

Luciana Paes de Barros Machado

**Parâmetros Reprodutivos e Grau de
Assinapse nos Cromossomos
Politênicos de Espécies de Drosophila
do Cluster Buzzatii**



LUCIANA PAES DE BARROS MACHADO

**PARÂMETROS REPRODUTIVOS E GRAU DE ASSINAPSE
NOS CROMOSSOMOS POLITÊNICOS DE ESPÉCIES DE
Drosophila DO CLUSTER *buzzatii***



844/99

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas-Genética.

já zerado

São José do Rio Preto - SP

1998

O presente 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, sob orientação do Prof. Dr. Wladimir João Tadei, e co-orientação da Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi, com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*Para Roxrio e Lilian, está os quais
este trabalho não seria possível.
Tentando postar essas frases com o
nome de "amor-perfeito" e "não se
esqueça de mim".*

Para **Rogério e Lilian**, sem os quais
este trabalho não seria possível.

*Tentando pintar essas flores com o
nome de “amor-perfeito” e “não-te-
esqueças-de-mim”.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wlademir João Tadei, por ter aceito me orientar e por sempre tratar seus orientados não apenas como alunos, mas também como colegas de profissão.

À Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi, minha orientadora há muitos anos, pela orientação, amizade, paciência, incentivo, e por ter apontado o caminho que hoje quero seguir.

À Profa. Adriana Barbosa Santos do Departamento de Ciências da Computação e Estatística deste Instituto, pela análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. James Robert Coleman, do Departamento de Botânica deste Instituto, e à Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, do Departamento de Biologia deste Instituto, pela revisão do "Abstract and Conclusions".

Ao Departamento de Biologia deste Instituto que possibilitou a realização deste trabalho.

À pós-graduanda Juliana Polachini de Castro, pela análise da mobilidade dos espermatozoides.

A minha mãe, Ana Maria, aos meus irmãos prediletos, Paty e Nandinho, aos meus sogros, Mateus e Iris, por sempre acreditarem em mim.

Aos meus fiéis amigos, Ana Sílvia, Patricia, Sebaka, "Tio" Carlinhos, Rosana, Mara, Chopes, Cláudia, pela amizade e incentivo sempre. "Vamos amigos, antes que eles voltem!"

Ao "Tio" Carlinhos, por ter me acolhido em sua casa quando eu já não morava mais em Rio Preto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro recebido durante dois anos.

Agradeço em especial ao meu marido, Rogério, por me acompanhar sempre de perto em tudo, e pela inestimável participação na finalização deste trabalho.



Muito obrigada por tudo. “Mas quando chega o fim do dia eu só penso em descansar e voltar p’rá casa, pros teus braços.” Amo você!

A Deus, por tudo!

“Sei que às vezes uso

Palavras repetidas

Mas quais são as palavras

Que nunca são ditas?”



I. INTRODUÇÃO

1.1. A vida e a atividade criadora	10
1.2. A vida e a atividade científica	10
1.3. O trabalho e a vida	10
1.4. A vida e a atividade criadora	10

II. A VIDA E A ATIVIDADE CRIADORA

2.1. A vida e a atividade criadora	10
2.2. A vida e a atividade científica	10
2.3. O trabalho e a vida	10
2.4. A vida e a atividade criadora	10

“Vida devotada à atividade criadora em ciência é vida feliz. Nenhum outro modo de vida é igual ou superior em felicidade...Eu creio que o trabalho científico, juntamente com outras formas de trabalho criador, é o principal propulsor da evolução do espírito humano. A evolução do espírito humano dá significado à evolução humana e à evolução universal.”

T. Dobzhansky (1970)

IV. CONCLUSÃO

4.1. A vida e a atividade criadora	10
4.2. A vida e a atividade científica	10
4.3. O trabalho e a vida	10
4.4. A vida e a atividade criadora	10
4.5. A vida e a atividade científica	10
4.6. O trabalho e a vida	10
4.7. A vida e a atividade criadora	10

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	01
1. O conceito biológico de espécie x isolamento reprodutivo x especiação	01
2. Sinapse nos cromossomos politênicos	04
3. O grupo <i>repleta</i> do gênero <i>Drosophila</i> no estudo da especiação	08
4. O <i>cluster</i> <i>buzzatii</i>	10
II. MATERIAL E MÉTODOS	19
1. Linhagens e procedência geográfica	19
2. Fertilidade e fecundidade	21
3. Análise citogenética	23
4. Observação da corte	23
5. Análise da mobilidade dos espermatozóides	25
6. Análise estatística	25
III. RESULTADOS	26
1. Isolamento reprodutivo	26
2. Análise citogenética	55
3. Observação da corte dos casais dos inter cruzamentos parentais estéreis	59
4. Análise da mobilidade dos espermatozóides dos híbridos estéreis provenientes dos inter cruzamentos de F1	59
IV. DISCUSSÃO	64
1. As linhagens geográficas e suas relações reprodutivas de fertilidade e fecundidade	64
2. O isolamento sexual	71
3. A esterilidade do macho híbrido	71
4. O grau de sinapse nos cromossomos politênicos	74
5. Considerações finais	78



V. RESUMO E CONCLUSÕES	79
VI. ABSTRACT AND CONCLUSIONS	81
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

I. INTRODUÇÃO

1. O conceito biológico de espécie x isolamento reprodutivo x especiação

O termo espécie refere-se tanto à categoria taxonômica como ao conceito biológico. Frequentemente, as espécies taxonômicas são equivalentes às espécies biológicas. É muito importante ter em mente que alguns taxonomistas não usam o conceito biológico para definir suas espécies taxonômicas, eles baseiam-se nas diferenças morfológicas, e não consideram se essas diferenças apresentam ou não evidências de isolamento reprodutivo (Futuyma, 1992).

Durante décadas, a noção de isolamento reprodutivo tem sido apresentada como a chave do conceito biológico de espécies (Dobzhansky, 1937, 1975, Mayr, 1942, 1970, Bush, 1975, Dobzhansky *et al.*, 1977, White, 1978), e é usualmente expressa em termos de unidades mais abrangentes da organização biológica, tais como demes, populações, e conjuntos gênicos, ao invés de indivíduos.

Mayr (1970) definiu uma espécie biológica como um conjunto gênico protegido. Isto é, uma população mendeliana que tem sua própria estratégia, chamada de mecanismos de isolamento, para protegê-la do fluxo gênico prejudicial de outros conjuntos gênicos. Segundo Dobzhansky (1975), espécies de organismos com reprodução sexuada e assexuada são oriundas de populações reprodutivamente isoladas de outras populações. O isolamento reprodutivo é, assim, uma marca na distinção das espécies.

A expressão mecanismos de isolamento foi introduzida por Dobzhansky (1937) como um nome geral de todos os mecanismos que impedem ou previnem os intercruzamentos de complexos de raças ou espécies. Futuyma (1992) enfatiza que as características biológicas que fazem com que espécies simpátricas existam, isto é, mantenham conjuntos gênicos distintos são chamadas usualmente de mecanismos de isolamento, embora segundo este autor, esta possa ser uma expressão infeliz por sugerir que esses padrões evoluíram especificamente para impedir o intercruzamento, quando isto raramente acontece.



Várias hipóteses têm sido levantadas como explicações para a origem do isolamento reprodutivo. A idéia mais amplamente aceita e sustentada pelos sistematas é que os mecanismos de isolamento originam-se como um subproduto incidental da divergência genética à adaptação ambiental de populações isoladas (Prakash, 1972).

As pesquisas têm demonstrado que, sob uma seleção suficientemente forte, algum grau de cruzamento preferencial (isolamento reprodutivo) pode originar-se simpatricamente (Futuyma, 1992).

É importante considerarmos se a espécie evolui de um isolado geográfico, a chamada especiação alopátrica, ou de uma população contínua geograficamente, especiação parapátrica, ou se uma nova espécie pode evoluir dentro da área geográfica de seu ancestral, denominada especiação simpátrica.

