os cruzamentos de fêmeas B20D2 com machos B59Q1.

b.7. Cruzamentos de B25D7

Em todos os intercruzamentos deste grupo, a produtividade média obtida foi inferior à do controle (Tabela 10). Todos os casos estatisticamente analisados mostraram que as diferenças foram significativas, mesmo no intercruzamento em que a média de produtividade menos se diferenciou da média controle, que foi o de fêmeas B25D7 com machos B50Q3, o qual apresentou alta fertilidade.

Os intercruzamentos de fêmeas B25D7 com machos B59Q1, A55F11, A95F3 e B31D1, que apresentaram fertilidade alta, mostraram fecundidade baixa. Os cruzamentos recíprocos e os cruzamentos de fêmeas B50Q3 e machos B25D7 apresentaram as menores fecundidades e fertilidades.

Os cruzamentos com B20D2 apresentaram alta fertilidade mas a fecundidade foi reduzida aproximadamente à metade da do controle.

A análise da fecundidade, nos intercruzamentos, também foi feita separadamente, na sequência de tubos obtida por transferência dos casais, como foi feito para os dados obtidos nos

intracruzamentos. Os resultados constam da Tabela 12.

Esse conjunto de dados foi utilizado também para o estudo de técnica exploratória multivariada representada pela análise de conglomerados. Com esta finalidade, os dados foram primeiramente organizados na forma de uma matriz, na qual as linhas representam as produtividades médias, nas quatro séries de tubos obtidas por transferência para meio novo.

O método de agrupamento utilizado foi o "Average linkage" e a medida de dissimilaridade, foi a distância Euclidiana para os perfis médios de cada cruzamento.

Os dendogramas nas Figuras 4 e 5 foram construídos com dados obtidos por essa análise. Para sua construção foram tomados os dados de comparação dos intercruzamentos envolvendo fêmeas de uma mesma linhagem com machos de todas as outras e mais o controle (linhagem de origem das fêmeas). Admitimos assim, que uma variável é fixada (a produtividade de óvulos) e as variações de resultados podem ser atribuídas a diferenças na interação de fêmeas de um conjunto gênico comum com diferentes machos.

Como mostram os dendogramas, a análise de agrupamento reune as linhagens em diferentes níveis; quanto menor o nível, maior o grau de exigência no estabelecimento da proximidade entre elas.

Tomando por base os níveis 0,4 e 0,6, os agrupamentos podem ser resumidos da forma apresentada na Tabela 13. Considerando, ambos os níveis de cada relação entre fêmeas de uma linhagem e machos das demais, foram formados, no total, 26 agrupamentos de duas a quatro linhagens. Desses 26, 11 envolveram duas, três ou as quatro linhagens B50Q3, B59Q1, A55F11 e B31D1. Outros cinco agrupamentos

Tabela 12. Fecundidade dos intercruzamentos na sequência de tubos (t1-t4). F: fêmeas; M: machos; X: média e S: desvio padrão do número de descendentes produzidos por casal em cada conjunto de tubos.

Cruzamentos		t1		t2		t3		t4	
F	M	X	S	X	S	X	S	X	S
B50Q3	B59Q1	24,70	17,07	25,46	19,98	26,11	15,41	18,25	14,86
B50Q3	A55F11	16,50	11,86	28,21	14,29	24,37	13,10	15,55	13,41
B50Q3	B31D1	35,71	16,30	24,90	14,61	17,86	11,47	23,54	18,90
B50Q3	A95F3	7,92	13,93	38,17	26,18	29,71	25,94	5,83	16,23
B50Q3	B20D2	-	-	-	-	-	-	-	-
B50Q3	B25D7	0,00	0,00	9,86	7,11	0,14	0,38	1,86	4,91
B59Q1	B50Q3	37,37	10,86	31,39	17,73	28,77	13,94	18,15	13,82
B59Q1	A55F11	27,34	13,68	16,94	12,87	24,10	12,10	27,24	15,41
B59Q1	B31D1	26,73	13,33	42,02	18,03	15,80	9,01	16,68	12,72
B59Q1	A95F3	14,14	17,54	27,75	18,34	24,09	19,60	18,16	22,31
B59Q1	B20D2	0,50	0,97	0.00	0.00	0,40	0,84	3,10	5,24
B59Q1	B25D7	7,00	9,07	8,25	10,95	0,88	1,73	0,63	1,77
A55F11	B50Q3	18,33	15,09	27,08	16,88	27,37	15,08	14,26	11,31
A55F11	B59Q1	19,44	13,79	14,94	13,11	16,92	12,30	25,78	13,45
A55F11	B31D1	19,66	14,06	9,88	8,01	16,14	12,64	15,40	13,42
A55F11	A95F3	3,70	11,39	28,75	27,52	12,95	16,93	18,20	18,78
A55F11	B20D2	-	-	-	-	-	-	-	-
A55F11	B25D7	0,00	.	0,00	.	8,00	.	0,00	.
B31D1	B50Q3	20,49	15,90	20,83	13,14	14,00	8,94	18,95	17,69
B31D1	B59Q1	24,94	13,40	28,06	16,56	16,69	14,30	14,57	14,00
B31D1	A55F11	25,06	16,23	7,40	8,25	20,75	12,93	13,29	14,06
B31D1	A95F3	2,79	5,74	2,04	3,58	6,07	7,61	0,00	0,00
B31D1	B20D2	-	-	-	-	-	-	-	-
B31D1	B25D7	11,00	8,17	1,86	3,19	0,72	1,89	0,00	0,00
A95F3	B50Q3	8,99	13,06	12,74	18,62	9,12	14,22	1,53	4,64
A95F3	B59Q1	0.00	0.00	8,67	15,64	8,17	17,23	3,67	8,98
A95F3	A55F11	3,30	7,27	8,60	8,40	7,11	16,11	1,50	3,24
A95F3	B31D1	-	-	-	-	-	-	-	-
A95F3	B20D2	1,36	1,43	0,82	1,54	0,18	0,60	0,00	0,00
A95F3	B25D7	6,25	1,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B20D2	B50Q3	18,67	15,62	7,91	9,46	7,75	10,43	1,51	3,60
B20D2	B59Q1	0,10	0,49	12,88	10,79	7,03	7,78	2,88	6,04
B20D2	A55F11	18,32	19,58	2,72	4,87	20,57	16,83	2,36	2,94
B20D2	B31D1	1,44	2,47	0,78	1,60	5,13	6,23	5,22	6,38
B20D2	A95F3	13,17	10,45	10,31	13,33	6,27	7,09	2,86	6,16
B20D2	B25D7	12,02	12,02	11,22	8,30	6,67	11,49	7,12	15,28
B25D7	B50Q3	11,54	10,67	18,42	10,65	9,54	9,18	4,78	8,58
B25D7	B59Q1	7,47	9,21	9,03	11,39	1,00	2,28	1,19	3,88
B25D7	A55F11	6,83	6,12	14,15	9,40	3,60	5,44	1,89	4,93
B25D7	B31D1	4,32	4,44	4,27	4,86	3,84	5,87	0,69	2,21
B25D7	A95F3	6,00	7,25	16,70	9,69	0,75	2,10	0,55	1,83
B25D7	B20D2	9,10	8,41	18,51	14,37	4,54	6,97	2,34	5,73

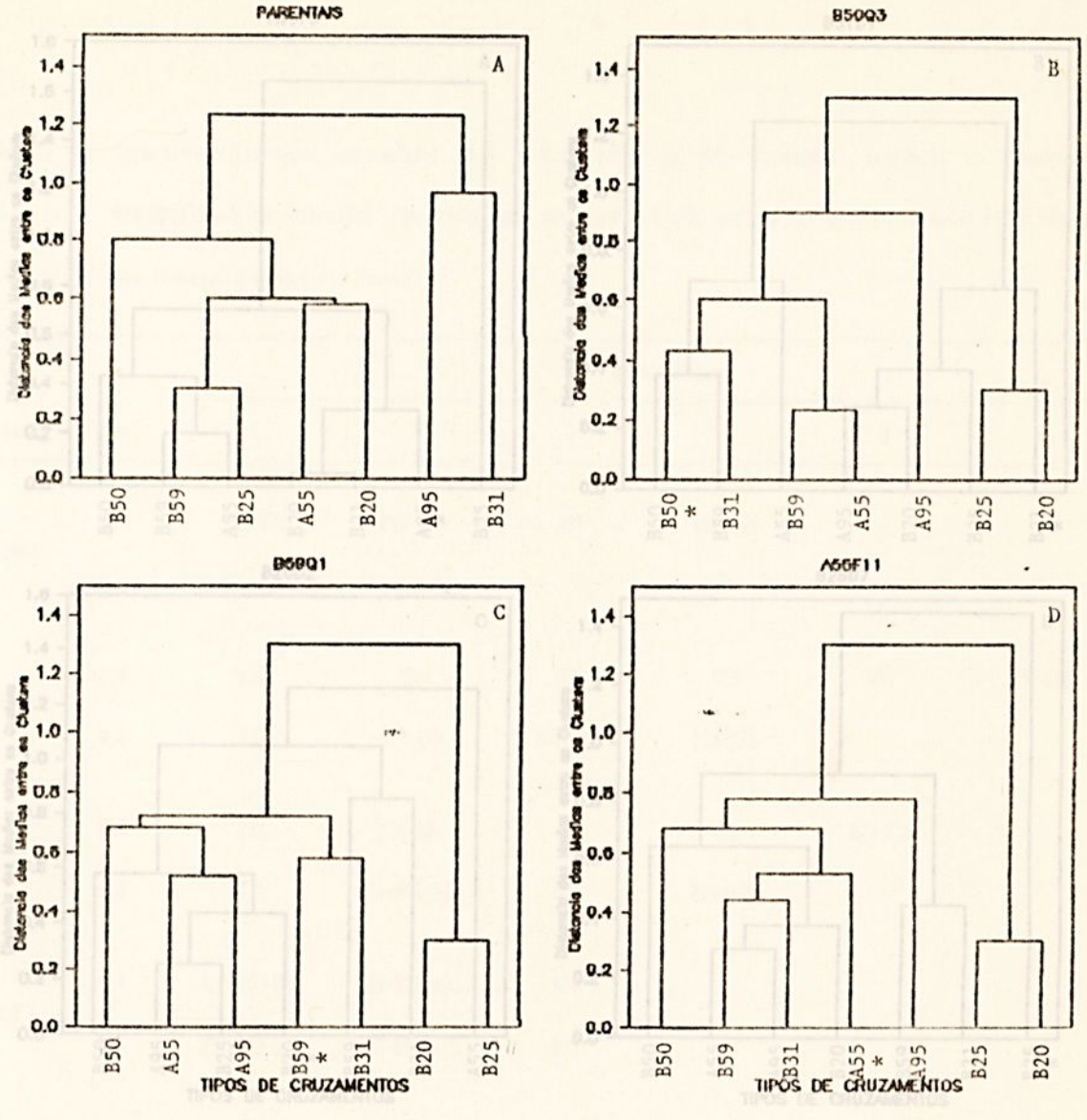


Figura 4A-D. Dendogramas mostrando as relações de proximidades das linhagens analisadas pelo método de "cluster analysis". A. Intracruzamentos (Parentais). B-D. Cruzamentos de fêmeas de cada linhagem referida com machos da mesma (*) e das demais.

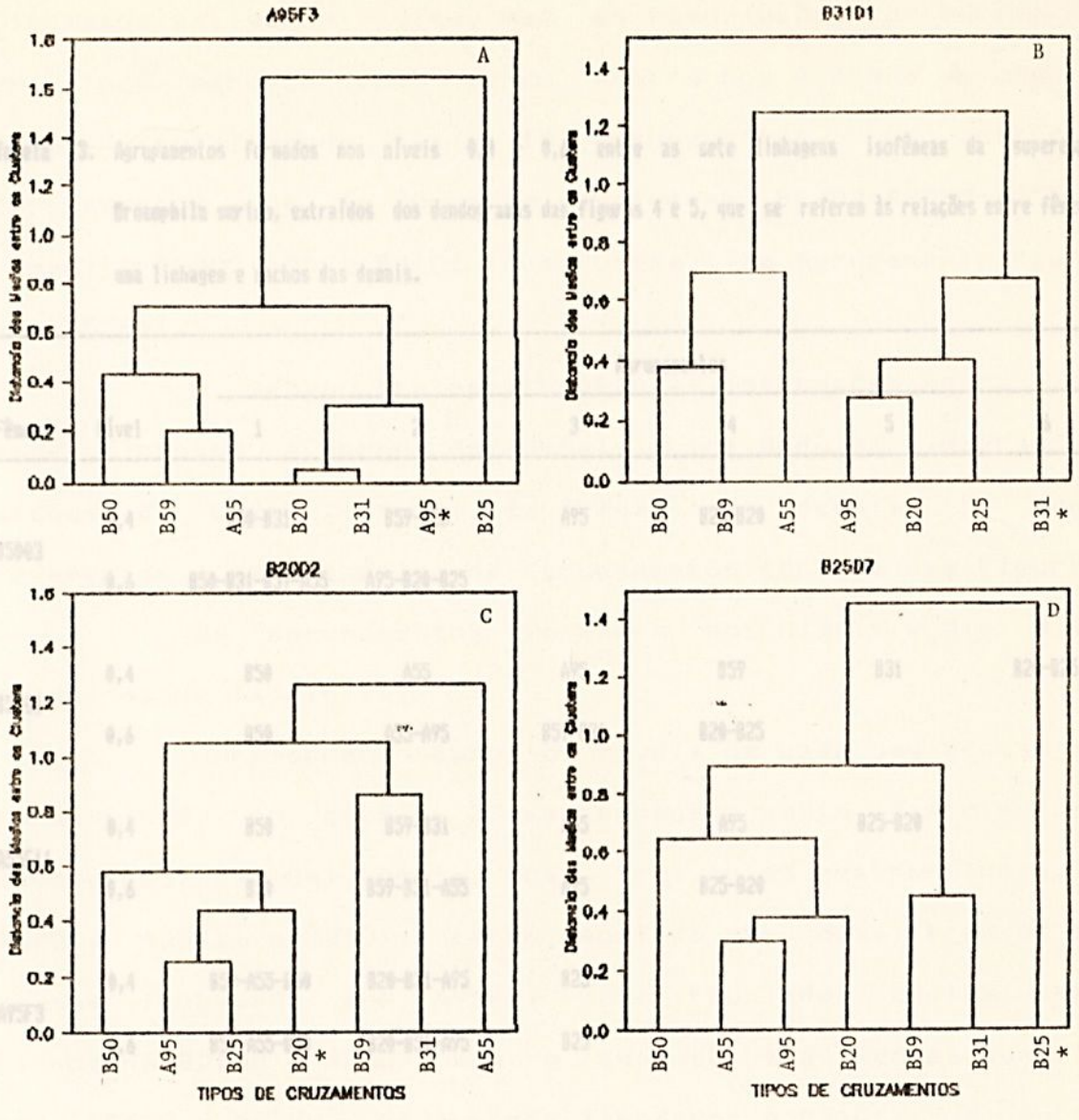


Figura 5A-D. Dendogramas mostrando as relações de proximidades das linhagens analisadas pelo método de "cluster analysis". A-D. Cruzamentos de fêmeas de cada linhagem referida com machos da mesma (*) e das demais.

Tabela 13. Agrupamentos formados nos níveis 0,4 e 0,6, entre as sete linhagens isofêmeas da superespécie *Drosophila serido*, extraídos dos dendogramas das figuras 4 e 5, que se referem às relações entre fêmeas de uma linhagem e machos das demais.

Fêmeas	Nível	Agrupamentos					
		1	2	3	4	5	6
B5003	0,4	B50-B31	B59-A55	A95	B25-B20		
	0,6	B50-B31-B59-A55	A95-B20-B25				
B5901	0,4	B50	A55	A95	B59	B31	B20-B25
	0,6	B50	A55-A95	B59-B31	B20-B25		
A55F11	0,4	B50	B59-B31	A55	A95	B25-B20	
	0,6	B50	B59-B31-A55	A95	B25-B20		
A95F3	0,4	B59-A55-B50	B20-B31-A95	B25			
	0,6	B59-A55-B50	B20-B31-A95	B25			
B31D1	0,4	B50-B59	A55	A95-B20-B25	B31		
	0,6	B50-B59	A55	A95-B20-B25	B31		
B20D2	0,4	B50	A95-B25-B20	B59	B31	A55	
	0,6	A95-B25-B50-B20	B59	B31	A55		
B25D7	0,4	B50	A55-A95-B20	B59	B31	B25	
	0,6	B50	A55-A95-B20	B59-B31	B25		

reuniram exclusivamente as linhagens B20D2 e B25D7. Essas mesmas linhagens estiveram juntas, mas, em associações com outras linhagens em cinco agrupamentos, sendo quatro com A95F3 e um com A95F3 e B50Q3, totalizando assim 10 agrupamentos. Os quatro outros agrupamentos que se formaram envolveram B20D2-A95F3-A55F11 (duas vezes) e B20D2-A95F3-B31D1 (duas vezes). Um agrupamento reuniu A95F3 com A55F11.

O mesmo tratamento dado às interações entre fêmeas de cada linhagem e machos das demais, foi dado às interações entre machos de cada linhagem e fêmeas das demais. Os dendogramas referentes a essa análise de agrupamentos constam das Figuras 6 e 7.

Os agrupamentos formados nos níveis 0,4 e 0,6 estão resumidos na Tabela 14.

Considerando ambos os níveis de cada uma dessas relações, formaram-se, no total, 23 agrupamentos assim distribuídos: seis envolvendo, exclusivamente, duas, três ou as quatro linhagens B50Q3, B59Q1, A55F11 e B31D1; cinco reunindo uma, duas, três ou as quatro mesmas linhagens com A95F3; dois reunindo, exclusivamente, as linhagens B20D2 e B25D7; quatro reunindo essas mesmas duas linhagens com A95F3, e um, essas três linhagens e B31D1; um outro grupo reunindo B20D2 e B25D7 com B31D1, e ainda outro, apenas B20D2 com B31D1; três agrupamentos reuniram B25D7 e A95F3.

A Tabela 15 reune os dados de agrupamentos para ambas as interações consideradas.

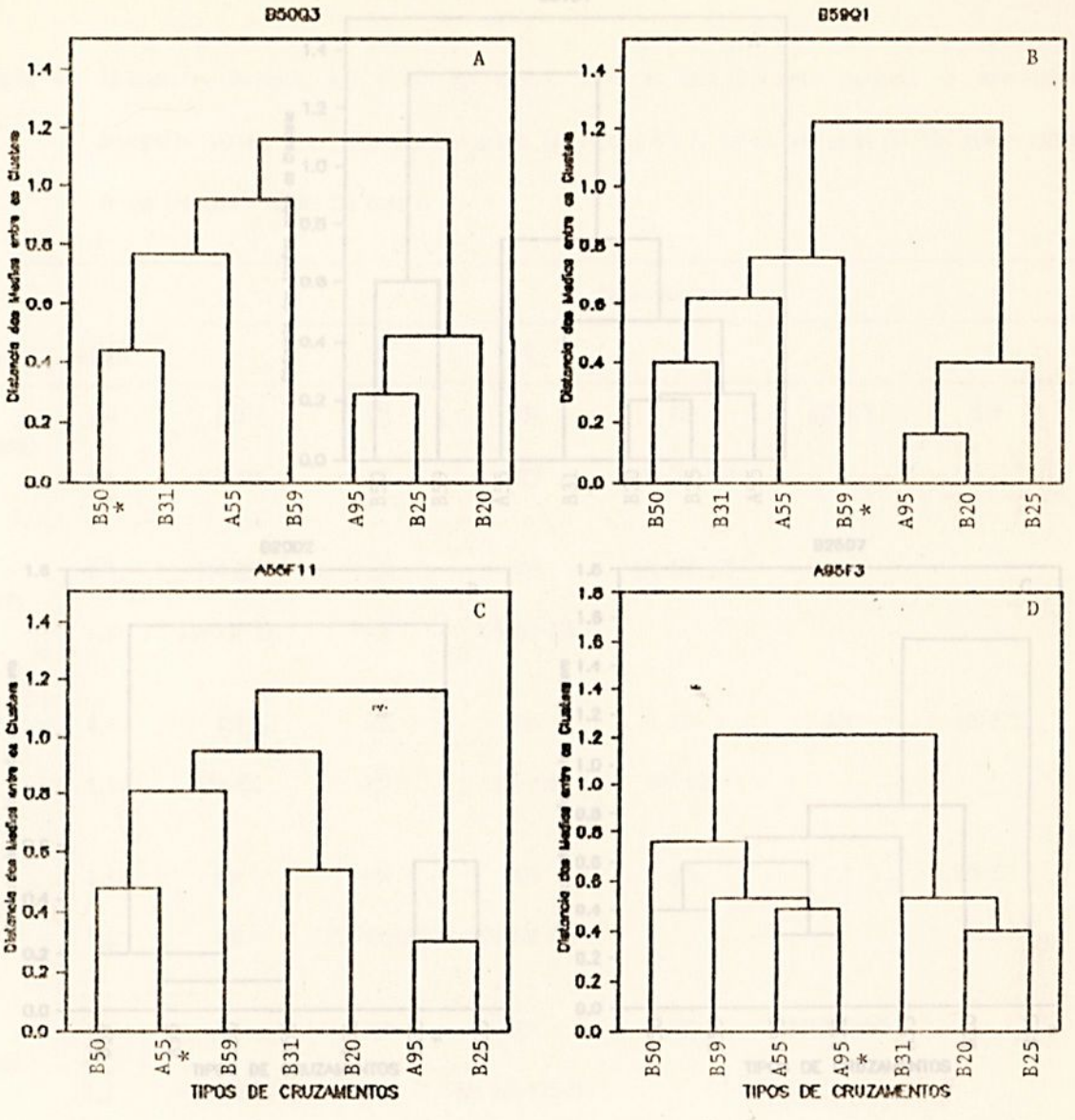


Figura 6A-D. Dendogramas mostrando as relações de proximidades das linhagens analisadas pelo método de "cluster analysis". A-D. Cruzamentos de machos de cada linhagem referida com fêmeas da mesma (*) e das demais.

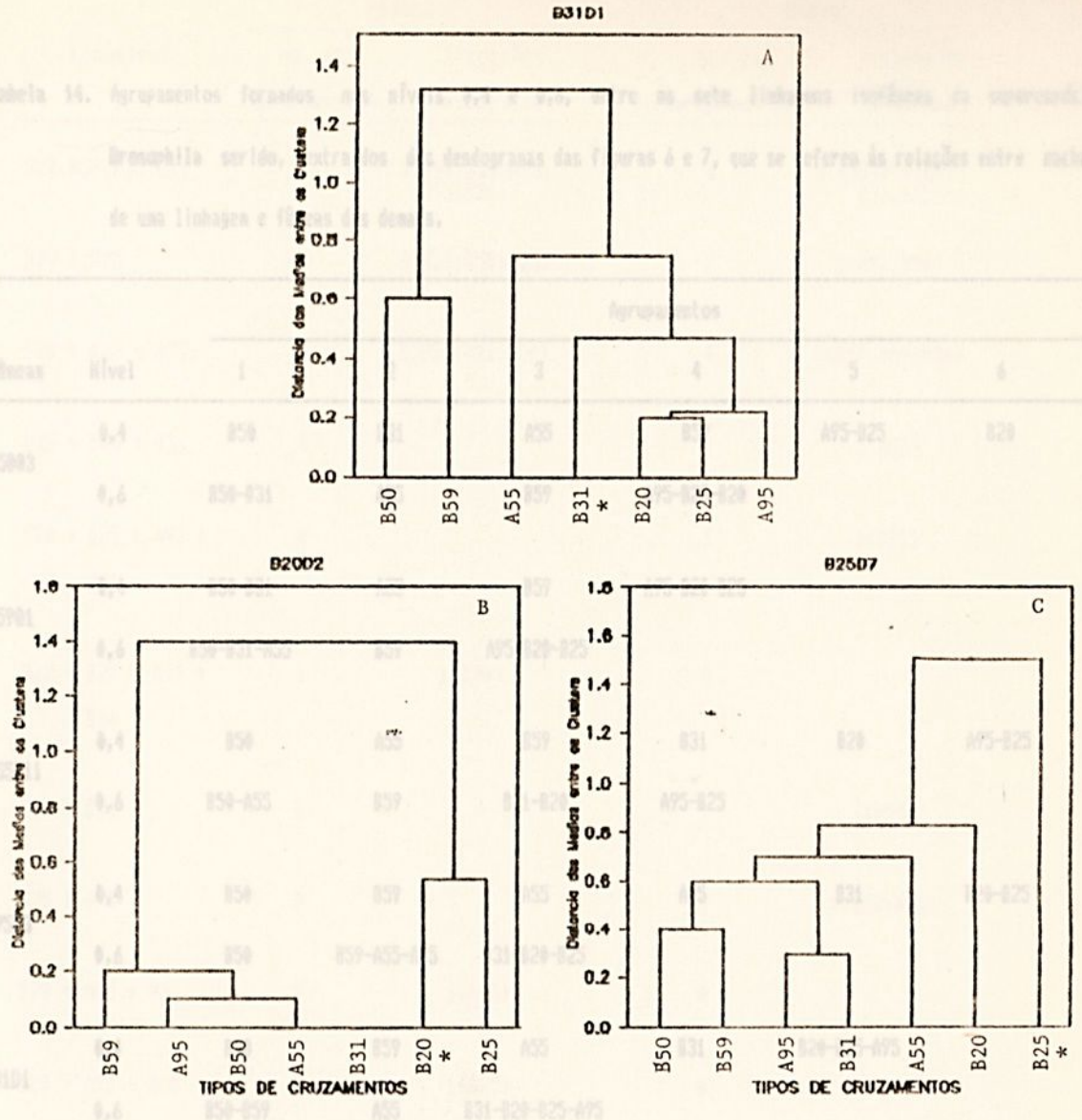


Figura 7A-C. Dendogramas mostrando as relações de proximidades das linhagens analisadas pelo método de "cluster analysis". A-C. Cruzamentos de machos de cada linhagem referida com fêmeas da mesma (*) e das demais.

Tabela 14. Agrupamentos formados nos níveis 0,4 e 0,6, entre as sete linhagens isofêmeas da superespécie *Drosophila serido*, extraídos dos dendogramas das figuras 6 e 7, que se referem às relações entre machos de uma linhagem e fêmeas das demais.

		Agrupamentos					
Fêmeas	Nível	1	2	3	4	5	6
B50Q3	0,4	B50	B31	A55	B59	A95-B25	B20
	0,6	B50-B31	A55	B59	A95-B25-B20		
B59Q1	0,4	B50-B31	A55	B59	A95-B20-B25		
	0,6	B50-B31-A55	B59	A95-B20-B25			
A55F11	0,4	B50	A55	B59	B31	B20	A95-B25
	0,6	B50-A55	B59	B31-B20	A95-B25		
A95F3	0,4	B50	B59	A55	A95	B31	B20-B25
	0,6	B50	B59-A55-A95	B31-B20-B25			
B31D1	0,4	B50	B59	A55	B31	B20-B25-A95	
	0,6	B50-B59	A55	B31-B20-B25-A95			
B20D2	0,4	B59-A95-B50-A55-B31	B20	B25			
	0,6	B59-A95-B50-A55-B31	B20-B25				
B25D7	0,4	B50-B59	A95-B31	A55	B20	B25	
	0,6	B50-B59-A95-B31	A55	B20	B25		

Tabela 15. Visão conjunta dos dados das tabelas 13 e 14, mostrando o número de agrupamentos e as interações envolvidas, para fêmeas e machos.

Linhagens	Fêmeas		Machos	
	no. de agrupamentos	interações envolvidas	no. de agrupamentos	interações envolvidas
B50,B59,A55,B31	11	5(B50;B59;A55; A95;B31)	6	5(B50;B59;A55; B31;B25)
B20 + B25	5	3(B50;B59;A55)	2	2(A95;B20)
B20 + B25 + A95	4	3(B50;B31;B20)	4	3(B50;B59;B31)
B20 + B25 + B31	0		1	1(A95)
B20 + B25 + A95 + B31	0		1	1(B31)
B20 + B25 + A95 + B50	1	1(B20)	0	
B20 + B31	0		1	1(A55)
B25 + A95	0		3	2(B50;A55)
B20 + A95 + B31	2	1(A95)	0	
B20 + A95 + A55	2	1(B25)	0	
A55 + A95	1	1(B59)	0	
B50,B59,A55,B31 + A95	0		5	3(A95;B20;B25)

2. Análise cromossômica

Esta análise foi realizada em lâminas de cromossomos politênicos das glândulas salivares das linhagens isofêmeas parentais e híbridos, coradas com orceína lacto-acética para observação do grau de sinapse entre os cromossomos e comparação do padrão de bandas-C para observação de regiões heterocromáticas.

Foram analisadas aproximadamente 70 lâminas de fêmeas e machos das linhagens parentais, 228 lâminas de fêmeas e 174 de machos híbridos coradas com orceína e 100 lâminas de fêmeas e machos híbridos coradas pela técnica de banda-C.

2.1. Coloração com orceína lacto-acética

a. Padrão de sinapse cromossômica

A análise dos cromossomos politênicos evidenciou diferentes graus de emparelhamento cromossômico nos vários tipos de intercruzamentos realizados, quando comparados com os padrões intralinhagem. Assim, foram distinguidos 3 graus de sinapse cromossômica nos núcleos politênicos dos híbridos, a saber:

1. Sinapse completa: quando os cromossomos homólogos emparelham em toda a sua extensão. Esta situação que é característica dos intracruzamentos (Figura 8), foi observada, também, nos híbridos dos intercruzamentos entre as linhagens B31D1, A55F11, B50Q3 e B59Q1 e nos híbridos dos intercruzamentos entre as linhagens B20D2 e B25D7 (Figura 9). Nas linhagens e nos intercruzamentos ocorrer algum desemparelhamento, mas a frequência

foi extremamente baixa. Com uma frequência maior, porém, as fêmeas da linhagem A95F3 (Figura 8F) e as fêmeas híbridas, dos cruzamentos mencionados (Figura 9A,C) mostram assinapse na região proximal do cromossomo X, em uma extensão variável de 1/6 a 1/3.

2. Sinapse moderada: refere-se aos híbridos em que as regiões proximais e distais dos cromossomos encontram-se frequentemente deemparelhadas, os microcromossomos aparecem unidos apenas pela região proximal ou totalmente separados e, na maioria das células politênicas, o terço proximal do cromossomo X das fêmeas aparece desemparelhado. Este nível de sinapse foi encontrado nos híbridos dos intercruzamentos de B50Q3, B59Q1, A55F11 e B31D1 com a linhagem A95F3 (Figura 10).

3. Sinapse reduzida: casos em que, além do desemparelhamento das regiões proximais e distais dos cromossomos, da assinapse completa dos microcromossomos e do terço proximal do cromossomo X, ocorre também, frequente assinapse em regiões cromossômicas intermediárias. Os híbridos dos intercruzamentos de B25D7 ou B20D2 com A95F3 (Figuras 11 e 12) e os híbridos dos intercruzamentos de B50Q3, B59Q1, A55F11 e B31D1 com as linhagens B20D2 ou B25D7 (Figura 13), mostraram este grau de assinapse.

Uma análise mais detalhada sobre a região proximal de assinapse do cromossomo X, encontra-se a seguir.

b. Assinapse na extremidade proximal do cromossomo X

b.1. Nos intracruzamentos da linhagem A95F3

Como já foi mencionado, no cromossomo X das fêmeas da linhagem A95F3 ocorre uma alta frequência de assinapse na região

proximal. Há um ponto de início mais frequente dessa região de assinapse, embora, sua extensão possa variar (Figura 14).

Observa-se também que o padrão de bandas nesta porção cromossômica que apresenta assinapse varia quanto à morfologia. Às vezes, o padrão de bandas apresenta-se bem definido (Figura 14A,B) e outras vezes, algumas bandas de um ou de ambos os cromossomos aparecem desorganizadas, com aspecto de heterocromatina. Frequentemente há um segmento cujo padrão de bandas é organizado, entre duas regiões que apresentam padrão desorganizado (Figura 14C,D).

b.2. Nos intercruzamentos de A95F3

A região proximal do cromossomo X de fêmeas híbridas descendentes de intercruzamentos de A95F3 mostrou desemparelhamento em todas as células e indivíduos analisados e em extensão variável, porém, geralmente maior que a observada na linhagem A95F3. A Figura 15 refere-se a fêmeas híbridas descendentes dos intercruzamentos entre fêmeas A95F3 e machos B31D1 (A-C) e entre fêmeas B59Q1 e machos A95F3 (D). A Figura 16 mostra, também, cromossomos X de fêmeas híbridas de intercruzamentos entre machos A95F3 e fêmeas B20D2 (A), B25D7 (B), B59Q1 (C) e B50Q3 (D), entre fêmeas A95F3 e machos A55F11 (E), e entre fêmeas A95F3 e machos B31D1 (F).

A observação dessas duas Figuras mostra que em algumas dessas fêmeas híbridas, um dos cromossomos, na região não-emparelhada, caracteriza-se por apresentar um segmento particularizado devido a seu padrão de bandas bem definido, ladeado por regiões cromossômicas desorganizadas, como já descrito para os cromossomos X da linhagem A95F3.

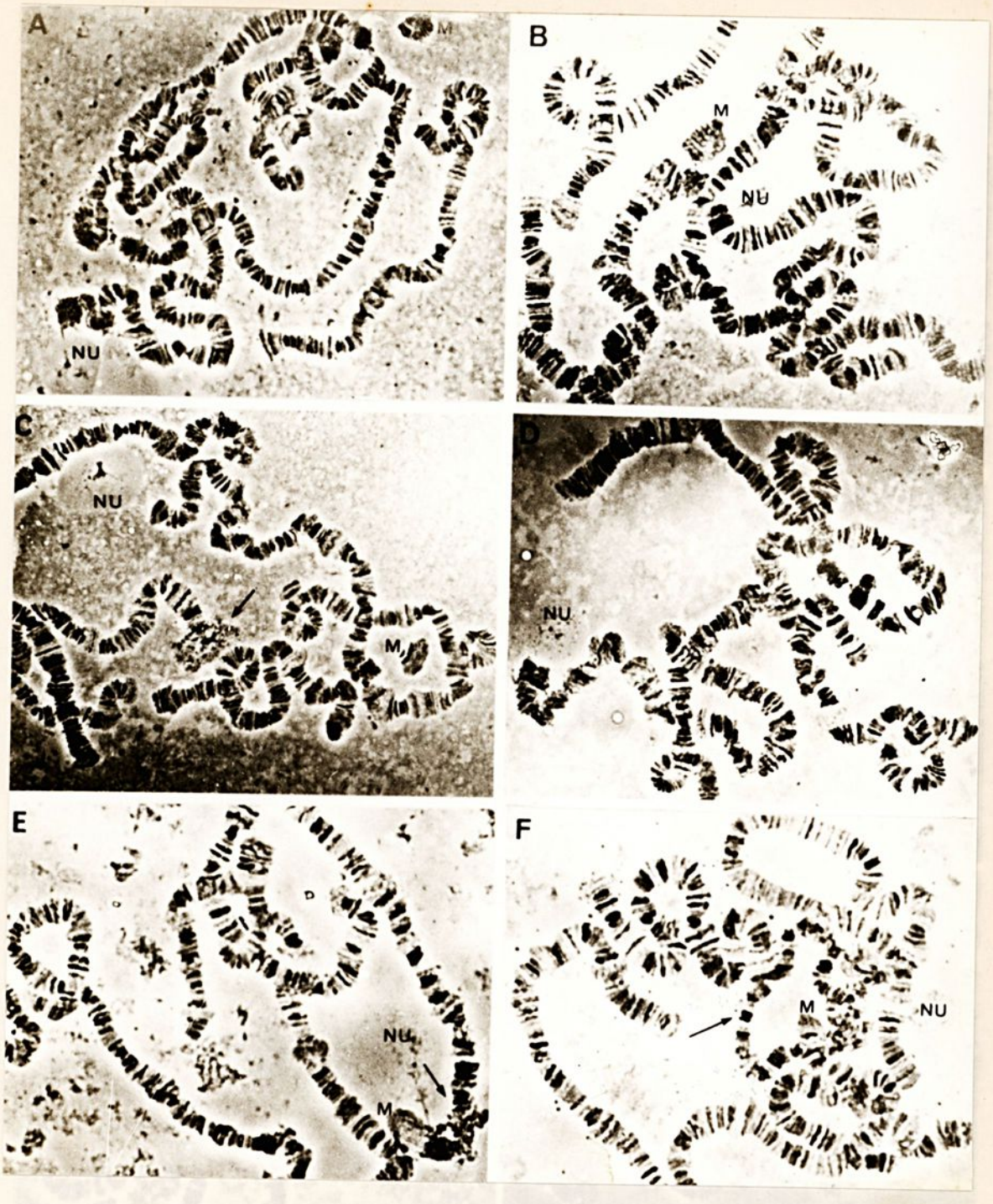


Figura 8A-F. Sinapse nos intracruzamentos. A. Fêmea B20D2. B. Fêmea B25D7. C. Macho B59Q1. D. Fêmea A55F11. E. Fêmea B31D1. F. Fêmea A95F3. Em C a seta mostra a região proximal do cromossomo X de macho e em E e F a mesma região no cromossomo X de fêmeas, em F observar o desemparelhamento desta região. NU: nucléolo. M: microcromossomos.