A especiação simpátrica baseia-se em dois postulados: (a) o estabelecimento de novas populações em nichos ecológicos diferentes, dentro da área de distribuição da população paterna; (b) o isolamento reprodutivo dos fundadores da nova população, em relação aos indivíduos da população paterna. Postula-se, ainda, que o fluxo gênico entre as duas populações é inibido por fatores intrínsecos e não extrínsecos (Mayr, 1977). A maioria dos modelos existentes para este tipo de especiação é muito controvertido.

Um exemplo de especiação simpátrica é o relatado por Markow (1981). Esta autora analisou o comportamento da corte entre as espécies relacionadas *Drosophila mojavensis* e *D. arizonae*. Observando moscas de regiões onde as duas espécies ocorrem alopatricamente e simpatricamente (na mesma planta hospedeira) verificou que as fêmeas *D. mojavensis* simpátricas eram muito menos receptivas à corte dos machos de *D. mojavensis* do que as fêmeas alopátricas, sugerindo um caso de especiação simpátrica para essas populações. E ainda, esta mesma autora, em 1991, analisou a evolução do isolamento etológico entre populações de *D. mojavensis* e observou que houve isolamento entre as fêmeas da região de Sonora e os machos da Baja na Califórnia. Estas duas populações, de Sonora e Baja, utilizam como nicho a mesma planta hospedeira, sugerindo que a adaptação à planta hospedeira não é por si só o maior determinante do isolamento. A observação dos padrões de isolamento



sugere que o isolamento sexual nas populações de *D. mojavensis* são mais complexos do que apenas adaptação à planta hospedeira ou grau de diferenciação genética.

Existem diversos exemplos que apoiam especiação alopátrica, vindos em abundância a partir de dados de variação geográfica. As espécies variam geograficamente com relação a muitas características que podem bloquear a troca gênica entre espécies simpátricas (Futuyma, 1992).

Um exemplo de especiação alopátrica é o estudo de Prakash (1972), que mostrou não haver isolamento sexual entre populações de *D. pseudoobscura* de várias localidades dos Estados Unidos e da Guatemala e populações de Bogotá. Ele observou a ocorrência de acasalamentos completamente aleatórios entre moscas dessas diferentes populações. Entretanto, as populações de Bogotá apresentaram esterilidade dos machos híbridos F1 em uma das direções de cruzamento com as populações dos Estados Unidos e Guatemala. As populações de Bogotá fornecem, então, um exemplo de um isolado geográfico em processo de especiação. A esterilidade do macho de F1 em uma das direções de cruzamento, mais a perda da viabilidade em retrocruzamentos de machos mostram que um considerável isolamento reprodutivo foi desenvolvido nesta população. Os resultados obtidos por este autor fornecem suporte para o argumento que na maioria dos casos a esterilidade no cruzamento é adquirida em populações geograficamente isoladas. Quando populações que apresentam cruzamentos estéreis se tornam simpátricas, então haverá seleção para aquisição de mecanismos de isolamento adicionais, tal como isolamento sexual (Mayr, 1963, Dobzhansky, 1970, **apud** Prakash, 1972).

Prakash (1972) conclui que o isolamento reprodutivo poderá evoluir na população de Bogotá de *Drosophila pseudoobscura* como uma consequência do efeito do fundador, e não apenas como um subproduto da divergência genética a qual supõe-se ocorrer como uma resposta adaptativa ao ambiente.

Com uma seleção suficientemente forte sobre locos que contribuam para o isolamento reprodutivo, as populações podem se diferenciar em espécies isoladas reprodutivamente (Endler, 1977, Lande, 1982b, Barton e Charlesworth, 1984, **apud** Futuyma, 1992). Endler (**opus cit**) argumentou que muitas das zonas híbridas que



geralmente são atribuídas a contato secundário podem realmente ter se originado *in situ* pela diferenciação das populações parapátricas e que as espécies podem frequentemente originar-se parapatricamente. Torna-se difícil dizer se zonas híbridas multiloco são evidências de especiação parapátrica incipiente. Entretanto, as populações de certas gramíneas que crescem em áreas de minério contendo metais pesados tóxicos têm se diferenciado não somente em relação à tolerância a esses metais, mas quanto ao tempo de florescimento e ao grau de autocompatibilidade. Assim, estas são parcialmente isoladas reprodutivamente das populações vizinhas de solos não tóxicos (Macnair, 1981, **apud** Futuyma, 1992).

2. Sinapse nos cromossomos politênicos

Existem ciclos de divisão celular caracterizados por não incluírem todas as etapas de um ciclo normal, principalmente a anáfase e a telófase, são denominados ciclos endomitóticos, uma vez que normalmente não ocorre nem ruptura da membrana nuclear, nem divisão celular e todo ciclo se completa dentro do núcleo. Uma mesma célula pode sofrer vários ciclos endomitóticos seguidos, resultando numa quantidade de DNA que pode ser milhares de vezes superior àquelas encontradas nos gametas. Isso resulta em núcleos poliplóides. Nos dípteros forma-se um tipo especial de núcleo poliplóide no qual as novas cromátides irmãs, surgidas após cada ciclo endomitótico, são mantidas completamente pareadas lado a lado, dando origem aos cromossomos politênicos (Guerra, 1988).

No começo do processo de politenização os cromossomos homólogos de cada par cromossômico se reconhecem e pareiam perfeitamente lado a lado. Esse pareamento é denominado sinapse e é mantido até a desintegração do núcleo, no final da fase larval. Eventualmente podem ocorrer falhas na sinapse e o politênico apresentar-se duplo em determinada região. Este processo é conhecido como assinapse cromossômica (Guerra, 1988).

Na literatura genética o padrão de sinapse somática nos cromossomos politênicos foi frequentemente tomado do modelo da meiose. Mas tal extrapolação sem



evidência experimental é insustentável (Evgen'ev, 1971). Infortunadamente, não é possível comparar diretamente os dois tipos de pareamento. Mas pode-se estudar a frequência de *crossing-over* nas regiões cromossômicas com sinapse relativamente íntima nos cromossomos politênicos de híbridos interespecíficos de *Drosophila* e nas regiões caracterizadas por constantes perdas de conjugação. Se existe qualquer relação entre os esquemas e forças envolvendo os dois tipos de sinapse, poderia se esperar um decréscimo nas frequências de *crossing-over* nas regiões desemparelhadas quando comparadas com as regiões cromossômicas que exibem uma alta frequência de conjugação nos núcleos das glândulas salivares de híbridos (Evgen'ev, 1971).

Evgen'ev (1971) observou em seus experimentos uma frequência muito baixa de *crossing-over* nas regiões cromossômicas desemparelhadas. As regiões dos cromossomos caracterizadas por uma alta frequência de conjugação nas glândulas salivares de híbridos também exibem uma alta frequência de *crossing-over* nas fêmeas híbridas. Assim, os experimentos de Evgen'ev (1971) suportam a correspondência entre os padrões de sinapse somática nos núcleos das glândulas salivares e a sinapse meiótica necessária para a troca gênica.

Nos núcleos politênicos pelo menos três estágios do emparelhamento podem ser distinguidos: (1) Pareamento completo. Os cromossomos homólogos se associam e formam um cabo comum. (2) Pareamento incompleto. Os cromossomos homólogos têm contato físico, mas apenas em algumas regiões de suas cromátides. Eles são separados parcialmente e mostram lacunas de pareamento. O pareamento incompleto não é causado por contatos acidentais de *loci* cromossômicos homólogos desemparelhados. Mesmo após vigoroso esmagamento algumas fibras de cromatina que poderiam conectar bandas incompletamente pareadas podem ser vistas. (3) Desemparelhamento. Regiões de cromossomos homólogos permanecem fisicamente separadas (Riede e Renz, 1983).

O fenômeno da assinapse em cromossomos politênicos das glândulas salivares já foi observado em diferentes níveis em muitos dípteros (Evgen'ev, 1971, Evgen'ev *et al.* 1972, Evgen'ev e Polianskaya, 1976). Ele pode ser utilizado como um instrumento



sensível na análise das propriedades do pareamento cromossômico de um lado e das diferenças na constituição genética do outro.