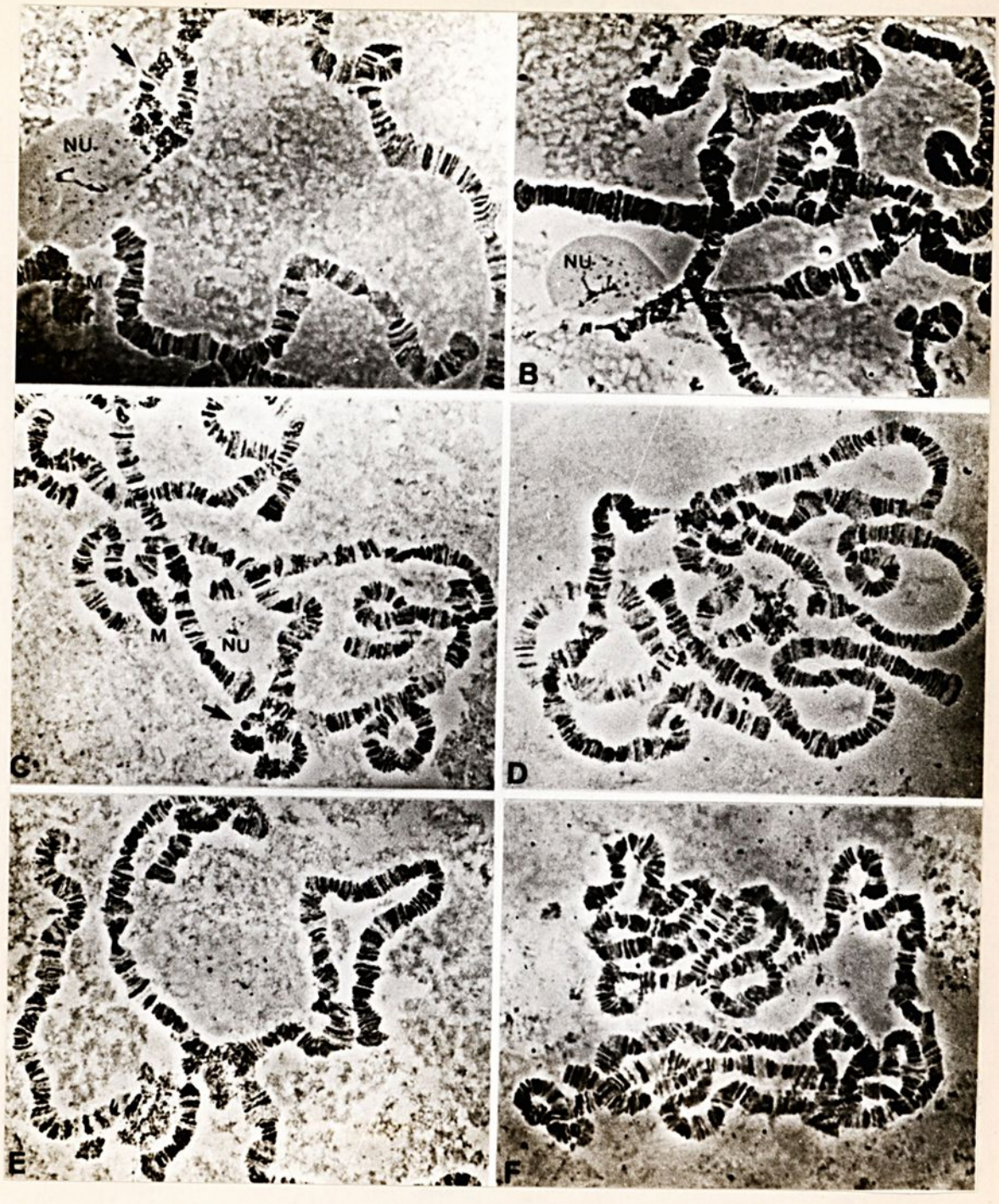


Figura 9A-F. Sinapse completa em híbridos. A. Fêmea (F B31D1 X M B50Q3). B. Fêmea (F B31D1 X M A55F11). C. Fêmea (F B59Q1 X M A55F11). D. Macho (F B50Q3 X M B59Q1). E. Macho (F B59Q1 X F B50Q3). F. Macho (F B25D7 X M B20D2). Em A observa-se o cromossomo X associado ao nucléolo (NU). Em A e C a extremidade proximal do cromossomo X está desemparelhada (setas). M: microcromossomos.



Figura 10A-D. Sinapse moderada em híbridos de A95F3. A. Fêmea (F A95F3 X M A55F11). B. Fêmea, C. Macho, (F A95F3 X M B31D1). D. Fêmea (F A95F3 X M B50Q3). Observar microcromossomos emparelhados somente pela extremidade proximal (pontas de seta) e assinapse das regiões cromossômicas proximais (setas delgadas) e distais (setas espessas). Em A e D a região proximal do cromossomo X aparece desemparelhada (setas duplas).

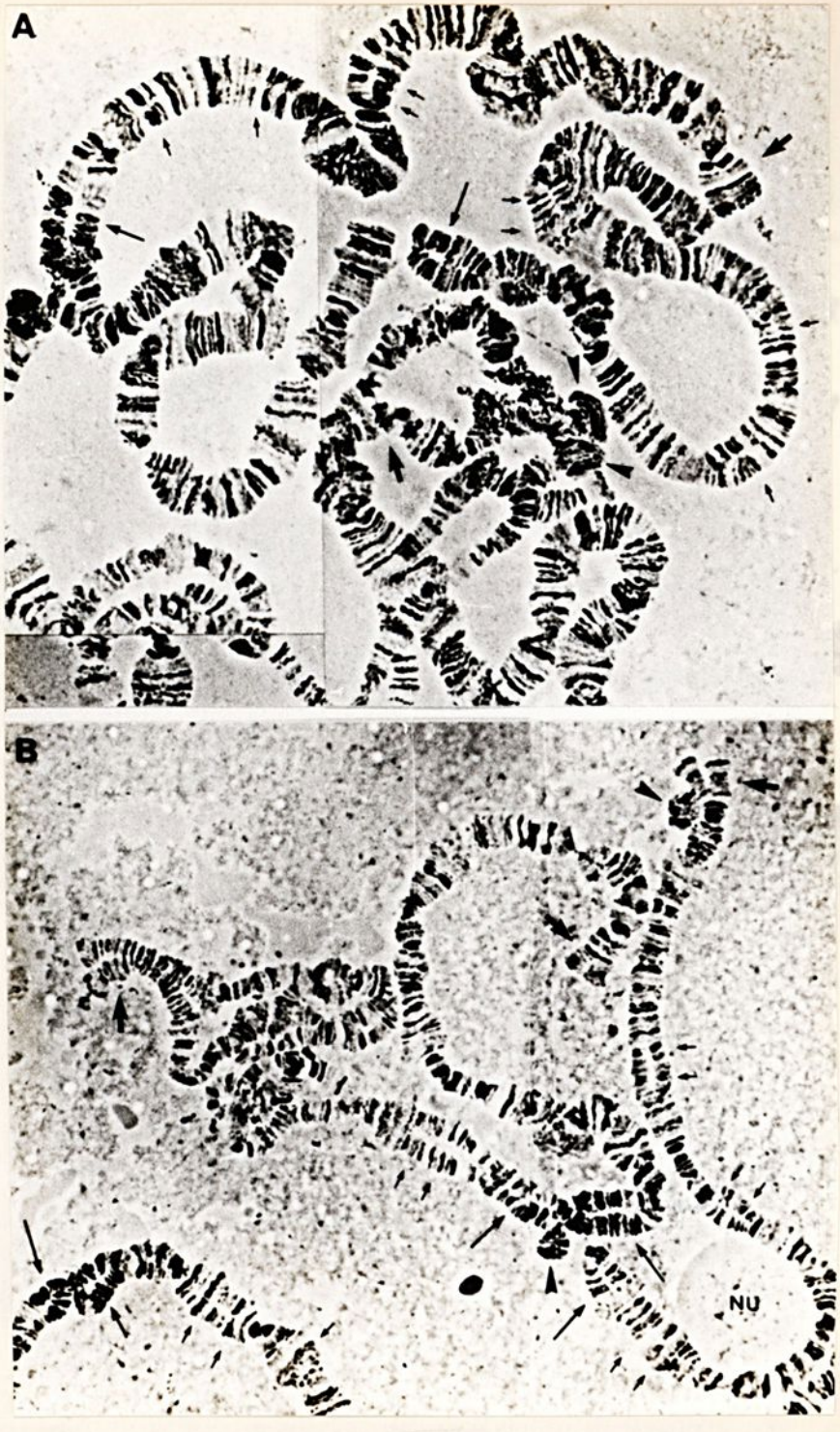


Figura 11A-B. Sinapse reduzida em fêmeas híbridas de F A95F3 X M B25D7. Observar microcromossomos desemparelhados (pontas de seta), assinapse nas regiões proximais (setas longas e delgadas), distais (setas espessas) e em segmentos cromossômicos intermediários (setas pequenas e delgadas). NU: nucléolo.



Figura 12A-B. Sinapse reduzida em híbridos. A. Fêmea (F B25D7 X M A55F11). B. Fêmea (F B20D2 X M B31D1). Observar microcromossomos desemparelhados (pontas de seta), regiões cromossômicas proximais (setas delgadas), distais (seta espessa em B) e segmentos cromossômicos intermediários desemparelhados (setas pequenas). Em A o cromossomo X aparece desemparelhado na região proximal (seta espessa).

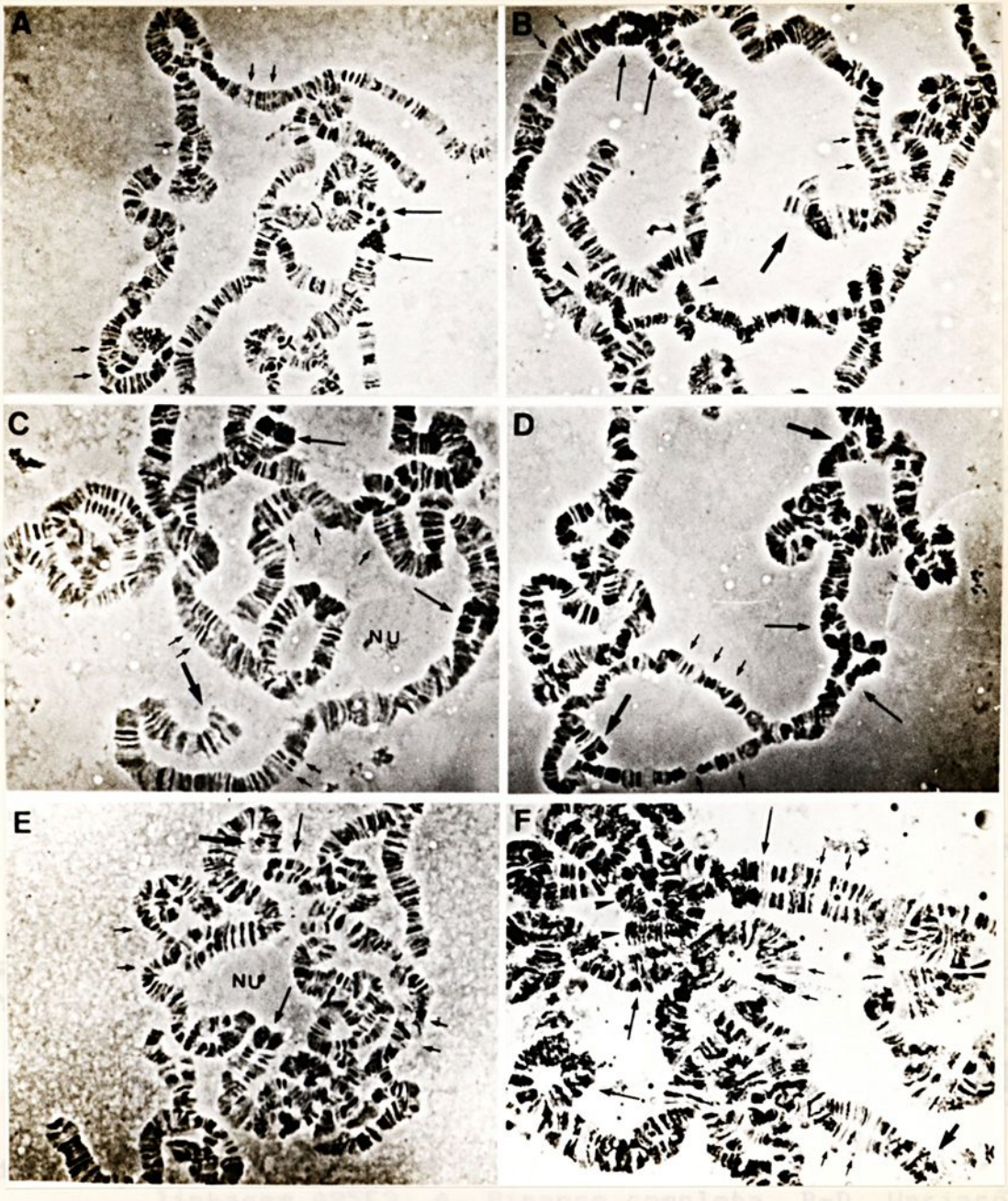


Figura 13A-E. Sinapse reduzida em híbridos. A. Macho (F B50Q3 X M B20D2). B,C. Fêmeas (F B50Q3 X M B25D7). D. Fêmea (F A55F11 X M B25D7). E. Fêmea (F B20D2 X M B59Q1). F. Fêmea (F B20D2 X M BUZ). Observar microcromossomos desemparelhados (pontas de seta), assinapse nas regiões proximais (setas delgadas), distais (setas espessas) e em segmentos cromossômicos intermediários (setas pequenas). NU: nucléolo.

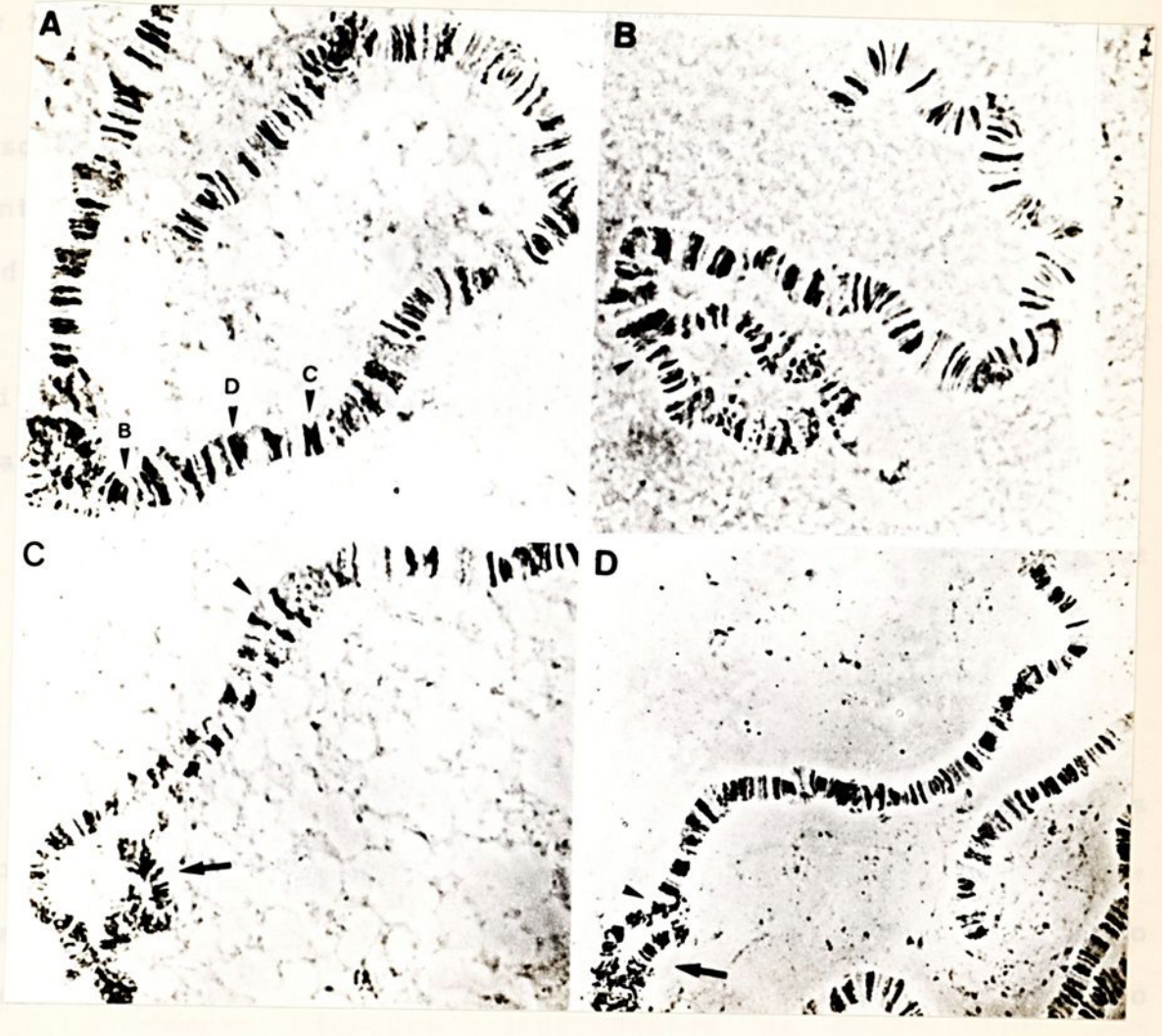


Figura 14A-D. Assinapse na região proximal do cromossomo X da linhagem A95F3. A. Sinapse completa. B-D. Variações na extensão de assinapse. Em A, as pontas de setas indicam o ponto de início da região com assinapse observados nas fotos B-D. O ponto mais frequente de início da assinapse é o que está indicado na foto B. As setas em C e D apontam o segmento de bandas organizadas entre duas regiões com aspecto heterocromático.

Por comparação com o padrão de bandas observado intralinhagem, esse cromossomo é originado de A95F3. Esse cromossomo, é também, sempre mais longo que o homólogo, derivado de qualquer das linhagens com que A95F3 foi intercruzada (Figuras 15A, C, D e 16A, B).

O segmento de padrão de bandas organizado, desse cromossomo apresenta-se, no híbrido, de formas diferentes. Às vezes, apresenta-se ligado ao cromossomo pelas duas extremidades, distendido (Figura 15B,D) ou formando alça (Figura 15A,C). Outras vezes aparece quase destacado do cromossomo ligando-se a ele apenas por filamentos da região "desorganizada" de sua extremidade distal (Figura 15B).

c. Material cromossômico extra nas glândulas salivares de híbridos

c.1. Machos

Nos núcleos politênicos das glândulas salivares de machos híbridos, descendentes de intercruzamentos com machos A95F3, aparece uma quantidade variável de material cromossômico não observado nas linhagens parentais e que porisso foi denominado material cromossômico extra.

Foram encontradas variações morfológicas e quantitativas nos diferentes intercruzamentos, quanto a esse material.

Aparentemente, o material cromossômico extra é decorrente da presença adicional de uma parte do cromossomo X da linhagem A95F3, que inclui desde o início do segmento organizado até a extremidade proximal "desorganizada".

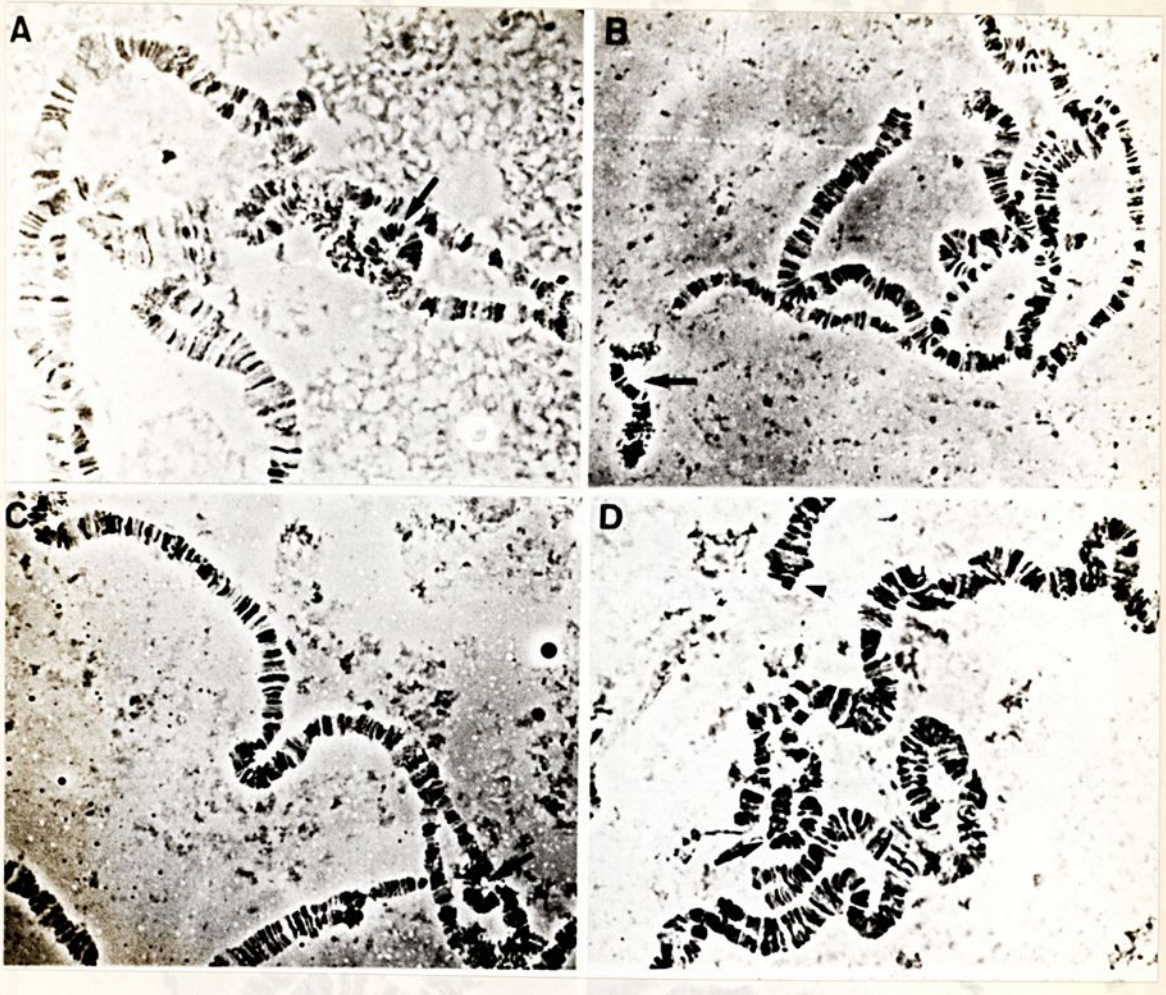


Figura 15A-D. Morfologia da extremidade proximal do cromossomo X de fêmeas híbridas descendentes de cruzamentos com A95F3. A, B e C. de F A95F3 X M B31D1. D. de F B59Q1 X M A95F3. A seta indica a estrutura cromossômica singular. Em D observar a extremidade distal, heteromórfica, do cromossomo IV (ponta de seta).