Riede e 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. laticola*, procurando relacionar o grau de homologia das bandas das espécies e seu grau de emparelhamento. Esses autores concluíram que o emparelhamento decresce com o decréscimo da homologia do DNA nas bandas, e também relataram que outros estudos citogenéticos indicaram, entre outros detalhes, que as inversões perturbam o processo de emparelhamento somático mas não são a causa primária do não-emparelhamento nos híbridos, que a temperatura tem uma pronunciada influência no emparelhamento, pois a maioria dos cromossomos completamente pareados são produzidos quando os animais crescem em temperaturas entre 4° e 20° C.

Muitos trabalhos têm demonstrado 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 e Tan, 1936, Horton, 1939, *apud* Evgen'ev, 1971, Cordeiro, 1968, Bicudo, 1979, Madi-Ravazzi, 1988, Madi-Ravazzi e Bicudo, 1992, Madi-Ravazzi *et al.*, 1997).

A extensão a qual a atração entre *loci* homólogos é perdida em híbridos interespecíficos provavelmente depende da quantidade de alterações moleculares que ocorrem nos cromossomos de espécies relacionadas. Assim, nos híbridos entre espécies relacionadas, o grau de pareamento dos cromossomos politênicos pode ser usado como um importante fator na estimativa da posição filogenética das espécies concernidas (Evgen'ev, 1971).

Michailova e Fischer (1984) realizaram um estudo citogenético nos cromossomos politênicos de três populações geograficamente separadas de *Chirononus plumosos* 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 assínapse 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. Os 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.

O fenômeno da assinapse foi estudado por Evgen'ev e 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.

Dobzhansky e Tan (1936, **apud** Evgen'ev e Polianskaya, 1976) apresentaram três causas possíveis para a assinapse dos cromossomos politênicos em híbridos interespecíficos: (1) rearranjos heterozigotos muito pequenos causando "conflitos das forças atrativas", (2) interações específicas de genes e (3) mutações de ponto, perturbando a identidade de *loci* homólogos e levando ao seu não reconhecimento.

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 estende 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 possuírem padrões de bandas aparentemente idênticos.

Mayfield e 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) e nos 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 também, mudanças nas bandas não detectadas ao nível da microscopia óptica. Por exemplo, em *D. melanogaster*, os transposons podem ser inseridos em sítios cromossômicos sem mudar visivelmente a estrutura da banda. A heterozigose foi mostrada por hibridação *in situ* com sondas contendo sequências de elementos transponíveis (Ananiev *et al.*, 1984).

3. O grupo *repleta* do gênero *Drosophila* no estudo da especiação

As espécies de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) do grupo *repleta* ocupam diferentes habitats, mas sem dúvida, a característica mais notável do grupo é a capacidade de muitas espécies utilizarem os tecidos de cactos em decomposição para colocar seus ovos, e as larvas aí se desenvolverem. Esta adaptação é que tem permitido ao grupo ocupar os desertos e as zonas áridas do novo mundo (Ruiz e Fontdevila, 1981).

Patterson e Stone (1952) utilizando critérios morfológicos, cromossômicos e reprodutivos, dividiram o grupo *repleta* em quatro subgrupos: *melanopalpa* (atualmente *repleta*), *mercatorum*, *hydei* e *mulleri*. Wasserman (1962), comparando a estrutura dos cromossomos politênicos, descreveu um novo subgrupo, *fasciola*. E ainda, Rafael e Arcos (1989) descreveram uma nova espécie, *Drosophila*



huancavilcae. Os estudos da morfologia interna e externa da genitália, bem como os dados citogenéticos, mostraram que a espécie descrita é aparentada à *D. inca*, assim esses autores estabeleceram um novo subgrupo, *inca*, dentro do grupo *repleta*. 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.

O subgrupo *mulleri* é o mais numeroso dos seis com 44 espécies (Wasserman, 1992). Este subgrupo está dividido em seis complexos de espécies aparentadas, e Wasserman (1992) o considera como o mais interessante para estudos evolutivos, especialmente os que se referem ao processo de especiação. Os seis complexos deste subgrupo são os seguintes: *meridiana*, *anceps*, *eremophila*, *stalker*, *mulleri* e *martensis*.

De acordo com Wasserman (1954, 1962, 1982), o ancestral do complexo *mulleri* consistia de um número de populações distintas semi-isoladas citologicamente, as quais, por conveniência, foram referidas como subespécies. Cada subespécie deu origem, aparentemente por meio de especiação por isolamento geográfico, a diversas espécies. As progênies das espécies de cada subespécie ancestral foram agrupadas em seis *clusters* de espécies. Os *clusters* *mojavensis*, *longicornis* e *ritae* são essencialmente Norte Americanos; os *clusters* *buzzatii* e *martensis* são primariamente da América do Sul; enquanto que o *cluster mulleri* é representado no Novo Mundo.

Os *clusters* *martensis* e *buzzatii* compartilham três inversões no cromossomo 2, as quais estão ausentes nos outros quatro *clusters*, e são assim, filogeneticamente muito relacionados. A única ligação citológica entre estes dois *clusters* e os outros do complexo *mulleri* era a inversão 3a, a qual acreditava-se estar presente em todas as espécies dos quatro *clusters* Norte Americanos, exceto na espécie *Drosophila arizonae*, e em todas as espécies do *cluster* Sul Americano *martensis*, e ausente nas espécies do *cluster* *buzzatii*. Porém, Ruiz *et al.* (1990) mostraram que a inversão 3a estava presente em *Drosophila arizonae*, e Ruiz e Wasserman (1993), ao reexaminarem a ocorrência desta inversão no *cluster* *martensis*, verificaram que ela



não está presente neste *cluster*. Assim, a ligação entre os *clusters* Sul Americanos e os outros do complexo *mulleri* está quebrada. O complexo *mulleri* está, portanto, reduzido aos *clusters* *mojavensis*, *mulleri*, *longicornis* e *ritae*, enquanto um novo complexo, o complexo *buzzatii* foi estabelecido por estes autores. O complexo *buzzatii* compreende os *clusters* *martensis* e *buzzatii*. Além disso, sugere-se também a incorporação do complexo *stalker*i como um *cluster* dentro do complexo *buzzatii*.

4. O *cluster buzzatii*

O *cluster buzzatii*, que é o de interesse neste trabalho, é composto por cinco espécies: *Drosophila buzzatii*, nativa da América do Sul e subcosmopolita (Wasserman, 1962), *Drosophila borborema*, que ocorre no nordeste do Brasil e em Grão Mongol no estado de Minas Gerais (Vilela e Sene, 1977, Tidon-Sklorz e Sene, 1995c), *Drosophila koepferae*, registrada na Argentina e Bolívia (Fontdevila *et al.*, 1988), *Drosophila serido*, nordeste, centroeste, sudeste e sul do Brasil (Sene *et al.*, 1982, 1988, Tosi e Sene, 1989, Silva e Sene, 1991) e *Drosophila seriema*, restrita à cadeia do Espinhaço no nordeste brasileiro (Tidon-Sklorz e Sene, 1995b). A comparação da morfologia do edeago da espécie *D. buzzatii* com a das espécies *D. serido* (tipos A, B e D de edeagos), *D. seriema* (tipo C de edeago), *D. koepferae* (tipo E de edeago) e *D. borborema*, mostrou que estas quatro últimas possuem uma grande semelhança morfológica entre si, o que sugere uma ancestralidade comum a elas. Deste modo, estas espécies (*D. serido*, *D. seriema*, *D. koepferae* e *D. borborema*) foram agrupadas por Ruiz *et al.* (1996), formando o *subcluster serido*.

Devido aos fatores de polimorfismo e politipia, o *cluster buzzatii* é um excelente material para estudos de adaptação ecológica, diferenciação de populações e especiação. Sua ampla distribuição através de diferentes formações vegetais da América do Sul e fidelidade ecológica aos cactos, tornam este *cluster* muito útil para os estudos da influência dos ciclos paleoclimáticos do período Quaternário, em que os domínios de vegetação variaram em extensão, o chaco estava ligado à caatinga há cerca de 13 a 18 milhões de anos atrás (Ab'Saber, 1977). Estes ciclos foram responsáveis pela expansão e contração da vegetação seca, formando áreas de



populações isoladas e refúgios. Os ciclos paleoclimáticos, os quais desempenharam um importante papel na diferenciação de populações tropicais na América do Sul (Ab'Saber, 1977, Vanzolini, 1981), parecem ter sido também os responsáveis pela diferenciação e estrutura de *Drosophila mercatorum pararepleta* (Sene, 1986) e do *subcluster serido* (Sene *et al.*, 1982, 1988).