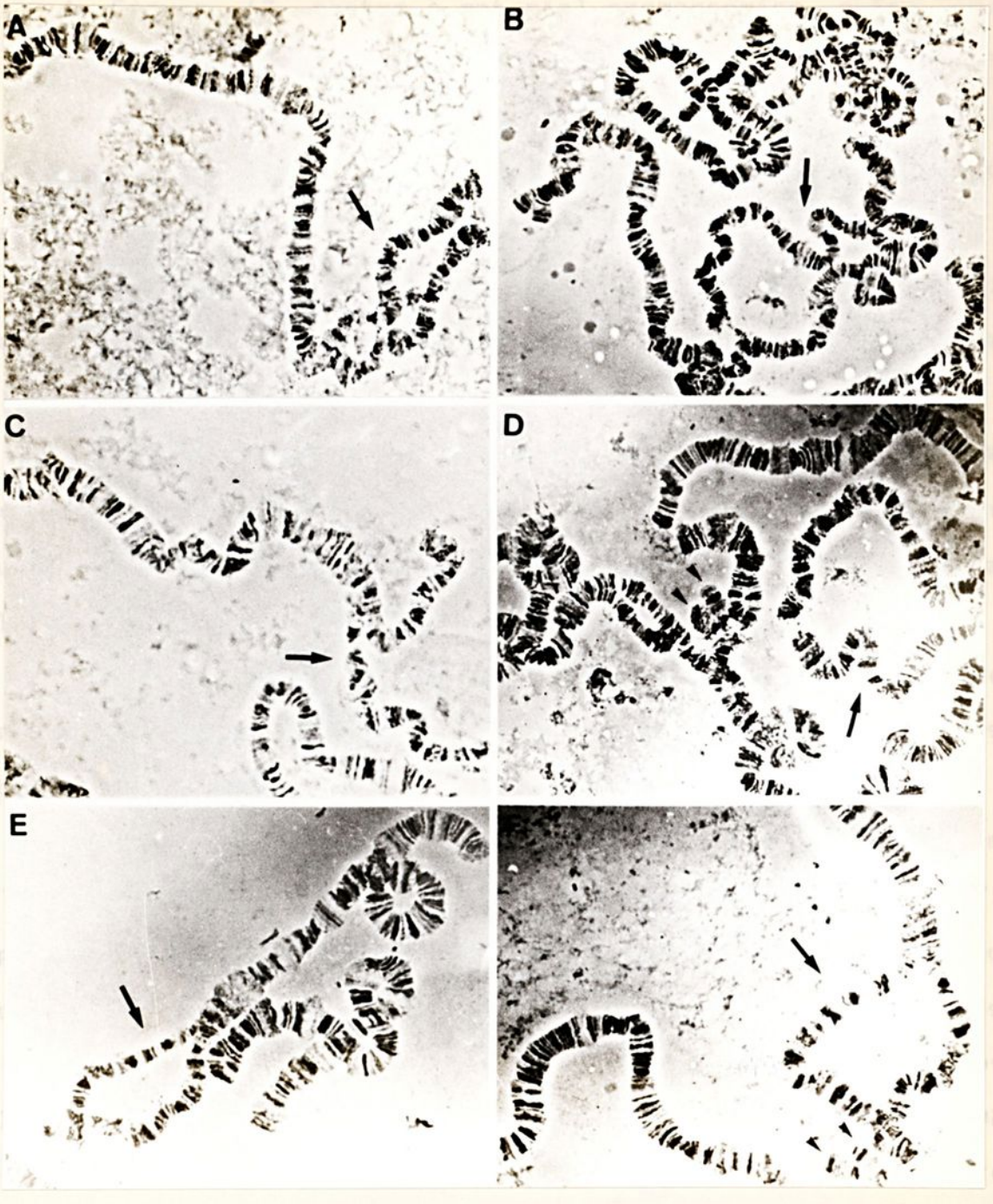


Figura 16A-F. Assinapse na região proximal do cromossomo X em fêmeas híbridas. A. F B20D2 X M A95F3. B. F B25D7 X M A95F3. C. F B59Q1 X M A95F3. D. F B50Q3 X M A95F3. E. F A95F3 X M A55F11. F. F A95F3 X M B31D1. As setas espessas mostram a região do cromossomo X com assinapse. Observar microcromossomos desemparelhados (pontas de seta) em D e F.

A Figura 17 mostra o material cromossômico extra nos machos híbridos dos intercruzamentos de machos A95F3 com fêmeas A55F11 (A,B), com B50Q3 (C,D) e com B25D7 (E,F). A Figura 18 refere-se a machos híbridos de fêmeas B25D7 X machos A95F3 e a Figura 19 refere-se a híbridos de fêmeas B20D2 com machos A95F3.

Frequentemente, os microcromossomos (ambos ou um) encontram-se associados ao material cromossômico extra, como por exemplo, nas Figuras 17A,C,E; 18A,D e 19D.

O segmento extra aparece muitas vezes associado a uma massa de aspecto heterocromático (Figura 17A-E), que pode apresentar também uma estrutura organizada assumindo, às vezes, forma de alça ou anel (Figuras 18C,E,F e 19C,D,E).

Nesses machos é frequente encontrar-se um bloco heterocromático associado à região proximal de um dos microcromossomos (Figuras 18C;19D).

Outros cruzamentos cujos machos híbridos apresentaram material cromossômico extra, envolveram as linhagens B20D2 ou B25D7. Essa amplificação foi observada tanto em cruzamentos de fêmeas como de machos dessas linhagens. A Figura 20 refere-se a intercruzamentos entre fêmeas B20D2 e machos B59Q1 (A), entre fêmeas B50Q3 e machos B25D7 (B), entre fêmeas B20D2 e machos B50Q3 (C), entre fêmeas B20D2 e machos A55F11 (D), entre fêmeas B20D2 e machos B50Q3 (E) e entre fêmeas B50Q3 e machos B20D2 (F). Nessa Figura observam-se alguns dos aspectos já descritos nos híbridos de A95F3, sendo que a quantidade de material extra varia nos diferentes cruzamentos. Pode-se observar também a presença de um segmento extra dotado de grau de politenia reduzido quando comparado aos cromossomos (Figura 20A,B,E,F).

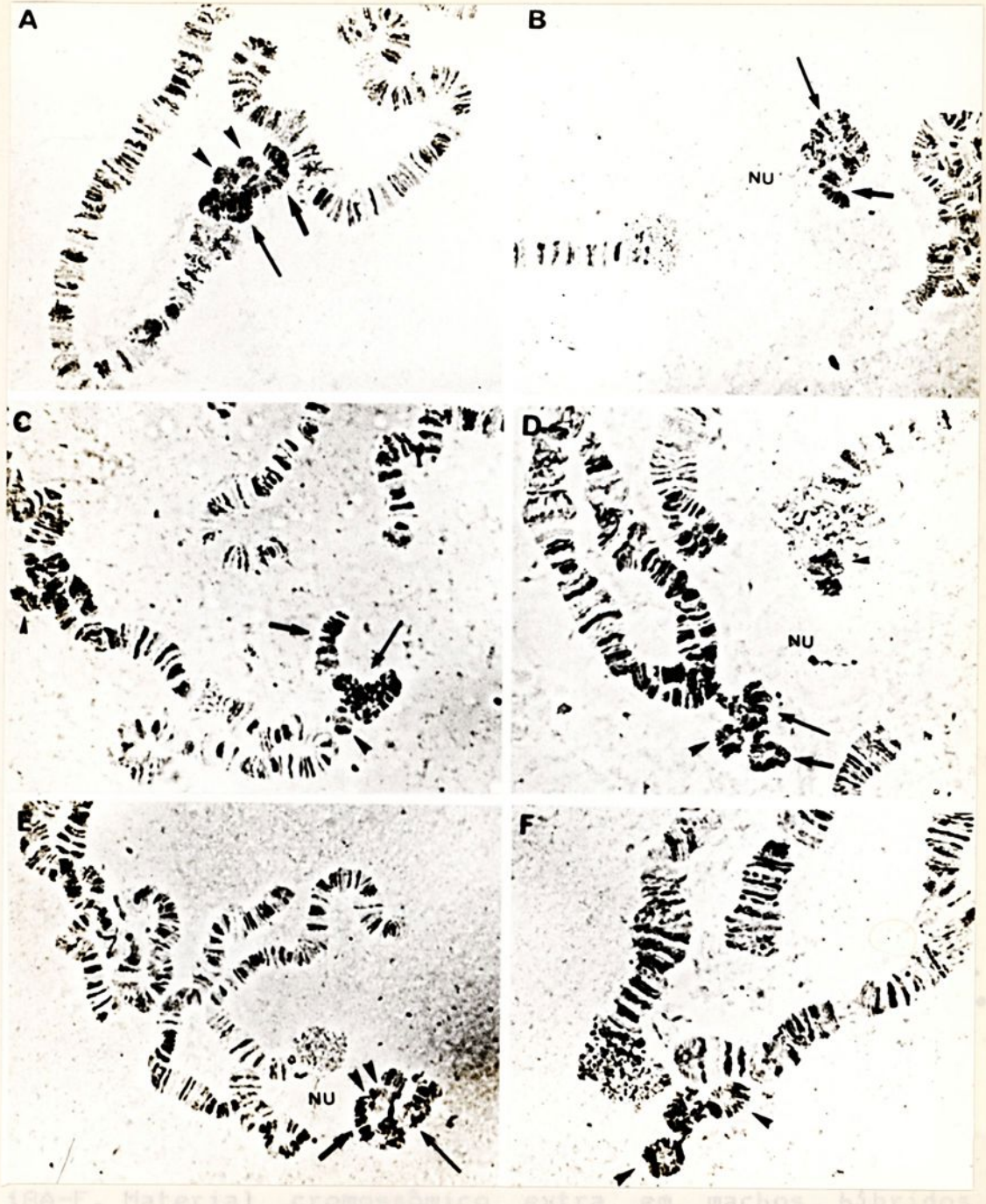


Figura 17A-F. Material cromossômico extra em machos híbridos de intercruzamentos da linhagem A95F3. A,B.com F A55F11. C,D. com F B50Q3. E,F. com F B25D7. Observar microcromossomos desemparelhados (pontas de seta), massas com aspecto heterocromático (setas delgadas) segmento cromossômico extra (setas espessas). NU: nucléolo.

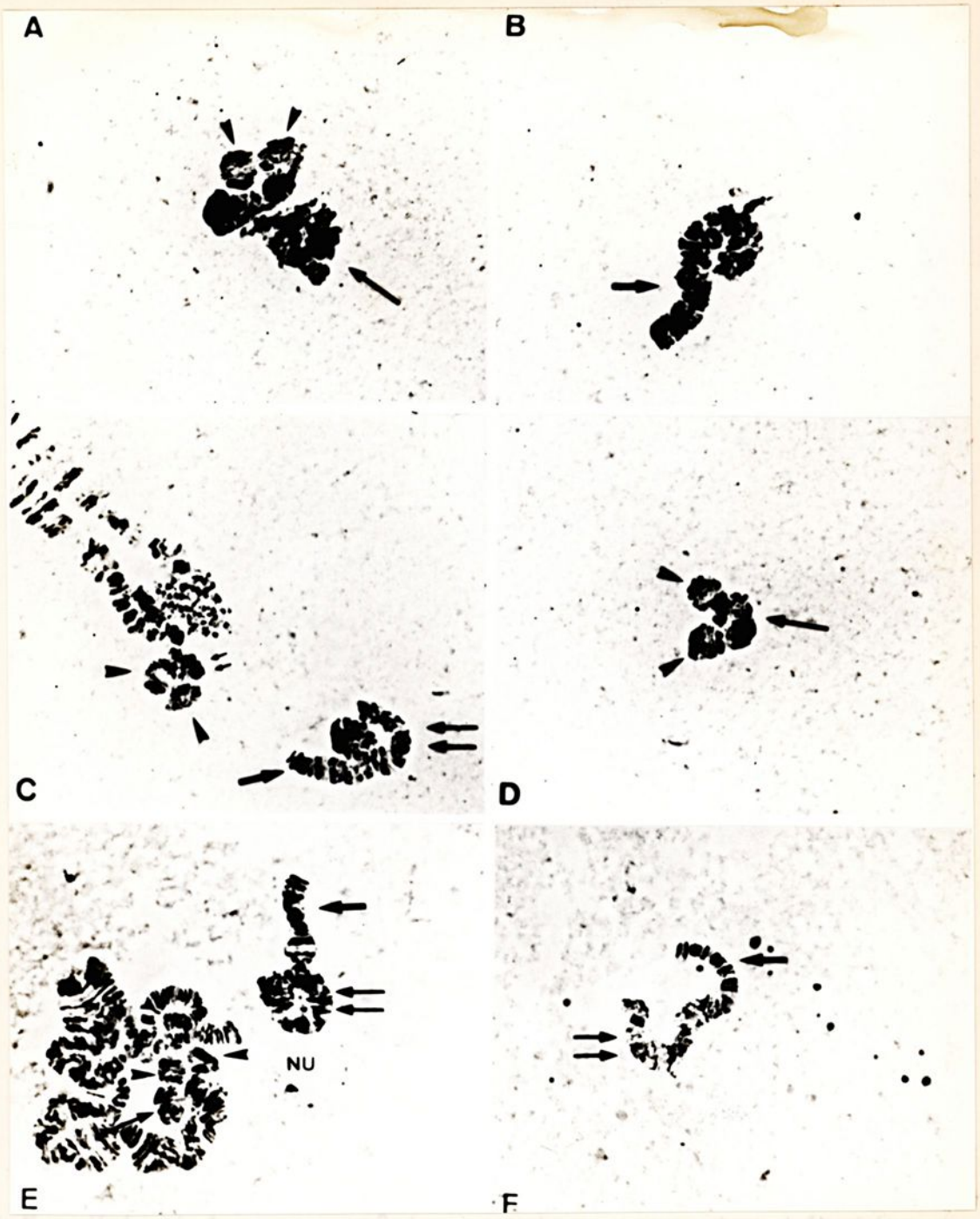


Figura 18A-F. Material cromossômico extra em machos híbridos de F. B25D7 X M. A95F3. Observar microcromossomos desemparelhados (pontas de seta) e em C associado a um bloco de aspecto heterocromático (setas duplas menores), massas de aspecto heterocromático (setas espessas). Em C, E e F as setas duplas maiores indicam estrutura organizada associada ao segmento cromossômico extra e que às vezes aparece em forma de alça (setas duplas em E). NU: nucléolo.

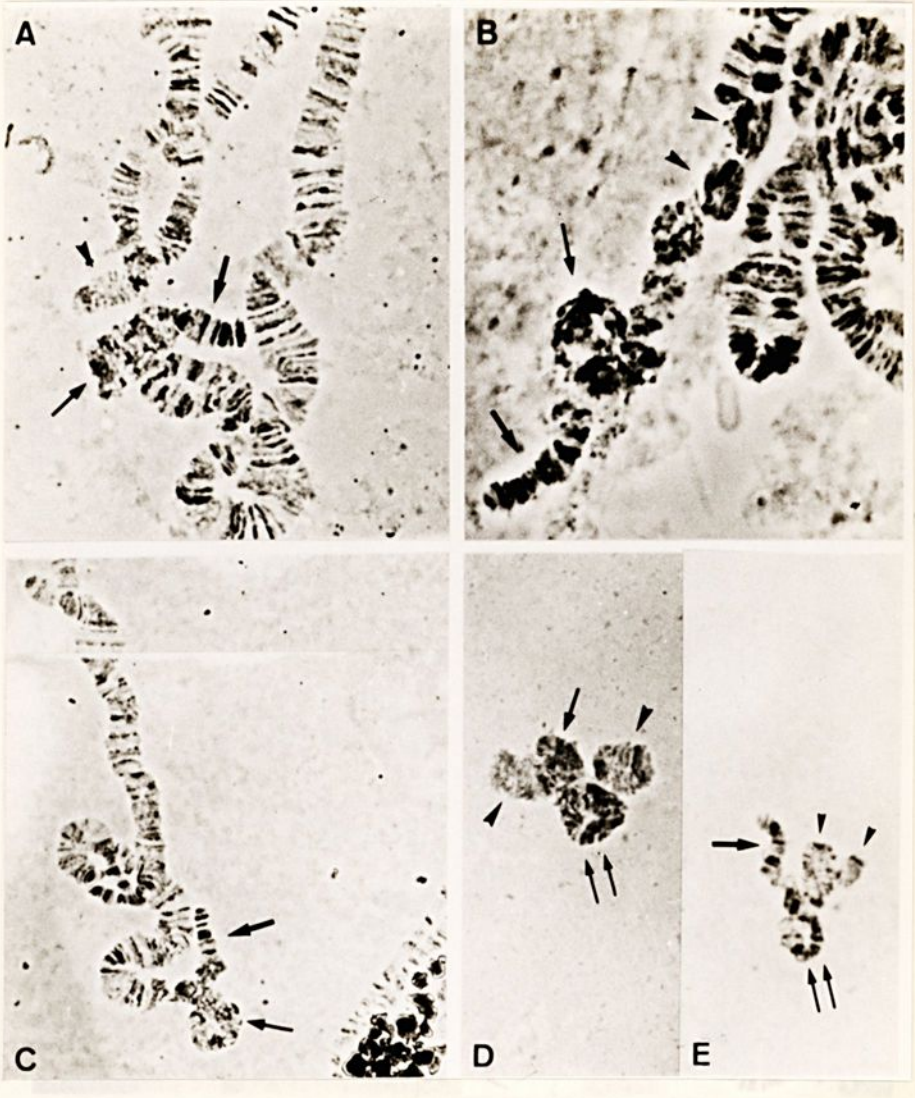


Figura 19A-E. Material cromossômico extra em machos híbridos de F B20D2 X M A95F3. Observar microcromossomos desemparelhados (pontas de seta) e em D associado a um bloco de aspecto heterocromático (setas duplas menores), massas de aspecto heterocromático (setas delgadas) e segmento cromossômico extra (setas espessas). Em C, D e E as setas duplas mostram estrutura organizada em forma de alça.