O ancestral do *cluster buzzatii* pode ter sido uma espécie adaptada a uma grande variedade de cactos que invadiram a maioria das zonas áridas geradas durante a transição Plioceno-Pleistoceno na América do Sul. Depois, *Drosophila buzzatii* e *Drosophila serido* podem ter se diferenciado em resposta à um isolamento produzido pela restrição da distribuição dos cactos nos períodos menos áridos. A presente distribuição pode ser o resultado de contactos secundários entre estas espécies nos períodos áridos pós-glaciais (Ruiz *et al.*, 1982).

A espécie *D. buzzatii* tem sido muito estudada, pois é a única do *cluster* que se tornou subcosmopolita. Diversos autores estudaram as populações do provável centro de origem de *D. buzzatii* (o chaco argentino), comparando-as com populações introduzidas. Barker *et al.* (1985), estudando o polimorfismo de aloenzimas em populações de *D. buzzatii*, observou que em 12 localidades de coleta desta espécie na Argentina e 5 no Brasil, a média de heterozigosidade não era significativamente diferente de populações australianas introduzidas. As populações da Austrália parecem ter sofrido uma perda da variabilidade genética quando foram introduzidas. Por exemplo, 5 *loci* são variáveis nas populações sul-americanas e monomórficos nas populações australianas, e um outro alelo foi detectado para cada um de 6 outros *loci* na América do Sul. No entanto, algumas populações brasileiras têm aparentemente reduzido o polimorfismo de inversão quando comparadas com as populações argentinas.

Drosophila buzzatii, a qual utiliza cacto em decomposição como substrato, foi levada juntamente com seu cacto hospedeiro para várias regiões do mundo. Este tipo de colonização é conhecido como colonização passiva. Contudo, em algumas regiões colonizadas, *D. buzzatii* não está restrita a espécies de cactos que são endêmicas em sua área de origem (*Opuntia ficus-indica*, Argentina), como no Brasil ela tem sido



encontrada em espécies de *Cereus* (Pereira *et al.*, 1983). Contudo, segundo Figueiredo e Sene (1992), a hipótese de colonização ativa, isto é, que *D. buzzatii* dispersou-se naturalmente de sua área de distribuição para o Brasil, é mais provável que a de colonização passiva. A hipótese de colonização ativa de *D. buzzatii* no Brasil é suportada por vários fatores:

Primeiro, o fato das populações do sul do Brasil manterem alguma variabilidade cromossômica da área de origem, ao contrário das populações do nordeste. Assim, as áreas do sul do Brasil foram colonizadas antes daquelas do nordeste.

Segundo, a inversão 2j está ausente nas populações de *D. buzzatii* no nordeste do Brasil. Todas as populações fundadas pelo transporte da planta hospedeira *Opuntia ficus-indica* para diferentes regiões do mundo são polimórficas para esta inversão.

Terceiro, existe também o fato de algumas populações brasileiras terem sido coletadas em diferentes espécies de cactos. Pereira *et al.* (1983) observou que *D. buzzatii* utilizou *Cereus* na localidade de São Francisco de Assis, RS, um fato que sugere que esta população poderia já existir no Brasil antes da introdução de *O. ficus-indica*. Em coleções da região da caatinga do nordeste do Brasil, *D. buzzatii* apareceu com frequência extremamente baixa em áreas de vegetação natural, na qual *Opuntia ficus-indica* não estava presente. Em Cianorte, PR, onde apenas *Cereus* é encontrado, a população de *D. buzzatii* é grande. Os dados de polimorfismo de aloenzimas de Barker *et al.* (1985), os dados dos domínios de vegetação da América do Sul, e o fato de *D. buzzatii* usar *Cereus* como hospedeiro (Pereira *et al.*, 1983) podem reforçar a hipótese de que as populações estudadas por Barker *et al.* (1985) e as estudadas por Figueiredo e Sene (1992) são relíquias de populações de um período no qual sua distribuição na América do Sul pode ter sido mais ampla.

4.1. O subcluster serido

Várias linhagens geográficas de *Drosophila serido*, *D. seriema*, *D. koepferae* e *D. borborema* já foram previamente analisadas quanto ao cariótipo, isolamento reprodutivo, inversões cromossômicas, tipos de edeagos, fertilidade e fecundidade,



grau de sinapse nos cromossomos politênicos, isolamento sexual, padrão de esterases, análise morfométrica, cromossomos metafásicos e DNA mitocondrial (Vilela e Sene, 1977, Silva, 1981, Tosi, 1982, Baimai *et al.*, 1983, Bizzo, 1983, Madi-Ravazzi, 1988, Tosi e Sene, 1989, Silva e Sene, 1991, Lapenta, 1992, Madi-Ravazzi, 1992, Madi-Ravazzi e Bicudo, 1992, Moraes, 1992, Lapenta *et al.*, 1995, Tidon-Sklorz e Sene, 1995b, Kuhn *et al.*, 1996, Madi-Ravazzi *et al.*, 1997, Manfrin, 1997, Monteiro, 1997, Lapenta, 1998). A comparação desses resultados indica que as populações dessas espécies encontram-se em estágios distintos de diferenciação.

O mapeamento da distribuição geográfica de *D. serido* através de vários marcadores, como morfologia da genitália masculina (Silva, 1981), inversões em cromossomos politênicos (Tosi e Sene, 1989), morfologia e heterocromatina de cromossomos metafásicos (Tosi, 1982, Baimai *et al.*, 1983) e, isolamento reprodutivo (Bizzo, 1983), demonstrou que esta espécie é politípica, ou é um *cluster* de espécies, constituída de várias raças geográficas ou de subespécies. Dentre os diversos marcadores, a morfologia da genitália é considerada como a principal característica diagnóstica para separar espécies (Vilela, 1983). Silva e Sene (1991) consideram a hipótese de que uma variação geográfica neste caráter poderia representar o início de um processo de diferenciação interpopulacional, que eventualmente resultaria em especiação.

As populações de *Drosophila serido*, de acordo com os estudos dos marcadores acima citados, puderam ser alocadas a 5 tipos diferentes. As populações tipo A são aquelas que possuem tipo morfológico A de edeago, estão associadas à inversão cromossômica fixa $2x^7$, tipo metafásico I e são encontradas no nordeste do Brasil, a leste da Cadeia do Espinhaço e ao longo da costa Atlântica do nordeste até o estado do Rio Grande do Sul.

As populações tipo B possuem tipo morfológico B de edeago, estão associadas à inversão $2e^8$, ao tipo metafásico I e ocorrem na parte oeste da caatinga e nas regiões centro-sudeste do Brasil.

As populações tipo C, elevadas ao nível de espécie recebendo o nome de *Drosophila seriema* (Tidon-Sklorz e Sene, 1995b), possuem tipo morfológico C de



edeago, estão associadas à inversão $2e^8$, ao tipo metafásico II e são endêmicas da Cadeia do Espinhaço e ocorrem em isolados geográficos, em áreas de vegetação característica de campo rupestre a mais ou menos 1000 m de altitude. No estudo de Kuhn *et al.* (1996) sobre os cromossomos metafásicos e politênicos de *D. seriema* foi encontrada pequena variabilidade cromossômica, e observou-se que o cariótipo básico de *D. seriema* consiste de 4 pares de cromossomos telocêntricos, um grande cromossomo 6 submetacêntrico, e um par de cromossomos sexuais. Foi observado um novo cariótipo em duas localidades diferentes (Mucugê-D62C5 e Cachoeira do Ferro Doido-D73C3, BA, separadas por 160 Km), além de uma nova inversão paracêntrica no cromossomo V, encontrada no estoque de Carfanaum (BA). Portanto, a espécie parece essencialmente monomórfica e com baixa diferenciação interpopulacional, quando comparada com outras espécies do complexo *buzzatii*. Este baixo nível de polimorfismo cromossômico, com relação às outras espécies do complexo, sugere uma origem recente para *Drosophila seriema*, um nicho ecológico restrito, ou ambos.

As populações do tipo C apresentam forte isolamento pré-acasalamento e moderado isolamento pós-acasalamento em relação a outras populações de *D. serido* (Moraes, 1992). Esta espécie apresenta um padrão característico de esterases (Lapenta *et al.*, 1995). Existe uma região de simpatria entre os tipos A (da Serra do Cipó) e C (usualmente apenas encontrado em campos rochosos da Cadeia do Espinhaço) (Tidon-Sklorz e Sene, 1995a) e também entre os tipos B e C na Cadeia do Espinhaço, porém híbridos naturais entre estes tipos não foram observados (Silva e Sene, 1991).

As populações tipo D possuem tipo morfológico D de edeago, estão associadas à inversão $2x^7$ (revisão de Ruiz *et al.*, 1996), ao tipo metafásico V e são encontradas nas regiões sul e sudeste do Brasil e ao norte da borda leste do chaco argentino.

Finalmente, as populações tipo E, elevadas à categoria de espécie com o nome *Drosophila koepferae* (Fontdevila *et al.*, 1988), possuem tipo morfológico E de edeago, estão associadas à inversão $2j^9$, ao tipo metafásico VI e ocorrem nas encostas dos Andes, na Argentina, até Comarapa, Bolívia, na borda oeste do chaco. Esta espécie também possui uma inversão polimórfica no cromossomo III, 4m (Ruiz *et al.*, 1982, Ruiz e Wasserman, 1993).



A espécie *Drosophila borborema* foi descrita por Vilela e Sene (1977), apresenta a inversão fixada $2e^8$, o tipo metafásico I, e ocorre principalmente nas regiões de caatinga do nordeste brasileiro, foi observado que as larvas desta espécie emergem do cacto *Cephalocereus piauhyensis* (Wasserman, 1992). Tidon-Sklorz e Sene (1995c) encontraram *D. borborema* também em Grão Mongol (MG).

A presença da inversão $2e^8$ demonstra uma íntima relação filogenética entre *D. seriema*, *D. borborema* e *D. serido* do centro-oeste do Brasil (Kuhn *et al.*, 1996). *D. borborema* apresenta inversão polimórfica no cromossomo III, 3u, nos estoques estudados por Kuhn *et al.* (1996), mas estava ausente em outros estoques de Wasserman e Richardson (1987) e Ruiz e Wasserman (1993). As populações de *D. serido* do centro-oeste diferem do resto das populações de *D. serido* não apenas pela presença da inversão $2e^8$ no estado homozigoto (Tosi e Sene, 1989), mas também pela diferente forma do edeago dos machos (Silva e Sene, 1991). Assim, segundo Kuhn *et al.* (1996), as informações disponíveis sugerem que elas representem diferentes espécies de *D. serido*. Estas três espécies são alopátricas. Portanto, parece que a especiação nestas três espécies foi via isolamento geográfico, talvez devido às mudanças nos padrões de vegetação causados pelos ciclos climáticos do Quaternário (Ab'Saber, 1977). Tais mudanças climáticas parecem ter levado a uma distribuição esporádica da vegetação e particularmente das populações de cactos (Baimai *et al.*, 1983). Baimai *et al.* (1983) observou que populações de espécies de *Drosophila* cactofílicas, isoladas geograficamente na região neotropical, podem ser comparadas com aquelas de "Kipuka" nas ilhas havaianas, onde uma especiação explosiva de diversas espécies de *Drosophila* têm ocorrido através de eventos de *flush-crash*, como postulado por Carson (1968, 1971, *apud* Baimai *et al.*, 1983).

Manfrin (1997) verificou pela análise do DNA mitocondrial que, dentro do clado que compreende as espécies *D. borborema*, *D. seriema* e *D. serido* tipos A e B de edeagos, a espécie *D. seriema* é observada como não monofilética, com grande divergência entre as diferentes populações examinadas. Esses resultados, segundo Manfrin (1997), contrastam com os dados obtidos para marcadores clássicos (Tosi e



Sene, 1989, Tidon-Sklorz e Sene, 1995a, Kuhn *et al.*, 1996) que sugerem ser este conjunto de populações uma linha evolutiva praticamente monomórfica.

Drosophila borborema e *Drosophila serido* do centro-oeste do Brasil (tipo B de edeago) possuem metáfase similar, consistindo de 4 pares de autossomos telocêntricos, um par de microcromossomos, e um par de cromossomos sexuais (sendo o cromossomo X telocêntrico e o Y acrocêntrico) (Baimai *et al.*, 1983). Este cariótipo provavelmente representa a configuração ancestral do grupo *repleta* (Wasserman, 1982). A configuração básica da metáfase de *D. seriema* é derivada do cariótipo ancestral pela aquisição de heterocromatina extra em ambos os braços dos microcromossomos. Este cariótipo foi encontrado em todas as localidades estudadas por Kuhn *et al.* (1996). *Drosophila seriema* é polimórfica para outro cariótipo, o qual difere do básico no tamanho e morfologia do cromossomo 6. Sua origem pode ser explicada pela aquisição de heterocromatina extra num braço do microcromossomo ancestral, ou também pela perda de heterocromatina num braço do microcromossomo do cariótipo ancestral. Não se sabe até o momento qual o efeito, se houver, desta variação, mas a variação intraespecífica na quantidade de heterocromatina em populações naturais de organismos superiores não é um fenômeno incomum (Baimai *et al.*, 1983).

Monteiro (1997), estudando as populações tipo B e tipo D, aumentou a amostragem coletando na região compreendida entre as bordas da distribuição desses dois tipos, e não observou simpatria entre eles. Esse autor chegou à conclusão que o tipo B encontra-se nos morros e associado ao cacto *Pilosocereus machrisii*, enquanto que o tipo D encontra-se ao longo dos vales dos rios da Bacia do Rio Paraná e associado ao cacto *Cereus hildemaniannus* (anteriormente *Cereus* sp., segundo Pereira *et al.*, 1983). Monteiro e Sene (1995), analisando as populações quanto à morfologia do edeago, observaram que cada uma das populações do tipo B podiam ser discriminadas, sugerindo ausência de fluxo gênico entre elas. Isto poderia ser devido ao fato delas serem encontradas principalmente em morros, formando verdadeiros isolados. Já as populações do tipo D não apresentaram tal discriminação entre si, sugerindo a existência de fluxo gênico entre elas, provavelmente devido ao fato delas



ocorrerem ao longo dos cursos dos rios. Porém foi observado que quanto maior a distância entre elas, ao longo dos rios, maior é a divergência morfológica entre elas.

Manfrin (1997) observou que os indivíduos analisados da população do tipo B de Analândia (SP) possuíam uma sequência do gene Citocromo Oxidase - I (COI) mitocondrial que os agrupavam com os representantes do tipo D. Neste caso há uma falta de concordância entre a genealogia construída a partir do haplótipo do gene COI mitocondrial e as relações evolutivas dos indivíduos expostas até aqui. Segundo esta autora, este fato sugere um contato secundário entre populações dos dois tipos e que pode ter ocorrido hibridação com introgressão diferencial de genomas mitocondriais, ou seja, introgressão com retenção de polimorfismo ancestral da inversão 2e⁸. Esta hipótese poderia explicar a ocorrência de haplótipos característicos do tipo D na população de Analândia - SP (tipo B).

Ainda, segundo Manfrin (1997), esta não concordância sugere que houve diferenciação anterior em alopatria dos dois tipos, indicando que a diferenciação destas populações não se deu exclusivamente durante o último ciclo do Quaternário, conforme sugerido por Sene *et al.* (1988). O padrão atual, segundo a autora, indica uma história evolutiva mais longa para os tipos de *D. serido*, como por exemplo, através de eventos anteriores isolando estas populações e que outros paleoeventos, como aqueles provocados pelos ciclos do Quaternário em um passado mais recente, propiciaram o contato secundário entre esses tipos.