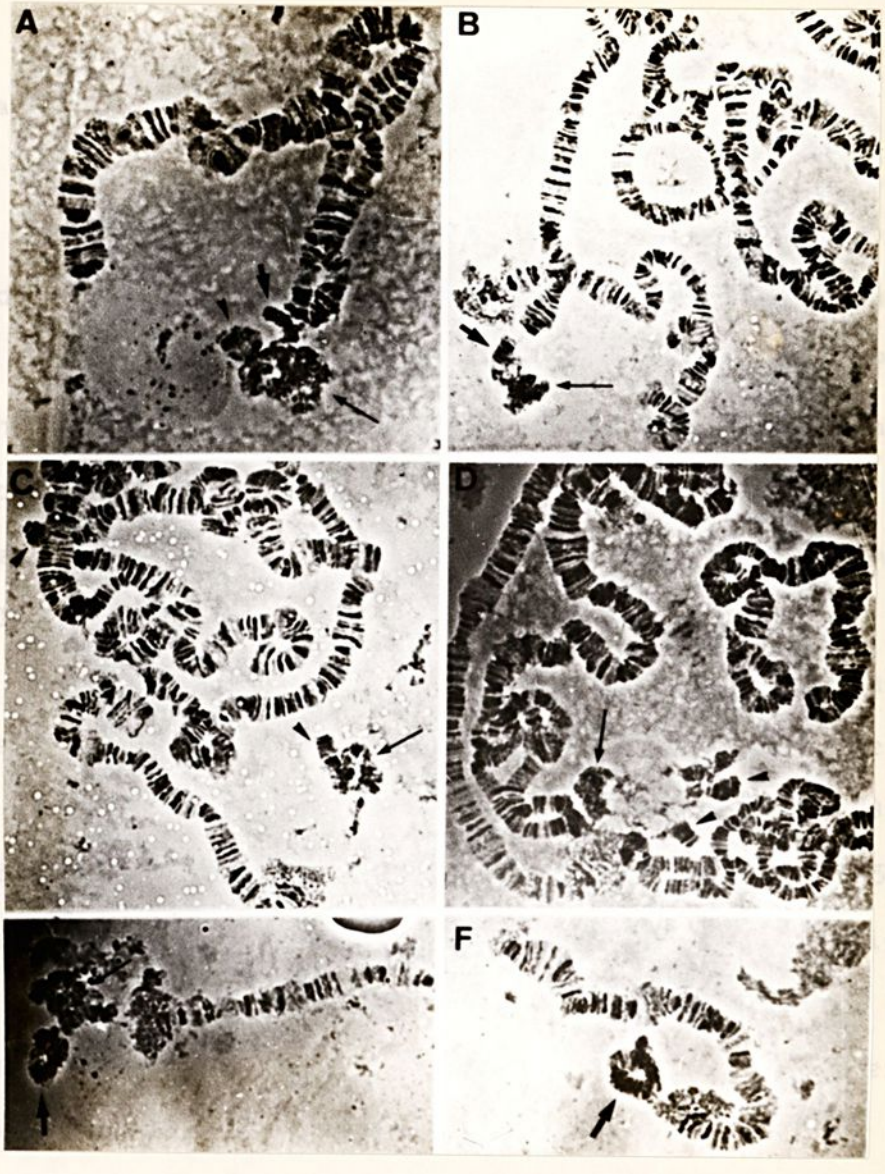


Figura 20A-F. Material cromossômico extra em machos híbridos de intercruzamentos com B20D2 ou B25D7. A. F B20D2 X M B59Q1. B. F B50Q3 X M B25D7. C. F B20D2 X M B50Q3. D. F B20D2 X M A55F11. E. F B20D2 X M B50Q3. F. F B50Q3 X M B20D2. Observar microcromossomos desemparelhados (pontas de seta), massas de aspecto heterocromático (setas delgadas) e segmento dotado de um grau de politenia reduzido (setas espessas).

c.2. Fêmeas

Algumas fêmeas híbridas do intercruzamento de fêmeas B20D2 com machos A95F3 também apresentaram células politênicas com material adicional. A Figura 21 mostra algumas células em que não foi observado material adicional (A,B) ou em que um dos microcromossomos aparece associado a uma massa com aspecto heterocromático, de tamanho variável e às vezes em forma de alça (C-F). Embora essa fêmeas sejam também descendentes de machos A95F3, em suas células não foi observado um segmento com padrão de bandas organizado como foi visto nos machos híbridos.

Deve-se ressaltar que os cruzamentos recíprocos de A95F3 não mostraram amplificação cromossômica nos descendentes.

Fêmeas híbridas de outros intercruzamentos de machos A95F3 também apresentaram material cromossômico extra. É o que se observa na Figura 22, em que A refere-se a fêmeas híbridas de B50Q3 e B a fêmeas híbridas de B25D7, em ambos os casos com machos A95F3.

As observações são as mesmas já mencionadas na Figura anterior.

Em resumo, a presença de material cromossômico extra permite distinguir duas classes de híbridos:

1. Os que descendem dos cruzamentos entre as linhagens B50Q3, B59Q1, A55F11, B31D1, B20D2 e B25D7 com a linhagem A95F3. Nestes híbridos, o material cromossômico extra só é detectado na direção de cruzamento que envolve machos A95F3 com fêmeas das demais linhagens e é mais constante e complexo nos machos híbridos que nas fêmeas híbridas.

2. Os que descendem de cruzamentos entre duas quaisquer



Figura 21A-F. Variação na quantidade de material cromossômico extra com aspecto heterocromático, em fêmeas híbridas de F B20D2 X M A95F3. Observar microcromossomos desemparelhados(pontas de seta), massa heterocromática (setas delgadas) e segmento cromossômico extra em forma de alça (setas duplas).

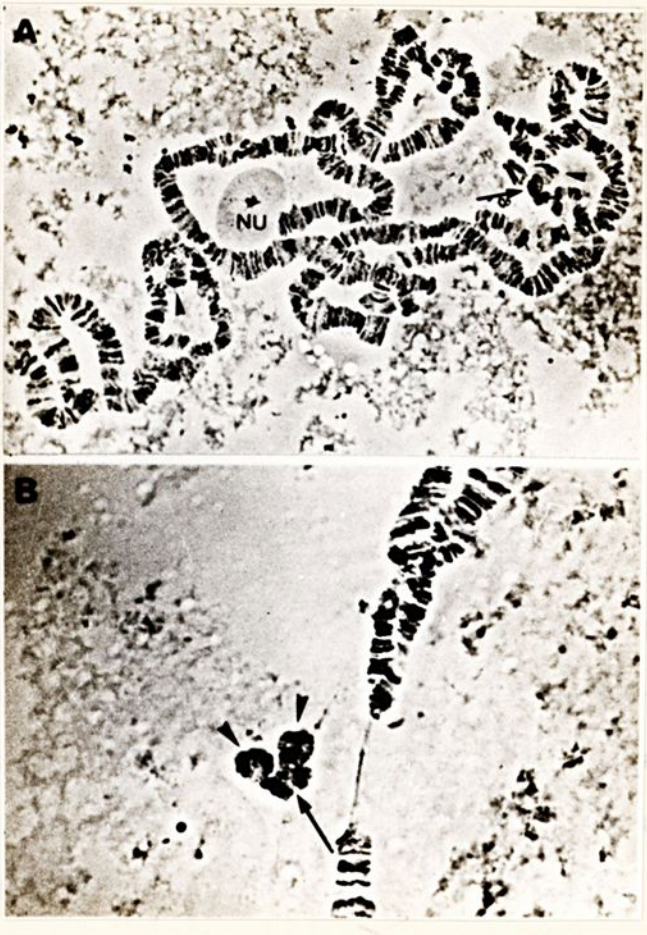


Figura 22A-B. Massas de aspecto heterocromático e associadas ao(s) microcromossomo(s) em fêmeas híbridas de intercruzamentos com A95F3. A. de F B50Q3 X M A95F3. B. de F B25D7 X M A95F3. A seta delgada indica a massa de heterocromatina e as pontas de seta os microcromossomos desemparelhados. NU: nucléolo.

das linhagens B50Q3, B59Q1, A55F11 e B31D1 ou os que descendem de cruzamento entre as linhagens B20D2 e B25D7. Nestes híbridos, não foi detectado material cromossômico extra.

2.2. Coloração pela técnica de banda-C

A coloração pela técnica de banda-C foi aplicada nos cromossomos dos híbridos machos e fêmeas provenientes dos intercruzamentos com a linhagem A95F3. O objetivo foi tentar caracterizar a região proximal do cromossomo X das fêmeas híbridas e o material cromossômico extra, encontrado em híbridos de alguns intercruzamentos, quanto à sua natureza cromatínica.

Para isto, foi necessário realizar, previamente, a adaptação da técnica ao material em estudo.

Embora os resultados tenham apresentado alguma variabilidade, isto já era esperado devido à sensibilidade da técnica empregada, às variações ambientais. Alguns pontos devem ser destacados no uso desta técnica: 1) a fixação do material na lâmina foi satisfatória; 2) os cromossomos conservaram a sua estrutura morfológica aparentemente inalterada; 3) a coloração dos cromossomos de uma mesma lâmina mostrou-se pouco variável, embora, ainda, tenha havido grande variabilidade quanto ao aspecto e coloração dos cromossomos entre as diferentes lâminas submetidas ao mesmo tipo de tratamento; 4) cerca de 35% das lâminas mostraram um padrão de coloração semelhante. Essas lâminas foram utilizadas para análise e apresentação dos resultados; 5) a maior dificuldade foi obter fotos que traduzissem o padrão de coloração dos cromossomos. Nesta

tentativa, foram utilizados filmes colorido e preto e branco, com e sem filtro.

Na análise das lâminas, de modo geral a extremidade proximal do cromossomo X das fêmeas híbridas mostrou uma coloração mais acentuada do que o restante do cromossomo (Figura 23A). O cromossomo apresentou uma cor mais violácea, e as bandas, tons um pouco mais escuros, e a extremidade proximal, uma coloração acentuada. A mesma coloração acentuada foi observada na extremidade proximal dos outros cromossomos, especialmente no cromossomo II. Esta coloração mais forte foi também observada no material cromossômico extra (Figura 23B).

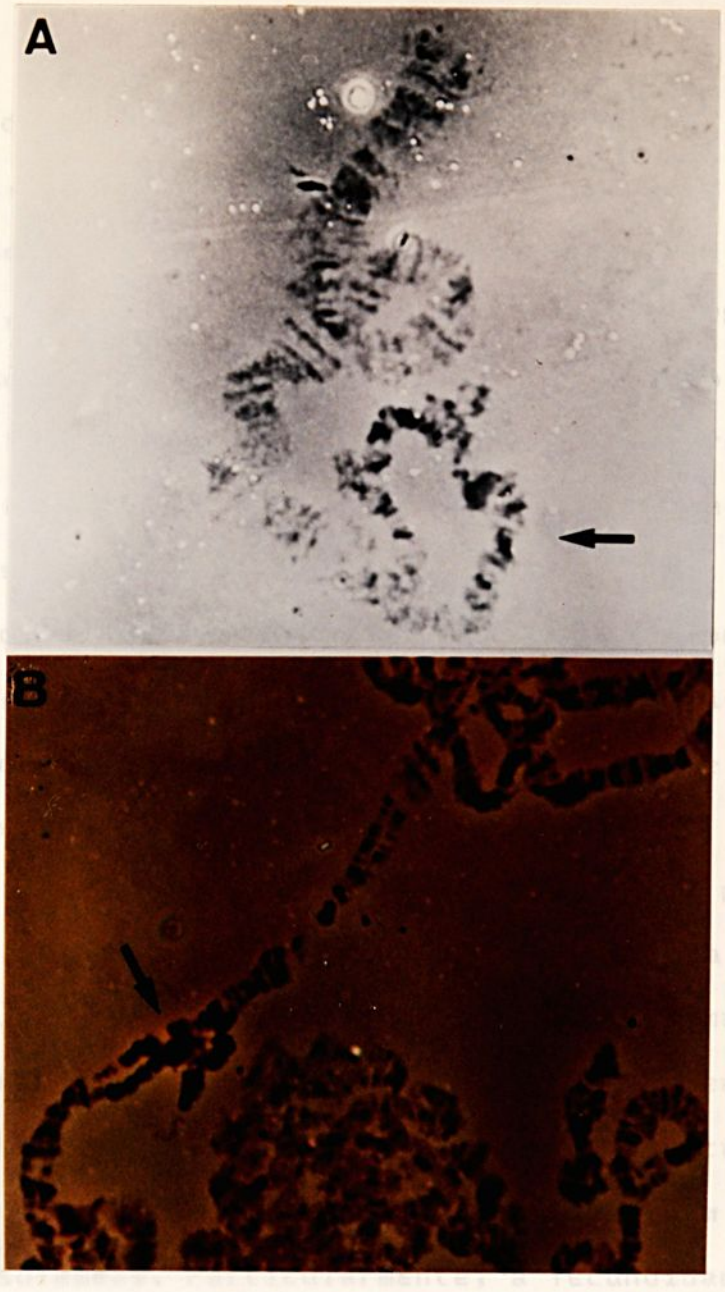


Figura 23A-B. Cromossomos politênicos de hìbridos corados pela técnica de banda-C. A. Cromossomo X de fêmea hìbrida descendente de F A55F11 X M A95F3, corado mais fortemente em sua extremidade proximal (seta). B. Material cromossômico extra em macho hìbrido de F B20D2 X M A95F3, corado mais intensamente (seta).

IV. DISCUSSÃO

Estudos do cariótipo (Baimai **et al.**, 1983), inversões cromossômicas (Tosi, 1982; Tosi & Sene, 1989; Ruiz **et al.**,1982; Wasserman & Richardson, 1987), morfologia do edeago (Silva, 1981; Silva & Sene, 1991), isolamento reprodutivo (Bizzo, 1983; Madi-Ravazzi, 1988), isolamento sexual (Moraes, 1992) e padrões de esterases (Lapenta, 1992), de linhagens isofêmeas da superespècie **D. serido**, têm mostrado um padrão complexo de diferenciação em populações de origens geográficas distintas.

Com o objetivo de entender melhor o processo de divergência dessas populações, o presente trabalho analisou cinco linhagens isofêmeas de **D. serido**, duas de **D. koepferae** e uma de **D. buzzatii**, quanto a aspectos reprodutivos e citogenéticos.

Os dados obtidos permitem acrescentar outros parâmetros aos analisados anteriormente, ou mesmo apresentar uma nova abordagem de características já avaliadas, contribuindo desta forma para o conhecimento da diferenciação entre as linhagens isofêmeas. Esses dados referem-se à fertilidade, fecundidade, sinapse nos cromossomos politênicos e presença de material cromossômico extra em híbridos entre as linhagens isofêmeas. Particularmente, a fecundidade recebeu um enfoque mais detalhado no sentido de verificar essa diferenciação.

A análise da fertilidade, entendida como frequência de cruzamentos com descendentes, mostrou que todas as linhagens são altamente férteis nos seus intracruzamentos, embora, B20 e B25, ambas originadas da Argentina e atualmente classificadas como **D. koepferae**, sejam significativamente menos férteis que as demais

linhagens.

Quanto à produtividade ou fecundidade (entendida como número médio de descendentes) dos intracruzamentos, foram significativas as diferenças de B31 quando comparada com todas as demais linhagens isofêmeas, exceto com B20 e B25; estas três linhagens foram as que apresentaram as menores produtividades. Contudo, cada linhagem pode ser considerada única no seu padrão de produtividade, o que é demonstrado por uma análise mais detalhada desse parâmetro, nas séries de tubos originadas por transferência das moscas, como mostram a Tabela 3 e a Figura 1.

Por exemplo, na primeira série de tubos, A95 e B31 apresentaram as menores fecundidades. Com relação a A95, este fato já havia sido observado por Madi-Ravazzi (1988), isto é, essa linhagem apresentou um atraso no início da produtividade e também um tempo maior de desenvolvimento quando comparada com B20. Na quarta e última série de tubos, as menores produtividades foram apresentadas por B59, B20 e B25, correspondentes a aproximadamente metade a um terço das produtividades das demais linhagens. Nas séries intermediárias de tubos, também houve variação de comportamento, quanto à produtividade, entre as linhagens isofêmeas.

A comparação dos dados de produtividade intralinhagem do presente trabalho com os dados quanto às frequências de cópula, obtidos por Moraes (1992) mostram que estes dois parâmetros não se sobrepõem obrigatoriamente, pois, A95 e B31, que são as linhagens de menor produtividade nos primeiros tubos, apresentaram altas frequências de cópula na idade correspondente à das moscas desses tubos.

Os resultados do trabalho de Singh & Chatterjee (1987) sobre frequência de cópula e produtividade, em cinco linhagens isofêmeas de **D. ananassae** de localidades geográficas distintas, entretanto, mostraram, além da grande variação na produtividade entre as diferentes linhagens isofêmeas, que as linhagens isofêmeas com maior atividade sexual produziram mais descendentes. Aqueles autores não encontraram relação entre o número de gerações de manutenção em laboratório e a maior ou menor frequência de acasalamentos das linhagens isofêmeas.

Na avaliação da capacidade de intercruzamento das linhagens isofêmeas, realizada no presente trabalho, destaca-se que a linhagem de **D. buzzatii** testada encontra-se isolada de todas as demais. Apenas em intercruzamentos de fêmeas B25 ou B20 com machos daquela espécie houve produção de algumas pupas as quais não completaram o desenvolvimento.

D. buzzatii e **D. serido** são duas espécies intimamente relacionadas do grupo **repleta**, e suas relações filogenéticas foram recentemente estudadas (Ruiz **et al.**, 1982; Lapenta, 1992). Naveira **et al.** (1984), obtiveram machos híbridos estéreis e fêmeas férteis nos cruzamentos entre fêmeas de **D. serido** e machos **de D. buzzatii**. Ambos os estoques eram provenientes da Argentina, sendo **D. serido**, de Vipos, que é uma região muito próxima daquelas das populações mais tarde descritas por Fontdevila **et al.**, 1988 com **D. koepferae**. Provavelmente, Naveira **et al.** (1984) utilizaram linhagens de **D. koepferae**, como no presente trabalho, e não de **D. serido**, e assim, as observações são parcialmente concordantes. A diferença (obtenção de adultos por aqueles autores) pode ser devida à linhagem de **D.**

buzzatii utilizada no presente trabalho (procedente de Carfanaum-Bahia, Brasil) e na utilizada por aqueles autores (San-Luis, Argentina).

Naveira & Fontdevila (1986) através de estudos de introgressão de **D. serido** (provavelmente **D. koepferae**) em **D. buzzatii** mostraram que fatores não específicos, espalhados pelos autossomos podem produzir esterilidade somente quando acumulados em quantidades críticas, enquanto o cromossomo X transporta fatores específicos distribuídos por todo o cromossomo, que produzem esterilidade por si.

Quanto às demais linhagens isofêmeas analisadas neste trabalho, B50, B59, A55 e B31, seus intercruzamentos apresentaram fertilidade e fecundidade elevadas, em alguns casos até maior que nos intracruzamentos, manifestando uma possível situação de heterose, por se tratar de uso de linhagens isofêmeas, que podem apresentar um certo grau de homozigose. Em todos os casos os híbridos F1 foram férteis.

Por sua vez, as linhagens B20 e B25 quando intercruzadas mostraram também alta fertilidade; em contraste, foram pouco produtivas, mas seus híbridos são férteis.

Entretanto, os intercruzamentos de B50, B59, A55 e B31 com B20 ou B25 manifestaram isolamento assimétrico, com graus variáveis de isolamento quando os machos pertencem as linhagens B20 ou B25. Na direção recíproca, envolvendo fêmeas de B20 e B25 com machos B50, B59 e A55 e também fêmeas de B25 com machos B31, houve alta porcentagem de cruzamentos férteis, mas a sua produtividade foi baixa e significativamente diferente dos intracruzamentos de cada

linhagem.

A linhagem A95 apresentou isolamento assimétrico, em relação a todas as linhagens, exceto, B50. Nos intercruzamentos envolvendo fêmeas de A95, a fertilidade foi baixa e em um caso a esterilidade foi completa (com B31).

Estes resultados mostram que as fêmeas de B20 e B25 foram receptivas a machos com tipos diferentes de morfologia da genitália incluindo o tipo B dos machos B50 e A55 e o tipo D dos machos de B31, além dos machos de suas próprias linhagens que apresentam o tipo E (como já foi mencionado, anteriormente, os tipos de edeago foram descritos por Silva, 1981 e Silva & Sene, 1991). Já as fêmeas A95 apresentaram uma incompatibilidade mais acentuada com relação aos machos de todas as outras linhagens, exceto os de B50 (tipo B de edeago), enquanto que os machos A95 (tipo C de edeago) não foram rejeitados pelas fêmeas das demais linhagens. Contudo, F1 de todos estes intercruzamentos não produziram F2.

Moraes (1992) utilizou o método de cruzamento preferencial (que consiste em colocar juntos um macho e duas fêmeas, sendo uma delas da mesma linhagem do macho e a outra de uma linhagem diferente), para o estudo do isolamento sexual de seis linhagens isofêmeas de **D. serido**, duas das quais são, provavelmente, as mesmas linhagens isofêmeas utilizadas no presente estudo (B31 e B25) e outras duas são da mesma localidade (A95F3=B95C3 e B50Q3=B50Q5).

Moraes verificou isolamento sexual em ambas as direções, das seguintes combinações: A95 X B31, A95 X B50, A95 X B25 e B25 X B50. Nas combinações restantes, entre essas linhagens isofêmeas,

encontrou isolamento em apenas uma direção (isolamento assimétrico). Essa autora computou também a porcentagem de cruzamentos que produziram descendentes e a fertilidade de F1. Comparando seus resultados com os do presente trabalho, verificamos algumas diferenças. Os resultados de Moraes mostraram isolamento assimétrico entre a linhagem B31 e a linhagem B50 sendo que as fêmeas de B50 encontram-se isoladas dos machos B31. No presente trabalho, houve uma alta porcentagem de cruzamentos férteis nas duas direções de intercruzamento entre B31 e B50, com a produção de híbridos férteis. Foram observadas também, diferenças nos resultados da frequência de cruzamentos férteis dos intercruzamentos entre a linhagem A95 e as linhagens B25 e B31. No presente trabalho, 94% de cruzamentos férteis foram obtidos entre fêmeas B25 e machos A95 e 8% no recíproco, contra 40% e 30% obtidos, respectivamente, por aquela autora. Entre fêmeas B31 e machos A95 Moraes (**op.cit.**) obteve 70% de cruzamentos férteis e, no recíproco, 50%, enquanto nossos dados mostraram, respectivamente 28% e 0%. Houve diferenças menos acentuadas, também, na frequência de cruzamentos férteis para os intercruzamentos de A95 com B50.

Quanto à fertilidade de F1, os resultados de ambos os trabalhos foram concordantes, em alguns casos, por exemplo, nos intercruzamentos de fêmeas A95 e machos B31 e nos de B50 com B31, nas duas direções. No primeiro caso, F1 mostrou-se completamente estéril e, no segundo, fértil. Ao contrário, para F2 os resultados foram discordantes. Moraes (**op.cit.**) obteve F2 nos intercruzamentos B25 X B31, B50 X A95 e B50 X B25, em ambas as direções e na direção fêmeas B31 X machos A95. No presente trabalho, não houve a produção

624/93

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - S. J. Rio Preto - BIBLIOTECA

de F2 nesses intercruzamentos.

Na análise da fertilidade de F1, foi observada, nos intercruzamentos de fêmeas B20 com machos B31 e nos de fêmeas B25 com machos A95, a presença de ovos que não prosseguiram o desenvolvimento. Segundo Bizzo (1983), a presença desses ovos é indicativa da ocorrência de cópula entre os casais, visto que entre as linhagens dessa espécie, não foi observada oviposição sem ter havido cópula. Isto foi verificado também, por Madi-Ravazzi (1988) para A95F3 e B20D2.

Bizzo (1983) analisou a fertilidade de F1 de diferentes intercruzamentos de linhagens de **D. serido**, inclusive algumas utilizadas no estudo de Moraes (1992) e no presente estudo. Bizzo (1983) observou diversos tipos de anormalidades nos machos híbridos que provavelmente levavam à esterilidade, abrangendo desde problemas nas glândulas acessórias até graves distúrbios na formação dos testículos. O mesmo autor verificou que essas anormalidades encontradas nos híbridos de um cruzamento não são necessariamente uniformes em toda a sua descendência. Este foi o caso de alguns intercruzamentos com a linhagem A95, nos quais os machos híbridos produzidos apresentaram desde disgenesia gonadal até completa normalidade. Moraes (1992) acredita que essa não uniformidade fenotípica na descendência poderia ser responsável pelo aparecimento de F2 em alguns intercruzamentos; isto pode ser válido, também, para os resultados do presente estudo, quanto à não obtenção de F2.

Outras variações entre os resultados do presente trabalho e os de Moraes (1992), provavelmente podem ser devidas ao uso de linhagens isofêmeas diferentes, a diferenças na metodologia

empregada ou na variabilidade natural das linhagens isofêmeas em estudo, ou talvez causada pela seleção de conjuntos gênicos diferentes nos dois laboratórios, em função, por exemplo dos diferentes meios de cultura utilizados na manutenção dessas linhagens isofêmeas. Moraes (**op. cit.**) utiliza um meio de cultura diferente (meio de quirera) do utilizado no presente trabalho (meio de cactos misturado com banana) e, segundo ela, o meio de quirera propiciou um aumento perceptivel no tamanho das larvas e no número de imagos produzidos.

Existem muitos exemplos na literatura sobre testes de hibridação que mostraram resultados diferentes. Por exemplo, os realizados entre **D. mulleri** e **D. arizonensis** por Crow (1942) e Patterson (1947) de um lado, e por Bicudo & Richardson (1977, 1978) de outro, não concordam: enquanto os primeiros autores obtiveram apenas machos, os últimos autores obtiveram fêmeas e machos neste teste. Wasserman (1954) mencionou, inclusive, não ter conseguido obter hìbridos entre as duas espècies. Bicudo & Richardson (1978) sugerem que essa não concordância dos resultados pode ser decorrente da diferença dos métodos utilizados, bem como da diferença quanto à procedência das linhagens.

Pode-se dizer também, que o grau de compatibilidade genética entre os indivíduos de mesmas populações é frequentemente variável e os resultados obtidos vão estar até certo ponto na dependência dos indivíduos escolhidos, em cada uma, para os intercruzamentos.

Em resumo, em relação às linhagens isofêmeas analisadas neste trabalho, observou-se que muitas vezes, o intercruzamento é

mais produtivo que o intracruzamento, que a alta fertilidade nem sempre é acompanhada de alta fecundidade, em outras situações a baixa fertilidade é acompanhada de baixa fecundidade e até mesmo podem ocorrer baixa fertilidade e alta fecundidade nos poucos cruzamentos férteis.

Na avaliação da fertilidade entre as linhagens, os dados do presente trabalho permitem reconhecer, basicamente, dois grupos entre as linhagens isofêmeas cujo intercruzamento é afetado em uma das direções, a qual se mostra estéril ou fracamente produtiva. Dentro dos grupos, porém, a fertilidade é elevada nas duas direções de cruzamento. Um desses grupos é composto pelas linhagens B20 e B25 (**D. koepferae**) e o outro pelas linhagens B50, B59, A55 e B31 (**D. serido**) . Uma terceira situação foi observada nos intercruzamentos da linhagem isofêmea A95 (classificada presentemente, como **D. serido**), a qual intercruza relativamente bem com B50, mas está isolada assimetricamente dos demais membros do grupo desta, bem como do grupo composto por B20 e B25.

Bizzo (1983) separou estas linhagens isofêmeas ou linhagens isofêmeas da mesma procedência, da mesma forma com base em cruzamentos em massa em que analisou a produção de adultos e a fertilidade de fêmeas e machos F1, assinalando também, os cruzamentos que produziram ovos e aqueles cujo desenvolvimento atingiu a fase larval. Entretanto, a linhagem isofêmea B25 não consta na tabela dos intercruzamentos realizados por Bizzo e seus resultados de cruzamentos entre B31 e A95 diferiram dos obtidos no presente trabalho, uma vez que ambas as direções de cruzamentos foram férteis, enquanto no presente trabalho uma direção foi estéril

e a outra apresentou baixa fertilidade. Estas diferenças podem ser decorrentes da linhagem isofêmea utilizada por Bizzo (A95C3) e na utilizada no presente estudo (A95F3) e também da metodologia empregada em ambos os trabalhos.

Como foi mencionado no início desta Discussão, foi realizada uma tentativa de caracterizar a diferenciação entre as linhagens isofêmeas analisadas, com base no número de descendentes em F1. A partir dos dados de agrupamentos ("cluster analysis") relativos aos padrões de produtividade, na sequência de tubos, foram estabelecidas as relações entre as linhagens considerando a interação de cada fêmea com todos os machos (1) e a interação de cada macho com todas as fêmeas (2).

No primeiro caso (com base nos agrupamentos formados nos níveis 0,4 e 0,6, apresentados na Tabela 13), bem como no segundo caso (com base nos agrupamentos de mesmos níveis, apresentados na Tabela 14), foi possível estabelecer as relações de proximidade entre as linhagens isofêmeas, da forma apresentada, a seguir, nos seus respectivos diagramas.

Diagrama 1.

5

D. koepferae ——— A95 ——— **D. serido**

(B20,B25) (B50,B59,A55,B31)

9 6

Diagrama 2.

3

D. koepferae ——— A95 ——— **D. serido**

(B20,B25) (B50,B59,A55,B31)

8 6

Em ambos os casos, as interações seguem o mesmo padrão, isto é, A95 encontra-se mais próxima de **D. koepferae** (9 e 8 agrupamentos) e de **D. serido** (6 agrupamentos), do que **D. koepferae** de **D. serido** (5 e 3 agrupamentos). Tendo em vista esse resultado, podemos tentativamente discutir se A95 é pertencente à população ancestral que originou **D. koepferae** e **D. serido** ou derivada. Lapenta (1992) observou que o padrão de esterases de A95 é mais próximo de

D. buzzatii do que das demais linhagens isofêmeas na superespècie **D. serido** e neste caso poderia ser ancestral destas.

Kaneshiro (1976) e Watanabe & Kawanishi (1979) sugerem que a presença de isolamento assimétrico pode indicar a direção da evolução. Embora os modelos apresentados por estes autores sejam opostos, existem evidências experimentais corroborando ambos os modelos.

O modelo de Kaneshiro, baseado em estudos com espécies de **Drosophila** havaianas, postula que quando surge uma nova espècie seus machos não são prontamente aceitos pelas fêmeas da espécie ancestral. A forte discriminação das fêmeas ancestrais pelos machos das espécies derivadas se deve ao fato de que estes machos teriam alterado ou perdido alguns elementos do padrão de corte e isto dificultaria o seu reconhecimento pela fêmea ancestral.

Watanabe & Kawanishi (1979) apresentam um modelo contrastante, baseado em experimentos com espécies do grupo de **melanogaster**, pelo qual sugerem que as fêmeas da nova espècie não se acasalam com os machos da espécie ancestral. Segundo esses autores, as espécies recentemente derivadas ganham elementos do padrão de corte em relação à espécie ancestral, todo novo traço é obtido da mesma maneira. Entretanto, a hipótese daqueles autores, não é baseada nesses argumentos. Para eles, a mudança mais importante para a criação de uma espècie nova é o "fracasso" de acasalamentos entre machos da espècie ancestral e fêmeas da nova espècie. Muitos mecanismos de comportamento estarão envolvidos nesse fenômeno, sendo que a rejeição de machos ancestrais pelas fêmeas derivadas ou fêmeas derivadas ignoradas por machos ancestrais, são parte desses

mecanismos.

Como foi mencionado, a linhagem A95 apresenta diferenças entre os cruzamentos recíprocos quando cruzada com todas as outras, exceto B50 e, em todos os casos em que há diferenças, a fertilidade e produtividade é menor quando a fêmea é A95. Assim, ao aplicarmos o modelo de Kaneshiro (1976) nesses resultados, a linhagem A95 seria considerada a forma ancestral e, pelo modelo de Watanabe & Kawanishi (1979), A95 seria a espécie derivada.

Tosi (1982), baseada em dados de inversões cromossômicas em populações de **D. serido** inferiu que a origem dessa espécie possa ter ocorrido na região da caatinga. Essa autora diz que, se formos considerar as populações dessa região brasileira como as mais antigas da espécie, então, as populações da Argentina deveriam ser derivadas delas. No entanto, as populações da Argentina são muito mais polimórficas que as da caatinga. Esse fato contraria o princípio de que a forma ancestral seja mais polimórfica do que a espécie derivada (Carson & Templeton, 1984; Barton & Charlesworth, 1984).

Entretanto, Tosi & Sene (1989) encontraram em outras populações o mesmo arranjo cromossômico, o que descaracterizou a condição de ancestralidade atribuída às populações da caatinga com base nas inversões cromossômicas.

Além disso, Wasserman & Richardson (1987) discutem se é confiável o uso da quantidade de polimorfismo cromossômico como medida para a idade das espécies ou populações, visto que são conhecidas espécies polimórficas derivadas de ancestral homossequencial e monomórfica.

Ehrman & Wasserman (1988), por sua vez, questionam a validade da determinação, com segurança, da direção de evolução entre duas formas a partir de resultados de isolamento sexual assimétrico, pois acreditam que cada população desenvolve, de maneira própria, sua história de isolamento sexual, onde o isolamento assimétrico é apenas uma etapa. Além disso, os modelos propostos representam apenas duas alternativas dentre um grande número de possíveis cenários da especiação que podem incluir um estágio temporário envolvendo isolamento assimétrico.

Segundo Giddings & Templeton (1983) o modelo de Kaneshiro pode servir como indicador do caminho da evolução para espécies ou populações onde as premissas básicas desse modelo tenham ocorrido durante a especiação, ou seja, 1) que as populações estejam ligadas por um efeito do fundador com pouco ou nenhum fluxo gênico entre elas; 2) que a população ancestral não tenha sofrido afunilamentos e, portanto, só pode se aplicado em casos específicos (Kaneshiro & Giddings, 1988. Essas informações ainda não existem em relação a A95.

O estudo da assinapse em híbridos interespecíficos tem sido realizado por vários autores, entre os quais Dobzhansky (1957), Kambysellis (1970), Evgen'ev & PoliansKaya (1976), Bicudo, (1979), Madi-Ravazzi (1988), Madi-Ravazzi & Bicudo (1992). Por ser uma característica tão constante tem sido usada como marcador para estudos de introgressão cromossômica (por exemplo, Tadei & Bicudo, 1981; Naveira & Fontdevila, 1985; Naveira **et al.**, 1986).

No presente trabalho, os híbridos de linhagens isofêmeas mostraram um grau variável de assinapse. Nos híbridos que manifestam esse fênomeno, algumas regiões estão constantemente desemparelhadas.

Essas regiões incluem as extremidades proximal e distal. A região proximal nas espécies analisadas é visivelmente heterocromática. Mas, apesar disso, manifesta, frequente desemparelhamento nos hìbridos.

De modo geral, como foi mencionado no ítem Resultados, foi possìvel distinguir três graus de sinapse cromossômica nos hìbridos entre as linhagens isofêmeas analisadas. Um deles, a sinapse completa, corresponde à situação encontrada normalmente entre os cromossomos de uma linhagem ou de linhagens da mesma espécie. Essa situação foi observada nos intracruzamentos de todas as linhagens isofêmeas e nos intercruzamentos entre as linhagens incluídas em cada um dos dois grupos definidos com base na fertilidade e nos agrupamentos de fecundidade, isto é, entre B50, B59, A55 e B31 de um lado e entre B20 e B25 do outro.

O maior grau de assinapse detectado no presente trabalho foi observado nos hìbridos entre linhagens isofêmeas de um desses grupos com linhagens isofêmeas do outro.

A linhagem isofêmea A95 teve um comportamento variável com relação a esses dois grupos. Em intercruzamentos com as linhagens B25 e B20 mostrou um alto grau de assinapse (sinapse reduzida). Já em intercruzamentos com B50, B59, A55 e B31 o grau de assinapse foi moderado.

É importante observar o fato de que as relações de proximidade entre as linhagens isofêmeas, com base nos agrupamentos de fecundidade não encontram paralelismo completo nesses resultados quanto ao grau de assinapse. Por ambos os resultados, pode-se interpretar que B25 e B20 de um lado e B50, B59, A55 e B31, de

outro, são as linhagens mais diferenciadas e, portanto, mais distantes, e que a linhagem isofêmea A95 diferencia-se das demais de ambos os grupos. Contudo, nos resultados de fecundidade, A95 encontra-se mais próxima de **D. koepferae** (B20 e B25) do que de **D. serido** (B50, B59, A55 e B31), enquanto nos resultados de sinapse ocorre o contrário sendo o emparelhamento cromossômico de A95 menor com **D. koepferae** do que com **D. serido.**

O grau de assinapse observado em cruzamentos entre as linhagens isofêmeas de **D. koepferae** (B20 e B25) e as linhagens isofêmeas, B50, B59, A55 e B31, classificadas como **D. serido** e com A95 presentemente também classificada como **D. serido**, é o mesmo que caracteriza normalmente os híbridos interespecíficos, como por exemplo entre **D. insularis** X **D.tropicalis** (Dobzhansky, 1957), **D. mulleri** X **D. arizonensis** (Bicudo, 1979) e de **D. buzzatii** X **D. serido** (Naveira **et al.**, 1986).

Um outro aspecto analisado no presente trabalho, é a presença de material cromossômico extra que ocorre em alguns híbridos das linhagens isofêmeas analisadas. Este fenômeno é aqui interpretado como uma manifestação de diferenciação genética entre as linhagens intercruzadas e já havia sido detectado por Madi-Ravazzi (1988) em híbridos entre B20D2 e A95F3. Fenômeno semelhante foi descrito para outras espécies do complexo mulleri do grupo **repleta** por Bicudo & Richardson (1978) e Bicudo (1979).

O material cromossômico extra é constituído por massa (s) de cromatina e segmento (s) cromossômico (s) a ela associado (s). Pela morfologia e aplicação de banda-C esse material comporta-se predominantemente como heterocromatina. Para explicar sua presença

admite-se que seriam acionados ou desreprimidos mecanismos amplificadores que dotariam essas células portadoras, de genomas evoluidos separadamente, de melhores condições de atividade e sobrevivência.