O trabalho de Madi-Ravazzi *et al.* (1997) mostrou que o grau de compatibilidade reprodutiva de fêmeas *D. serido* foi menor no cruzamento com *D. seriema*. E também, fêmeas de *D. seriema* mostraram um baixo grau de compatibilidade reprodutiva com machos de *D. koepferae* e *D. serido*, exceto para a linhagem B50Q3. Diferenças quanto à fertilidade foram também observadas em intercruzamentos de linhagens pertencentes à mesma espécie. Este fato ocorreu com as linhagens B20D2 e B25D7, ambas classificadas como *Drosophila koepferae*, mas exibindo comportamento diferente. A linhagem B20D2 mostrou um maior grau de isolamento do que B25D7, em intercruzamentos com linhagens de *D. serido*. Os



híbridos envolvendo linhagens classificadas como pertencentes a uma única espécie, mostraram sinapse completa em todos os casos.

Para verificarmos se as divergências ocorridas em populações geograficamente separadas culminaram com uma diferenciação interespecífica, devemos realizar um estudo amplo envolvendo várias características e principalmente as relações reprodutivas e cromossômicas entre elas.

Assim, os objetivos do presente trabalho consistem basicamente de:

- 1) estudar parâmetros do isolamento reprodutivo (fertilidade, fecundidade e esterilidade) entre *Drosophila serido*, *D. koepferae*, *D. seriema* e *D. buzzatii*;
- 2) identificar a frequência de assinapses dos cromossomos politênicos das glândulas salivares de linhagens em estudo e seus híbridos;
- 3) correlacionar os dados obtidos, com os já existentes na literatura, a fim de ampliar o conhecimento sobre o processo de diferenciação existente entre espécies do *cluster buzzatii*.



II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Linhagens e procedência geográfica

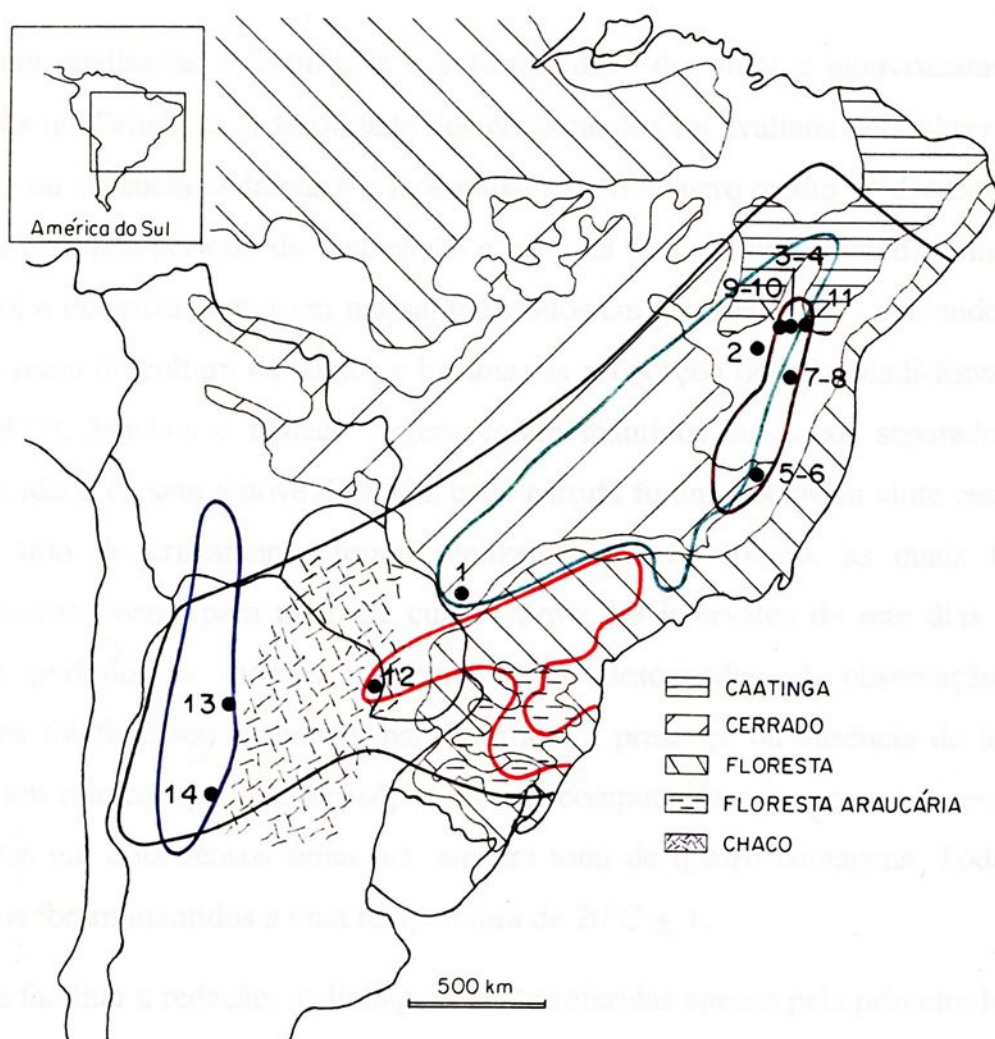
As linhagens isofêmeas e massais de espécies de *Drosophila* do *cluster buzzatii* que foram utilizadas neste trabalho estão relacionadas na Tabela 1 e a sua localização geográfica demonstrada na Figura 1.

Tabela 1. Espécies de *Drosophila* do *cluster buzzatii*, suas respectivas linhagens, com seus tipos morfológicos de edeago e procedência geográfica. As linhagens cujo código contém a letra **M** são massais e as outras são isofêmeas.

ESPÉCIES	LINHAGENS	TIPO MORFOLÓGICO DE EDEAGO	PROCEDÊNCIA
<i>Drosophila serido B</i>	A55F11*	B	Bela Vista (MS)
	B50Q3*		Ibotirama (BA)
<i>Drosophila seriema</i>	A95F3*	C	Serra do Cipó (MG)
	D40F1		
	D62C4BM D63M		Mucugê (BA)
	D71C1BM D72M		Morro do Chapéu (BA)
	D73C5BM		Cachoeira do Ferro Doido (BA)
<i>Drosophila serido D</i>	B31D1*	D	Puerto Tirol (Argentina)
<i>Drosophila koepferae</i>	B20D2*	E	Tapia (Tucuman, Argentina) Famatina (La Rioja, Argentina)
	B25D7*		
<i>Drosophila buzzatii</i>	3B*		Bahia
Classificação incerta	D69R2 D69R5		Localidade sem nome (BA)

As linhagens foram coletadas pelo Prof. Dr. Fábio de Mello Sene e cols (FMRP - USP); * linhagens mantidas em laboratório desde 1982 e as outras desde 1990.





— *D. serido* (B) — *D. seriema* (C) — *D. serido* (D)
 — *D. koepferae* (E) — *D. buzzatti*

Figura 1. Mapa de vegetação, distribuição das espécies e localização das linhagens analisadas no presente trabalho. Extraído de Monteiro, 1997 com modificações. (1) A55F11, (2) B50Q3, (3) D69R2, (4) D69R5, (5) A95F3, (6) D40F1, (7) D62C4BM, (8) D63M, (9) D71C1BM, (10) D72M, (11) D73C5BM, (12) B31D1, (13) B20D2 e, (14) B25D7. (B), (C), (D) e (E): tipos morfológicos de edeago.

2. Fertilidade e Fecundidade

2.1. Intra e Intercruzamentos

Foram analisadas a fertilidade e a fecundidade dos intra e intercruzamentos, relacionados na **Tabela 2**. A fertilidade dos cruzamentos foi avaliada pela observação da presença ou ausência de larvas e a fecundidade pelo número médio de descendentes produzidos em cada período de oviposição e no total de cada cruzamento. O método utilizado foi o de cruzamentos em massa, realizados em garrafas de $\frac{1}{4}$ l contendo uma mistura de meio de cultura de cactos e banana, na proporção de 1:1 (Madi-Ravazzi e Bicudo, 1992). Machos e fêmeas virgens foram mantidos em tubos separados até atingirem a idade de sete a nove dias. Em cada garrafa foram colocados vinte casais, e para cada tipo de cruzamento foram realizadas quatro réplicas, as quais foram transferidas duas vezes para meio de cultura novo em intervalos de sete dias cada. Após esse período, as moscas parentais foram descartadas. A observação dos cruzamentos foi feita semanalmente para verificar a presença ou ausência de larvas, utilizando um microscópio estereoscópio. Foram computados o número e o sexo dos descendentes em dois censos semanais, em um total de quatro contagens. Todos os cruzamentos foram mantidos a uma temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Para facilitar a redação, as linhagens serão referidas apenas pela primeira letra e os dois primeiros números. Somente as linhagens de classificação incerta, D69R2, D69R5 e de *D. buzzatii*, 3B, serão designadas respectivamente como R2, R5 e 3B. Também para facilitar a leitura da direção dos cruzamentos realizados, colocamos F para fêmeas e M para machos.

2.2. Fertilidade de F1

Os híbridos provenientes dos intercruzamentos realizados foram também testados quanto à sua fertilidade e fecundidade. A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 2.1., porém com apenas uma transferência para meio de cultura novo.



Tabela 2. Tipos de intracruzamentos e intercruzamentos realizados no presente estudo. F = fêmea, M = macho. ■ linhagens com tipo morfológico B de edeago; ■ linhagens com tipo morfológico C de edeago; ■ linhagem com tipo morfológico D de edeago; ■ linhagens com tipo morfológico E de edeago; ■ linhagem de *Drosophila buzzatii*; ■ linhagens de classificação incerta. ■ intracruzamentos; ■ intercruzamentos entre linhagens classificadas como da mesma espécie e com o mesmo tipo de edeago; ■ intercruzamentos entre linhagens classificadas como espécies diferentes e tipos morfológicos de edeago diferentes.

F \ M	A55	B50	A95	D40	D62	D63	D71	D72	D73	B31	B20	B25	3B	R2	R5
A55	X					X	X							X	X
B50		X										X		X	
A95			X	X		X	X	X	X			X		X	
D40			X	X	X	X	X		X						
D62				X	X									X	
D63	X		X	X		X		X						X	
D71	X		X	X			X							X	
D72			X			X		X	X					X	
D73			X	X				X	X					X	
B31										X					X
B20											X				X
B25		X	X									X			
3B													X		X
R2	X	X	X		X	X	X	X	X					X	
R5	X									X	X		X		X

Esses cruzamentos estão relacionados na **Tabela 3** e serão designados como intercruzamentos de F1.

3. Análise Citogenética

O estudo citogenético foi realizado em lâminas de cromossomos politênicos das glândulas salivares de larvas de terceiro estadio tardio, coradas com orceína lacto-acética. A análise visou, principalmente, observar o grau de sinapse dos cromossomos e detectar a presença de inversões heterozigotas. Foram analisadas, aproximadamente, 7 a 10 lâminas de cada tipo de cruzamento, em fotomicroscópio Zeiss II. Os filmes utilizados para a elaboração das fotografias foram Ilford PANF, 50 ASA e o PLUS - X PAN. O papel fotográfico empregado foi o Kodabrome Print RC F - 3. O procedimento para revelação do filme e cópia em papel foi o de rotina.

3.1. Preparação das lâminas das glândulas salivares coradas com orceína lacto-acética.

As larvas foram dissecadas em uma placa de vidro com uma gota de solução fisiológica (Demerec) e as glândulas foram separadas e transferidas para uma lâmina de vidro com uma gota de ácido acético a 45%, onde permaneceram por 3 minutos. Após a remoção do ácido foi acrescentada uma gota de orceína lacto-acética a 2%, por 5 minutos. Em seguida, a orceína foi retirada e acrescentou-se uma gota de ácido láctico a 50%, por 8 minutos. Feito isto, o material foi recoberto com uma lamínula e submetido ao processo de esmagamento. As lâminas foram lutadas com esmalte incolor e mantidas em geladeira para posterior análise.

4. Observação da Corte

Foram montados experimentos com o objetivo de analisar a corte dos casais que não produziram descendentes. Para esse estudo, foi observada a corte de 25 casais com 7,5 dias de idade, em média. Os casais foram colocados, separadamente, em tubos contendo meio de cultura e a corte foi observada durante o período de 1 h. Foi



Tabela 3. Tipos de inter cruzamentos de F1 realizados no presente estudo. Legenda igual à da Tabela 2.

F \ M	A55	B50	A95	D40	D62	D63	D71	D72	D73	B31	B25	3B	R2	R5
A55						X	X						X	X
B50											X			
A95				X		X	X	X	X		X			
D40			X		X	X	X		X					
D62				X										
D63	X		X	X				X					X	
D71	X		X	X										
D72			X			X			X					
D73			X	X				X						
B31														X
B25		X	X											
3B														X
R2	X	X				X								
R5	X									X		X		

computado o início e o término da corte. Esses cruzamentos foram mantidos em estoque a $20^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 1 mês para observação. Foram analisadas as cortes dos seguintes cruzamentos: R2 com D62, A95, D73, D71 e D72, R5 com B20, em ambas as direções, e a dos cruzamentos de F B50 com M R2.

5. Análise da Mobilidade dos Espermatozóides

Foi testada a mobilidade dos espermatozóides dos híbridos provenientes dos intercruzamentos de F1 estéreis, que foram os: de F A55 com M D71, de F A95 com M B25 e, F B25 com M B50. A técnica usada foi a de Orr (1992) com modificações. Foram utilizadas como controle as preparações de testículos de machos com 5, 7, 9 e 10 dias de idade dos intracruzamentos de D40, A55 e D62 e dos intercruzamentos de F B50 com M B25, de F B25 com M A95, de D40 com D63, D62 e A95, nas duas direções; A55 com D63 e R2, nas duas direções e, F D71 com M A55. Os machos foram dissecados em solução fisiológica Demerec e os testículos transferidos para uma lâmina contendo também uma gota de solução fisiológica. A seguir, foram recobertos com uma lamínula e imediatamente examinados em microscopia de luz.

6. Análise Estatística

Os dados foram analisados com auxílio do programa estatístico MINITAB Release versão 10.1 para Microsoft Windows, onde foi utilizado o teste t de Student para medir o grau de significância das diferenças entre as médias. Os gráficos *box-plot* e de erro padrão foram construídos utilizando o programa *Statistica* versão 5.0. para Microsoft Windows.



III. RESULTADOS

1. Isolamento Reprodutivo

Nos experimentos de fertilidade e fecundidade, os casais permaneceram nas garrafas por um período de sete dias antes de serem transferidos para uma garrafa nova. Assim, foram obtidos grupos de idades diferentes para os cruzamentos, identificados como 1, 2 e 3. No período 1, os casais tinham em média 7,5 dias de idade, no período 2, 11 dias, e no período 3, 14,5 dias.

1.1. Fertilidade

a. Intracruzamentos

A maioria (93,33 %) dos intracruzamentos foram 100% férteis, isto é nos três períodos de oviposição. A única exceção foram os cruzamentos de D72, os quais foram improdutivos no 3º período de oviposição, quando os casais tinham em média 14,5 dias de idade. A réplica nº 2 dos intracruzamentos de B20 não apresentou descendentes, no entanto, as demais réplicas foram férteis em todos os períodos de oviposição (Tabela 4).

b. Intercruzamentos Parentais

b.1. Entre linhagens classificadas como da mesma espécie

Neste grupo de intercruzamentos apenas o intercruzamento entre F D63 x M A95 foi estéril no 2º período de oviposição, os demais cruzamentos apresentaram 100% de fertilidade.



b.2. Entre linhagens classificadas como espécies ou tipos de edeagos diferentes

Foi observada a esterilidade em ambas as direções dos cruzamentos de R2 com D63, A95, D73, D71 e D72, de R5 com B20 e também, os intercruzamentos entre F B50 x M R2, isto representa 40,62 % do total de cruzamentos deste grupo. Os cruzamentos de F D63 x M R2 foram improdutivos no 1º período de oviposição e os recíprocos no 3º período, os cruzamentos de F R2 x M B50 foram improdutivos no 3º período.

Tabela 4. Réplicas dos cruzamentos realizados que foram estéreis. ■ Intracruzamento; ■ intercruzamento de F1 entre linhagens com mesmo tipo de edeago; ■ intercruzamentos parentais entre linhagens com edeagos diferentes; ■ intercruzamentos de F1 entre linhagens com edeagos diferentes.