Madi-Ravazzi (1988) propôs duas hipóteses para explicar a presença das massas de aspecto heterocromático, presentes nos híbridos dos intercruzamentos de B20D2 e A95F3. Uma delas é que seria o resultado da desrepressão da replicação da heterocromatina ligada ao microcromossomo de A95F3 (nos machos e fêmeas híbridas) e ao cromossomo Y de A95F3 (nos machos).

Sabe-se que nas glândulas salivares há normalmente subreplicação das regiões heterocromáticas quando comparada com cromossomos mitóticos. Portanto, na presente hipótese, haveria uma alteração dessa situação.

Heitz (1934, **apud** John, 1988) sugeriu que os cromocentros dos núcleos politênicos são formados por duas regiões morfologicamente distintas: uma região central, pequena e compacta, circundada por uma região maior, granular. Esse autor propôs que essas regiões representam dois tipos diferentes de heterocromatina, denominados respectivamente de alfa e beta heterocromatina.

A alfa heterocromatina contém sequências de DNA altamente repetidas que são subreplicadas durante a politenização, quando comparada com cromossomos mitóticos (Gall, 1973, Lakhotia, 1984). Já a beta heterocromatina é replicada ao menos parcialmente, durante a politenização (Plaut, 1963).

Estudo de marcação **in vitro** com uridina tritiada em glândulas salivares de **D. melanogaster** mostraram que a maioria dos

grãos de prata estão sobre a beta heterocromatina enquanto nenhum grão foi observado sobre a alfa heterocromatina. Em termos de densidade de grãos, a beta heterocromatina parece ser mais ativa do que a eucromatina (Plaut, 1963).

A outra hipótese apresentada por Madi-Ravazzi (1988) admite a amplificação de sequências de DNA da heterocromatina, envolvida com a regulação de alguma atividade celular, que poderia ser a atividade organizadora nucleolar. Esta amplificação foi sugerida para machos híbridos descendentes de fêmeas de **D. mulleri** e machos de **D. arizonensis**, nos quais o microcromossomo amplifica até cinco vezes seu tamanho e assume o papel de organizador nucleolar principal, em decorrência da ausência do cromossomo X de **D. arizonensis** (Bicudo & Richardson, 1977).

Para explicar a presença do segmento cromossômico extra, Madi-Ravazzi (1988) aventou a possibilidade de se tratar de um segmento do cromossomo Y que não se politeniza intralinhagem mas, politeniza-se no híbrido. Aventou também a possibilidade de que se trata de um segmento duplicado, separado do cromossomo de origem e diferenciado geneticamente.

Entendendo que a presença de material extra é indicativa de diferenciação genética e que uma maior quantidade de material extra pode significar maior grau de diferenciação, as linhagens isofêmeas analisadas no presente trabalho foram agrupadas como descrito a seguir.

Mais uma vez essas linhagens isofêmeas puderam ser separadas em dois grupos dentro dos quais nenhum grau de amplificação foi observado nas fêmeas e machos híbridos dos

intercruzamentos entre as linhagens isofêmeas que compõem cada um. Um desses grupos é formado por B50, B59, A55 e B31 e o outro por B20 e B25. Porém, machos híbridos de intercruzamentos nas duas direções, entre as linhagens isofêmeas dos dois grupos mostram grau acentuado de amplificação.

Da mesma maneira que no estudo dos parâmetros anteriores, a linhagem isofêmea A95 comportou-se diferentemente com relação aos dois grupos. Quando fêmeas dessa linhagem são cruzadas com machos de qualquer dos dois grupos, não ocorre amplificação detectável. Porèm, no intercruzamento de machos dessa linhagem isofêmea com fêmeas dos dois grupos ocorre amplificação, moderada nas fêmeas híbridas e acentuada nos machos híbridos. Nesses machos híbridos foi encontrado o maior grau de amplificação detectado nesse trabalho, caracterizado pela presença de "massas" e um ou dois segmentos extra.

Portanto, embora o significado funcional dessa amplificação permaneça desconhecido, o fato de que ela permite separar as linhagens isofêmeas da mesma maneira que os demais parâmetros, parece convalidar o seu uso como medida da divergência entre as mesmas.

Sene **et al.** (1988) e Tosi & Sene (1989) indicam uma diferenciação em mosaico, segundo a qual as populações de **D. serido** analisadas se diferenciaram mais ou menos simultaneamente, a partir do isolamento de populações de uma mesma espécie com distribuição geográfica contínua. Aqueles autores admitem que esse isolamento ocorreu durante os ciclos paleoclimáticos do período quaternário, com a expansão da vegetação úmida e a retração da vegetação seca,

que inclue as cactáceas a que as espècies do conjunto **D. serido** estão associadas.

Os dados de Lapenta (1992), sobre os padrões de esterases em populações de **D. serido** e **D. buzzatii**, reforçam essa idèia da diferenciação em mosaico. Com base em bandas com atividade esterásica, compartilhadas e exclusivas, Lapenta (**op. cit.**) estabeleceu uma hipòtese de divergência das linhagens isofêmeas analisadas, a qual mostra que a linhagem A95 e a linhagem de **D. buzzatii** compartilham bandas que não foram observadas nas outras linhagens, e que, por isso, mostram uma linha evolutiva diferente das linhagens B50, B59, A55, B31, B20 e B25. Esse estudo mostrou também, maior proximidade entre as linhagens B20 e B25 e entre as linhagens B50, B59, A55 e B31, sendo que B31 é a mais diferenciada desse grupo.

A reunião dos dados obtidos no presente trabalho com os resultados dos diferentes marcadores já analisados das mesmas linhagens isofêmeas ou de linhagens isofêmeas da mesma procedência permite compor o quadro apresentado na Tabela 16, onde se observa que a classificação das linhagens isofêmeas com base nos resultados de fertilidade, fecundidade, grau de sinapse dos cromossomos politênicos e presença de material cromossômico extra nos hìbridos, concorda com a classificação baseada nos dados de isolamento reprodutivo (Bizzo, 1983), isolamento sexual (Moraes, 1992) e resultados dos padrões de esterases obtidos pela análise de dependência (Lapenta, 1992).

De um lado esses dados mostram que A95 está diferenciada de **D. serido** e **D. koepferae** suficientemente, ao nosso ver, para ser

descrita como uma terceira espécie da superespécie **D. serido**. De outro lado, os detalhes da variação das características permitem refletir sobre questões complexas do processo evolutivo dessas populações levantadas por autores como Sene **et al.**(1982), Tosi & Sene (1989), Sene **et al.**(1988) e Silva & Sene (1991).

Por exemplo, entre os marcadores analisados, existiria algum fundamental no processo de especiação? Qual ou quais estariam envolvidos primariamente ou secundariamente nesse processo?

Há ainda a considerar a não concordância dos dados de inversões, cariótipo, edeago e padrão de esterases analisado por índice de similaridade, com os outros marcadores já mencionados.

Tendo em vista a hipótese de distribuição das populações de **D. serido** em áreas isoladas ou "refúgios" (Tosi & Sene, 1989), podemos questionar se algum dos modelos de especiação atuante nessas populações não seria semelhante ao do princípio do fundador e da especiação em ilhas, descrito por exemplo para as drosófilas havaianas (Carson, 1974). Baimai **et al.** (1983) sugeriram que as populações geograficamente isoladas das espécies cactofílicas de **Drosophila** na Região Neotropical, poderiam ser comparadas com a situação dos "Kipuka" nas ilhas do Havaí, onde uma especiação explosiva de espécies de **Drosophila** ocorreu através de eventos de "flush" e "crash", como postulado por Carson (1968, 1971).

Ressalvando o fato de termos trabalhado com pequeno número de linhagens isofêmeas, mantidas por aproximadamente uma décadas em laboratório, os dados obtidos no presente trabalho são mais um reforço para a idéia, bastante difundida na literatura, de que cada espécie ou mesmo cada população é única no seu padrão evolutivo em

decorrência da interação diferencial do complexo conjunto de mecanismos envolvidos no processo.

Tabela 16. Classificação geral das linhagens isofêmeas da superespécie **D.serido** com base nos marcadores utilizados na literatura e no presente trabalho.

Linhagem	Cariótipo *	Inversões **	Edeago ***	Isolamento Reprodutivo ****	Isolamento Sexual +	Padrão de Esterase ++ IS(X)	Padrão de Esterase ++ ANADEP	Fertilidade +++	Fecundidade "cluster analysis" +++	Grau de sinapse Cromossômica +++	Presença de "Material extra" +++
B5003	I	IV	B	II	I	III	II	I	I	I	I
B5901	I	IV	B	II	-	III	II	I	I	I	I
A55F11	I	IV	B	II	-	III	II	I	I	I	I
B31D1	V	II	D	II	I	II	II	I	I	I	I
A95C3	II	IV	C	III	II	IV	III	II	II	II	II
B2002	IV	III	E	V	-	I	I	III	III	III	III
B25D7	IV	III	E	V	III	I	I	III	III	III	III

* Baimai et al., 1983; ** Tosi, 1982; Tosi & Sene, 1989; *** Silva & Sene, 1991; **** Bizzo,1983; + Moraes, 1992; ++ Lapenta, 1992; +++ Presente trabalho.

V. RESUMO E CONCLUSÕES

Drosophila serido é atualmente considerada uma superespècie constituída de duas espècies: **D. serido** (Brasil) e **D. koepferae** (Argentina e Bolívia). Entretanto, muitos autores concordam que isto não expressa toda a complexidade evolutiva dessas populações. Estudos morfológicos, reprodutivos e citogenéticos têm mostrado uma extensa variabilidade entre populações de diferentes localidades. Com o objetivo de entender melhor o grau de diferenciação entre populações dessa superespécie, foram estudados aspectos reprodutivos e citogenéticos em cinco linhagens isofêmeas classificadas como **D. serido** e duas como **D. koepferae**, além de uma linhagem de **D. buzzatii**.

A análise da fertilidade (entendida como porcentagem de cruzamentos férteis), mostrou que todas as linhagens são altamente férteis nos seus intracruzamentos, embora B20 e B25, (**D. koepferae**, da Argentina) sejam significativamente menos férteis que as demais linhagens.

Quanto à fecundidade (entendida como número médio de descendentes), nos intracruzamentos, foram significativas as diferenças de B31 quando comparada com todas as demais linhagens isofêmeas, exceto B20 e B25; estas três linhagens foram as que apresentaram as menores produtividades.

Com base na fertilidade, os dados do presente trabalho permitem reconhecer, basicamente, dois grupos de linhagens isofêmeas cujo intercruzamento è afetado em uma das direções, a qual se mostra estèril ou fracamente produtiva. Dentro dos grupos, porèm, a fertilidade è elevada nas duas direções de cruzamento. Um desses

grupos é composto pelas linhagens B20D2 e B25D7 (**D. koepferae**) e o outro pelas linhagens B50Q3, B59D1, A55F11 e B3D11 (**D. serido**). Uma terceira situação foi observada quanto à linhagem isofêmea A95F3 (classificada presentemente como **D. serido**), a qual intercruza relativamente bem com B50, mas está isolada assimetricamente de B59, A55 e B31, bem como do grupo composto por B20D2 e B25D7.

Em relação às linhagens isofêmeas analisadas neste trabalho, observou-se que, algumas vezes, o intercruzamento é mais produtivo que o intracruzamento, que a alta fertilidade nem sempre é acompanhada de alta fecundidade, que em situações a baixa fertilidade é acompanhada de baixa fecundidade e até mesmo podem ocorrer baixa fertilidade e alta fecundidade nos poucos cruzamentos férteis.

A partir de dados de agrupamento ("cluster analysis") relativos aos padrões de produtividade, foram estabelecidas as relações de proximidade, entre as linhagens, considerando a interação de cada fêmea com todos os machos e de cada macho com todas as fêmeas. Em ambos os casos, as interações seguem o mesmo padrão, isto é, A95 encontra-se mais próxima de **D. koepferae** e de **D. serido**, do que **D. koepferae** de **D. serido**. A partir desses resultados e outros da literatura é discutido se A95 pode pertencer à população ancestral que originou **D. koepferae** e **D. serido** ou se é espécie derivada.

Os híbridos mostraram um grau variável de sinapse, sendo que as extremidades proximais e distais dos cromossomos são as regiões mais constantemente desemparelhadas. Foi possível distinguir três situações quanto à sinapse. Sinapse completa, foi observada nos

intercruzamentos das linhagens incluídas em cada um dos dois grupos definidos com base na fertilidade e fecundidade, isto é, entre B50, B59, A55, e B31 de um lado e entre B20 e B25 de outro. Um alto grau de assinapse foi observado nos híbridos de cruzamentos entre linhagens isofêmeas dos dois grupos. Já a linhagem isofêmea A95 teve um comportamento variável com relação a esses dois grupos. Em intercruzamentos com as linhagens B25 e B20 mostrou um alto grau de assinapse enquanto em intercruzamentos com B50, B59, A55 e B31 o grau de assinapse foi moderado.

As relações de proximidade entre as linhagens isofêmeas estabelecidas com base nos agrupamentos de fecundidade não encontram paralelismo completo nesses resultados quanto ao grau de assinapse. Por ambos os resultados, pode-se interpretar que B25 e B20 de um lado e B50, B59, A55 e B31, de outro, são as linhagens mais diferenciadas e, portanto, mais distantes, e que a linhagem isofêmea A95 diferencia-se de ambos os grupos. Contudo, nos resultados de fecundidade, A95 encontra-se mais próxima de **D. koepferae** (B20 e B25) do que de **D. serido** (B50, B59, A55 e B31), enquanto nos resultados de sinapse ocorre o contrário, sendo o emparelhamento cromossômico menor com **D. koepferae** do que com **D. serido**.

Com base no material cromossômico extra presente nos núcleos politênicos de híbridos de alguns intercruzamentos, as linhagens isofêmeas também puderam ser separadas da mesma forma que os outros parâmetros. Alto grau de amplificação nos machos híbridos só ocorre quando há intercruzamento entre B20 ou B25 com B50 ou B59 ou A55 ou B31. Da mesma maneira que no estudo dos parâmetros anteriores, a linhagem isofêmea A95 comportou-se

diferentemente com relação aos dois grupos. Quando fêmeas dessa linhagem são cruzadas com machos de qualquer dos dois grupos não ocorre nenhuma amplificação detectável. Porém, nos cruzamentos recíprocos ocorre amplificação, moderada nas fêmeas e acentuada nos machos híbridos. Nesses machos híbridos foi encontrado o maior grau de amplificação detectado nesse trabalho, caracterizado pela presença de "massas" e um ou dois "segmentos extra".

Houve, portanto, basicamente, concordância quanto à proximidade evolutiva entre as linhagens isofêmeas, estabelecida com base nos 4 parâmetros analisados no presente trabalho. Estes dados, somados aos já existentes na literatura, mostram que a linhagem isofêmea A95 apresenta características que a apontam como suficientemente diferenciada de **D. serido** e **D. koepferae** para ser descrita como uma terceira espécie na superespécie **D. serido.**

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Drosophila serido is considered to be a superspecies consisting of two species: **D. serido** from Brasil and **D. koepferae** from Argentina and Bolivia. However this probably does not express the entire evolutionary complexity of its populations. Several studies on morphology, reproduction and cytogenetics have shown that **D. serido** populations with different geographic origins present extensive variability. In order to better understand the differentiation among these populations, five isofemale lines at present classified as **D. serido**, two isofemale lines classified as **D. koepferae** and one isofemale line of **D. buzzatti** were analyzed as to reproductive and cytogenetic aspects.

Fertility (percentage of fertile crosses) and fecundity (mean number of descendants) in pair mating intra and intercrosses, F1 fertility, degree of asynapsis in polytene chromosomes of hybrids and the presence and meaning of additional chromosome material found in hybrids were analyzed.

All the isofemale lines were highly fertile in intracrosses, but B20 and B25 (**D. koepferae**, from Argentina) had fertility significantly lower than that of the other lines.

Intracross fecundity of B31 was significantly lower than that of every other isofemale line, except B20 and B25.

On the basis of interstrain fertility, isofemale lines were separated into two groups, one constituted by B20 and B25 (**D. koepferae**) and the other by B50, B59, A55 and B31 (**D. serido**). One direction of intercrosses between isofemale lines from both groups is sterile or exhibits very low productivity. Intercrosses between

isofemale lines from the same group, however, are highly fertile in both crossing directions. A third situation was found in crosses of isofemale line A95 (at present classified as **D. serido**) with isofemale lines from both previously mentioned groups. Except in crosses with B50, A95 exhibits asymmetrical isolation.

Cluster analyses of productivity patterns were also used in an attempt to quantify the differentiation of the isofemale lines. The results were the same considering productivity in crosses of females of each line with males of all the other lines, as well as or considering productivity in crosses of males of each line with females of all the other lines. In both cases cluster analyses showed that the A95 isofemale line is closer to **D. koepferae** (B20, B25) and **D. serido** (B50, B59, A55 and B31) than these two species to each other.

The highest degree of asynapsis in salivary gland chromosomes of hybrids was observed in crosses between isofemale lines B20 or B25 and any of the lines B50, A55, B59 or B31. The isofemale line A95 showed a high degree of asynapsis in crosses with B20 or B25, but in crosses with any of the other four lines the degree of asynapsis was lower. Complete pairing was observed in intracrosses and in crosses between isofemale lines of the same group.

Comparison of results on fecundity and asynapsis degree showed that in both cases as also on the basis of data for fertility, the isofemale lines studied may be separated in to three differentiation groups: one constituted by B20 and B25, another by B50, B59, A55 and B31, and the third by A95. On the basis of cluster

analysis, however, the A95 isofemale line is closer to **D. koepferae** (B20 and B25) than to **D. serido** (B50, B59, A55 and B31), while on the basis of asynapsis degree the opposite seems true.

Extra masses of heterochromatin and a small chromosome segment exhibiting a caracteristic banding pattern, which are present in some hybrids, were also used for evaluating the degree of differentiation of isofemale lines. The extra chromosome material was found in hybrids between isofemale lines of the different groups, already established on the basis of the other parameters studied.

Thus, the present study reinforces data in literature, strongly indicating A95 as representing a population of a species distinct from **D. serido** and **D. koepferae.**

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB'SABER, A.N. 1977. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos da América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. **Paleoclimas**, v. 3, p. 1-19.

BAIMAI, V., SENE, F.M., PEREIRA, M.A.Q.P. 1983. Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactus - breeding species of the **Drosophila repleta** species group. **Genetica**, v. 60, p. 81-92.

BICUDO, H.E.M.C. 1979. Estudo citogenético de espécies de **Drosophila** do complexo mulleri (Grupo **repleta**), com ênfase à regulação da atividade organizadora nucleolar. Tese de Livre Docência. IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto.

BICUDO, H.E.M.C., RICHARDSON. R.J.H. 1977. Gene regulation in **Drosophila mulleri**, **D. arizonensis**, and their hybrids: The nucleolar organizer. **Proc. Natl. Acad. Sci.** (USA), v. 74, p. 3498-3502.

BICUDO, H.E.M.C., RICHARDSON, R.H. 1978. Morphological and developmental studies of **Drosophila mulleri**, **D. arizonensis** and their hybrids. **Biol. Zbl.**, v. 97, p. 195-203.

BINGHAM, P.M., KIDWELL, M.G., RUBIN, G.M. 1982. The molecular basis of PM hybrid dysgenesis: the role of the P element, P-strain-specific transposons family. **Cell**, v. 29, p. 995-1004.

BIZZO, N.M.V. 1983. Estudos sobre a biologia e isolamento reprodutivo em **Drosophila serido**, Dissertação de Mestrado, Depto de Biologia, Instituto de Biociências, USP, São Paulo.

BOCK, I.R. 1984. Interspecific hybridization in the genus **Drosophila**. **Evol. Biol.**, v. 18, p. 41-70.

BUSH, G.L., CASE, S.M., WILSON, A.C., PATTON, J.L. 1977. Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. **Proc. Natn. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 3942.

CARSON, H.L. 1968. The population flush and its genetic consequences. **In:** Population biology and evolution. R.G. Lewontin, ed., Syracuse University Press, p.p. 123-137.

CARSON, H.L., 1971. Speciation and founder principle. Stadler Genetics Symposia, v. 3, p. 51-70.

CARSON, H.L. 1974. Pattens of speciation in Hawaiian **Drosophila** inferred from ancient chromosomal polymorphism. **In: Genetic Mechanisms of Speciation in Insects.** M.J.D. White, ed., Sydney: Australia and New Zealand Book Co, p. 81-93.

CARSON, H.L. 1975. The genetics of speciation at the diploid level. **Am. Nat.** , v. 109, p. 73-92.

COMINGS, D.E., RIGGS, A. 1971. Molecular mechanisms of chromosome, pairing, folding and function. **Nature**, v. 233, p. 48-50.

CORDEIRO, A.R. 1968. Cromosomal pairing variability of interspecific hibrids of **D. willistoni** crytic group. Proc. XII Congr. Genet. 191.

CORDEIRO, J.A. 1990. Análise de dependência. Tese de Livre Docência. IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto-SP.

COYNE, J.A. 1983. Genetic basis of differences in genetical morphology among three sibling species of **Drosophila. Evolution**, v. 37, n. 6, p. 1101-1118.

COYNE, J.A., ORR, H.A. 1989. Patterns of speciation in **Drosophila. Evolution**, v. 43, p. 362-381.

CROW, J.F. 1942. Cross fertility and isolating mechanisms in the **Drosophila mulleri** group. **Univ. of Texas Publ.**, v. 4228, p. 53-67.

DOBZHANSKY, Th. 1936. Studies of hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in **Drosophila pseudoobscura** hybrids. **Genetics**, v. 21, p. 113-135.

DOBZHANSKY, Th. 1937. Genetics and the Origin of Species. 1a. ed. Nova York, Columbia Univ. Press.

DOBZHANSKY, Th. 1973. **Genética do Processo Evolutivo.** Eds. USP e Polígono, São Paulo.

DOBZHANSKY, Th. 1974. Genetic analysis of hybrid sterility within the species **Drosophila pseudoobscura. Hereditas**, v. 77, p. 81-88.

DOBZHANSKY, Th. 1975. The X-chromosome in the larval salivary glands of hybrids **Drosophila insularis** x **Drosophila tropicalis. Chromosoma**, v. 8, p. 691-698.

EHRMAN, L., WASSERMAN, M. 1988. The significance of asymmetrical sexual isolation. **Evol. biol**, v. 21, p. 1-20.

ENGELS, W.R., PRESTON, C.R. 1979. Hybrid disgenesis in **Drosophila melanogaster:** the biology of male and female sterility. **Genentics**, v. 92, p. 161-174.

EVERITT, B.S. 1974. **Cluster Analysis**, Haltead Press, London.

EVGEN'EV, M.B. 1971. The pattern of polytene chromosome conjugation and crossing-over in interspecific hybrids of **Drosophila. Theoretical and Applied Genetics**, v. 41, p. 249-254.

EVGEN'EV, M.B.; POLIANKAYA, G.G. 1976. The pattern of polytene chromosome synapsis in **Drosophila** species and interspecific hybrids. **Chromosoma**, v. 57, p. 285-295.

FLEIS, J.L. 1981. **Statistical Methods for Rates and Proportion**, 2a. ed. New York: Wiley- Interscience.

FONTDEVILA, A., PLA, S., HASSON, E., WASSERMAN, M., SANCHEZ, A., NAVEIRA, H., RUIZ, A. 1988. **Drosophila koepferae**: A new member of the **Drosophila serido** (Diptera, Drosophilidae). Superspecies Taxon. **Annals. of the Entomol Soc. of America**, v. 81, n. 3, p. 380-385.

GIDDINGS, L.V., TEMPLETON, A.R. 1983. Behavioral phylogenies and the direction of evolution. **Science**, Washington, v. 220, p. 372-378.

GINZBURG, L.R., BINGHAM, P.M., YOO, S. 1984. On the theory of speciation induced by transposable elements. **Genetics**, v. 107, p. 331-341.

GOULD, S.J. 1980. Is a new and general theory of evolution emerging. **Paleobiology**, v. 3, p. 115-151.

HUTTER, P., ASHBURNER, M. 1987. Genetic rescue of inviable hybrids between **Drosophila melanogaster** and its sibling species. **Nature**, v. 327, p. 331-333.

HUTTER, P., ROOTE, J., ASHBURNER, M. 1990. A genetic basis for the inviability of hybrids between sibling species of **Drosophila**. **Genetics**, v. 124, p. 909-920.

JOHN, B. 1976. Myths and mechanisms of meiosis. **Chromosoma**, v. 54, p. 295-325.

JOHN, B. 1988. The biology of heterocromatin. **In:** Heterochomatin Molecular and Structural Aspects. Edited by Ram S. Verna. Cambridge University Press, 301 pp.

KAMBYSELLIS, M.P. 1970. Compatibility in insect tissue transplantations I. Ovarian species endemic to Hawaii. **J. Exp. Zool.**, v. 175, p. 169-180.

KANESHIRO, K.Y. 1976. Ethological isolation and phylogeny in the **planitibia** subgroup of Hawaiian **Drosophila. Evolution**, v. 30, p. 740-745.

KANESHIRO, K.Y. 1980. Sexual isolation, speciation and the direction of evolution. **Evolution**, v.34, p. 437-444.

KANESHIRO, K.Y., GIDDINGS, L.V. 1988. The significance of asymetrical sexual isolation and the formation of new species. **Evol. Biol.**, v. 21, p. 29-43.

KIDWELL, M.G. 1983. Evolution of hybrids dysgenesis determinants in **Drosophila melanogaster. Proceedings of the National Academy of Science**, USA, v. 80, p. 1655-1659.

KIDWEEL, M.G., KIDWEEL, J.F., SVED, J.A. 1977. Hybrid dysgenesis in **Drosophila melanogaster:** a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility, and male recombination. **Genetics**, v. 86, p. 813-833.

LACHAISE, D., DAVID, J.R., LEMEUNIER, F., TSACAS, L., ASHBURNER, M. 1986. The reproductive relationship of **Drosophila sechellia** with **D. mauritiana**, **D. simulans** and **D. melanogaster** from the afrotropical region. **Evolution**, v. 40, p. 262-271.

LAKHOTIA, S.C. 1984. Replication in **Drosophila** chromosomes. XII. Reconfirmation of underreplication of heterochromatin in polytene nuclei by cytofluorometry. **Chromosoma**, v. 89, p. 63-67.

LAPENTA, A.S. 1992. Padrão de esterases na superespècie **Drosophila serido** e em **D. buzzatii**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo.

LEMEUNIER, F., ASHBURNER, M. 1984. Relationship within the **melanogaster** species subgroup of the genus **Drosophila** (Sophophora). IV. The chromosomes of two new species. **Chromosoma**, v. 89, p. 343-351.

MADI-RAVAZZI, L. 1988. Aspectos citogenéticos, reprodutivos e especiação em **Drosophila serido**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo.

MADI-RAVAZZI, L., BICUDO, H.E.M.C. 1992. Differentiation of **Drosophila serido** (isofemale line A95F3) and **D. koepferae** (isofemale line B20D2) reproductive isolation, development time and polytene chromosome banding patterns. Revista Brasileira de Genética (no prelo).

MANZATO, A.J. 1983. **Análise hierárquica de Agrupamento para Distribuições Multinomiais**; Dissertação de Mestrado, IME-USP, São Paulo.

MAYFIELD, J. E., ELLISON, J. R. 1975. The organization of interphase chromatin in Drosophilidae. **Chromosoma**, v. 52, p. 37-48.

MAYR, E. 1963. Animal species and evolution. Cambridge, Mass: Harvard Univ. Press.

MAYR, E. 1977. **Populações, espécies e evolução.** São Paulo, Ed. Nacional/EDUSP, 1977. 485p.

MAYR, E. 1982. Processes of speciation of animals. **In:** Mechanisms of Speciation, ed. C. Barigozzi, New York: Liss, p. 1-9.

MCNEIL, D.R. 1977. **Interactive Data Analysis.** John Wiley & Sons.

MERREL, D.J. 1981. Ecological Genetics. Univ. of Minnesota Press.

METZ, CH. W. 1916. Chromossome studies on the diptera. II. The paired association of chromossomes in the diptera, and its significance. **J. Exp. Zoology**, v. 21, p. 213-279.

MICHAILOVA, P. 1987. C-banding in the polytene chromosome of species of the plumosus group (Diptera, Chironomidae) and their experimental hybrids. **Genetica**, v. 74, p. 41-51.

MORAES, M.A.M. 1992. Isolamento sexual entre populações da superespècie **Drosophila serido** (Diptera, Drosophilidae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, USP, São Paulo.

NAVEIRA, H., FONTDEVILA, A. 1986. The evolutionary history of **Drosophila buzzatii.** XII. The genetics basis of sterility in hybrids between **D. buzzatii** and its sibling **D. serido** from Argentina. **Genetics**, v. 114, p. 841-857.

NAVEIRA, H., HAUSCHTECK - JUNGEN, E., FONTDEVILA A. 1984. The evolutionary history of **D. buzzatii.** VII. Spermiogenesis of inversion heterozygotes in backcross hybridis between **Drosophila** buzzatii and **Drosophila serido. Genetica**, v. 65, p. 205-214.

NAVEIRA, H., PLA, C., FONTDEVILA, A. 1986. The evolutionary history of **D. buzzatii**. XI. A new method for cytogenetic localization basid on asynapsis of polytene chromosomes in interspecific hybrids of **Drosophila. Genetica**, v. 71, p. 199-212.

NETER, J., WASSERMAN, W. 1974. **Applied Linear Statistical Models**; Homewood: Richard D. Irwin.

ORR, H.A. 1987. Genetics of male and female sterility in hybrids of **Drosophila pseudoobscura** and **Drosophila persimilis. Genetics**, v. 116, p. 555-563.

ORR, H.A. 1989. Genetics of sterility in hybrids between two subspecies of **Drosophila. Evolution**, v. 43, n. 1, p. 180-189.

PAINTER, T.S. 1933. A new method for the study of chromosome maps. **Science**, v. 78, p. 585-586.

PARDUE, M.L., DAWID, J.B. 1981. Chromosomal locations of two DNA segments that flank ribosomal insertion - like sequences in **Drosophila**: flanking sequences are mobile elements. **Chromosoma**, v. 83, p. 29-43.

PATHAK, S., HSU, T.C. 1976. Cromosomes and DNA of Mus. The behavior of constitutive heterochromatin in spermatogenesis of **M. dumni**. **Chromosoma**, v. 57, p. 227-234.

PATTERSON, J. T. 1947. Sexual isolation in the **mulleri** subgroup. **In**: "Studies in the Genetics of **Drosophila**". V. Isolating mechanisms. **Univ. of Texas Publs.**, v. 4720, p. 32-40.

PATTERSON, J.T., WHEELER, M.R. 1942. Description of new species of the subgenera **Hirtodrosophila** and **Drosophila. Univ. Texas Publs.**, v. 4213, p. 67-109.

PATTERSON, J.T., STONE, W.S. 1952. Evolution in the genus **Drosophila**. Mac Millan., Co, New York.

PEREIRA, M.A.Q.R., VILELA, C.R., SENE, F.M. 1983. Notes on breeding and feeding sites on some species of the repleta group of the genus **Drosophila** (Diptera, Drosophilidae). **Ciência e Cultura**, v. 35, n. 9, p. 1313-1319.

PERES, C.A., SALDINA, C.D. 1983. **Planejamento de Experimentos**, 5o. Sinape, São Paulo, SP.

PLAUT, 1963. On the replicative organization of DNA in the polytene chromosome of **Drosophile melanogaster**. **J. Mol. Biol.**, v. 7, p. 632-635.

PRAKASH, S. 1972. Origin of reproductive isolation in the absence of apparent genic differentiation in a geographic isolate of **Drosophila pseudoobscura**. **Genetics**, v. 72, p. 143-155.

RIEDE, I., RENZ, M. 1983. Study on the somatic pairing of polytene chromosomes. **Chromosoma**, v. 88, p. 116-123.

ROSE, R.R., DOOLITTLE, W.F. 1983. Molecular mechanisms of speciation. **Science**, v. 220, p. 157-162.

RUBIN, G.M., KIDWELL, M.G., BINGHAM, P.M. 1982. The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis. The nature of induced mutation. **Cell**, v. 29, p. 987-994.

RUIZ, A., FONTDEVILA, A. 1981. Ecologia Y evolution del subgrupo **mulleri** de **Drosophila** en Venezuela Y Colombia. **Acta Cient. Venezolana**, v. 32, p. 338-345.

RUIZ, A., HEED, W.B., WASSERMAN, M. 1990. Evolution of the **Mojavensis** cluster of cactophilic **Drosophila** with description of two new species. **Journal of Heredity**, v. 81, p. 30-42.

RUIZ, A., FONTDEVILA, A., WASSERMAN, M. 1982. The evolutionary history of **Drosophila buzzatii**. III. Cytogenetic relationship between two sibling species of the **buzzatii** cluster. **Genetics**, v. 101, p. 503-518.

SENE, F.M., PEREIRA, M.A.Q.R., VILELA, C.R. 1982. Evolutionary aspects of cactus breeding **Drosophila** species in South Americ, p. 97-106. **In:** Ecological Genetics and Evolution, Acad. Press, Australia.

SENE, F.M., PEREIRA, M.A.Q.R., VILELA, C.R. 1988. Contrasting patterns of differentiation inferred from tradicional genetic markers in the process of speciation. **Pacific Science**, v. 42, p. 81-88.

SILVA, A.F.G. 1981. Sistemática de **Drosophila serido** (Diptera, Drosophilidae). **Ciência e Cultura**. v. 33, n. 7, p. 684.

SILVA, A.F.G., SENE, F.M., 1991. Morphological geografic variability in **Drosophila serido** (Diptera, Drosophilidae). **Rev. Bras. Ent.**, v. 35, n. 2, p. 455-468.

SINGH, B.N., CHATTERJEE, S. 1987. Variation in mating propensity and fertility in isofemale strains of **Drosophila ananassae**. **Genetica**, v. 73, p. 237-242.

SOKAL, R.R., ROHLF, F.J. 1962. **The Comparison of Dendrograms by objetive Methods**. Toxionomy, W.H. FREEMAN, San Francisco and London.

SOKAL, R.R., SNEATH, P.H. 1963. **Principles of Numerical Toxionomy**, W.R. FREEMAN, San Francisco and London.

STROBEL, E.; DUNSMUIR, P.; RUBIN, G. M. 1979. Polymorphisms in the chromonomal locations of elements of the 412, copia and 297 dispersed reperated gene families in **Drosophila. Cell**, v. 17, p. 429-439.

TADEI, W.P., BICUDO, H.E.M.C. 1981. Experimental populations of **Drosophila prosaltans**, **D. saltans**, and their hybrids. I. Chromosomal evolution. **Revista Brasileira de Genética**, v. 4, p. 549-570.

TAKAMURA, T., WATANABE, T.K. 1980. Further studies on the lethal hybrid rescue (Lhr) gene of **Drosophila simulans. Jpn. J. Genet.**, v. 55, p. 405-408.

TEMPLETON, A.R. 1980. The theory of speciation via the founder principle. **Genetics**, v. 94, p. 1011-1038.

TEMPLETON, A.R. 1981. Mechanisms of speciation-a population genetic approach. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 12, p. 23-48.

THROCKMORTON, L.H. 1975. The phylogeny, ecology, and geography of **Drosophila**, pp. 421-489. In: R.C. KING (ed), Handbook of Genetics, vol. 3, Plenum, N.Y.

TOSI, D. 1982. Análise das inversões cromossômicas de **D. serido**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, USP, São Paulo.

TOSI, D., SENE, F.M. 1989. Further studies on chromosomal variability in the complex taxon **Drosophila serido** (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 12, n. 4, p. 729-745.

TUKEY, J.W. (1977). **Exploratory data analysis** ADDISON NESLEY Publ. Co., Reading, Mass.

VILELA, C.R. 1981. Ph.D. Thesis. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

VILELA, C.R. 1983. A revision of the **Drosophila repleta** species group (Diptera, Drosophilidae). **Rev. Bras. Entomol.**, v. 27, p. 1-114.

VILELA, C.R., SENE, F.M. 1977. Two new neotropical species of **D. repleta** group of the genus **Drosophila** (Diptera, Drosophilidae). **Pap. Avulsos Zool** (São Paulo), v. 30, p. 295-299.

VILELA, C.R., SENE, F.M., PEREIRA, M.A.Q.R. 1980. On the **Drosophila** fauna of chaco and east slopes of the Andes in Argentina. **Rev. Bras. Biol.**, v. 40, p. 837-841.

VILELA, C.R., PEREIRA, M.A.Q.R., SENE, F.M. 1983. Preliminary data on geografical distributions of **Drosophila** species within morphoclimatic domains of Brazil. II. The repleta group. **Ciência e Cultura**, v. 35, p. 66-68.

ZOUROS, E. 1981. The chromosomal basis of sexual isolation in two sibling species of **Drosphila, D. arizonensis** and **D. mojavensis**. **Genetics**, v. 97, p. 703-718.

WASSERMAN, M. 1954. Cytological studies of the Repleta group. **Univ. of Texas Publ.**, v. 5422, p. 130-152.

WASSERMAN, M. 1962. Cytological studies of the repleta group of the genus **Drosophila**. V. The **mulleri** group. Univ. Texas Publ., v. 6205, p. 85-118.

WASSERMAN, M. 1982. Cytological evolution in the **Drosophila repleta** species group, pp. 49-64. **In:** J.S.F. BARKER and W.T. STARNER (eds.), Ecological Genetics and Evolution: The cactus - Yeast - **Drosophila** - Model System. Academic Press, Sydney, Australia.

WASSERMAN, M., KOEPFER, H.R. 1980. Does asymmetrical mating preference show the direction of evolution? **Evolution**, v. 34, p. 1116-1126.

WASSERMAN, M., RICHARDSON, R.H. 1987. Evolution of Brasilian **Drosophila mulleri complex** species. **The Journal of Heredity**, v. 78, p. 292-186.

WASSERMAN, M., FONTDEVILA, A., RUIZ, A. 1983. Potential gene exchange between south American **Drosophila** species, with description of a new species in the **D. repleta** (Diptera, Drosophilidae) group. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 76, p. 675-677.

WATANABE, T.K. 1979. A gene that rescues the lethal hybrids between **Drosophila melanogaster** and **D. simulans**. **Jpn. L. Genet.**, v. 54, p. 325-331.

WATANABE, T.K., KAWANISHI, M. 1979. Mating preference and the direction of evolution in **Drosophila**. **Science**, Washington, v. 205, p. 906-907.

WHITE, M.J.D. 1978. "Modes of Speciation". W.H. FREEMAN and Co., San Francisco.

WRIGHT, S. 1940. Breeding structure of populations in relation to speciation. **Amer. Natur.**, v. 74, p. 232-248.

YAMAMOTO, M., MIKLOS, G.L.G. 1977. Genetic dissection of heterochromatin in **Drosophila**: The role of basal heterochromatin in meiotic sex chromosome behaviour. **Chromosoma**, v. 60. p. 283-296.

YAMAMOTO, M. 1979. Cytological studies of heterochromatin function in the **Drosophila melanogaster** male: Autosomal meiotic pairing. **Chromosoma**, v. 72, p. 293-328.