		Réplicas			
F	M	1	2	3	4
B20	B20		X		
D63	A95			X	X
A55	R2	X	X		
R2	A55			X	X
D63	R2		X	X	X
R2	D63			X	
R5	B31			X	X
B31	R5				X
B25	A95	X		X	X
D63	A55				X
A55	D63	X			
D71	A55			X	
B50	B25		X	X	X

c.2. Entre linhagens classificadas como espécies ou tipos de edeagos diferentes

Os cruzamentos entre F A55 e M D71, F A95 e M B25 e de F B25 com M B50 foram totalmente estéreis, correspondendo a 15,79 % do total dos intercruzamentos deste grupo. O restante deste grupo foi 100 % fértil. Algumas réplicas dos intercruzamentos deste grupo foram estéreis (Tabela 4).

b.2. Entre linhagens classificadas como espécies ou tipos de edeagos diferentes

Foi observada a esterilidade em ambas as direções dos cruzamentos: de R2 com D62, A95, D73, D71 e D72, de R5 com B20 e também, os intercruzamentos entre F B50 x M R2, isto representa 40,62 % do total de cruzamentos deste grupo. Os cruzamentos de F D63 x M R2 foram improdutivos no 1º período de oviposição e os recíprocos no 3º período, os cruzamentos de F R2 x M B50 foram improdutivos no 3º período de oviposição. Os outros cruzamentos realizados neste grupo foram 100% férteis. Alguns intercruzamentos deste grupo foram estéreis em uma ou mais réplicas (Tabela 4).

c. Intercruzamentos de F1

c.1. Entre linhagens classificadas como da mesma espécie

A maioria (81,82 %) dos cruzamentos foram 100% férteis. Alguns cruzamentos (18,18 %) entre linhagens de *D. seriema* foram estéreis no 2º período de oviposição: A95 com D63 e D72 com D73, em ambas as direções. As réplicas 3 e 4 dos intercruzamentos entre F D63 x M A95 também foram estéreis (Tabela 4).

c.2. Entre linhagens classificadas como espécies ou tipos de edeagos diferentes

Os cruzamentos entre F A55 e M D71, F A95 e M B25 e de F B25 com M B50 foram totalmente estéreis, correspondendo a 15,79 % do total dos intercruzamentos deste grupo. O restante deste grupo foi 100 % fértil. Algumas réplicas dos intercruzamentos deste grupo foram estéreis (Tabela 4).



1.2. Fecundidade

A análise da fecundidade através dos gráficos *box-plot* e de erro padrão, e também do teste t de Student, foi realizada pelas seguintes comparações da produtividade nos três períodos de oviposição separadamente por sexo e total:

- dentro e entre intracruzamentos;
- entre os intercruzamentos parentais e os respectivos intracruzamentos;
- entre os intercruzamentos recíprocos; e
- entre os intercruzamentos de F1 e os respectivos intercruzamentos parentais.

a. Análise da fecundidade dentro e entre intracruzamentos

Os gráficos *box-plot* com estes resultados estão apresentados a seguir (Figuras 2 a 4). Observa-se que, no 1º período de oviposição, a produtividade de fêmeas descendentes das linhagens classificadas com edeagos B, C, E, de classificação incerta e de *D. buzzatii* mostram variações diferentes, e a linhagem B31 (edeago D) difere significativamente das demais ($p = 0,0004$ para a análise discriminante). A produtividade dos machos neste 1º período de oviposição foi semelhante à das fêmeas em todas as linhagens ($p = 0,0002$) e, conseqüentemente a produtividade total do 1º período também ($p = 0,0002$).

No 2º período de oviposição as linhagens não seguiram os mesmos padrões observados no primeiro período em termos de variabilidade e valor médio. Com relação à produtividade dos machos, a linhagem 3B (*D. buzzatii*) mostrou um comportamento reprodutivo mais próximo das linhagens de edeago B. Neste caso a produtividade total seguiu o comportamento da produtividade dos machos, com as linhagens classificadas em B e E com produtividade semelhante ($p = 0,0297$).

No 3º período de oviposição houve uma queda maior do número de descendentes de ambos os sexos de todas as linhagens. Nota-se que ocorreu um maior distanciamento entre as linhagens caracterizadas por possuírem o edeago E (*D.*



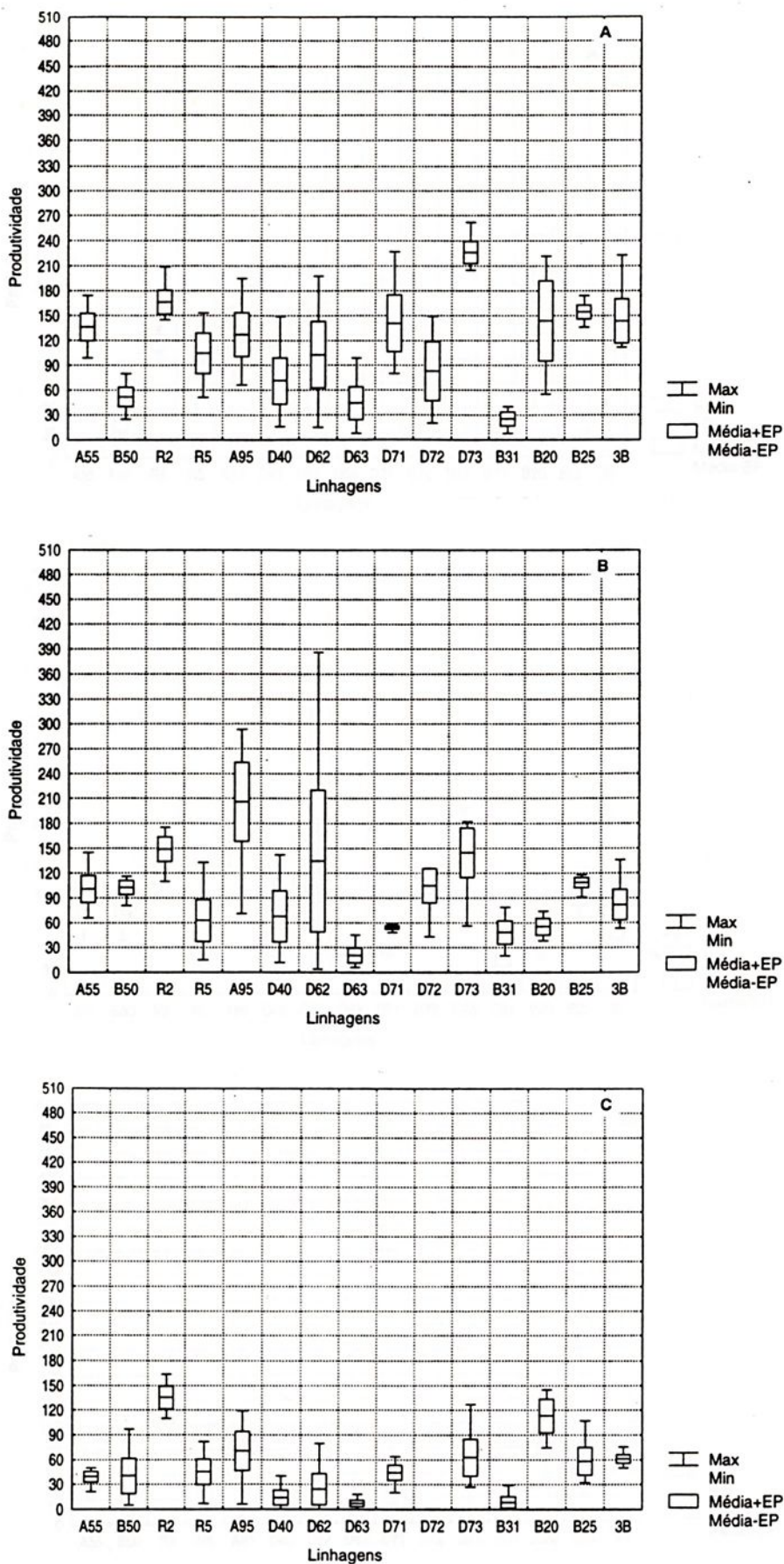


Figura 2. Box plot da produtividade de fêmeas dos intracruzamentos, nos três períodos de oviposição.
A. 1º período. B. 2º período. C. 3º período.

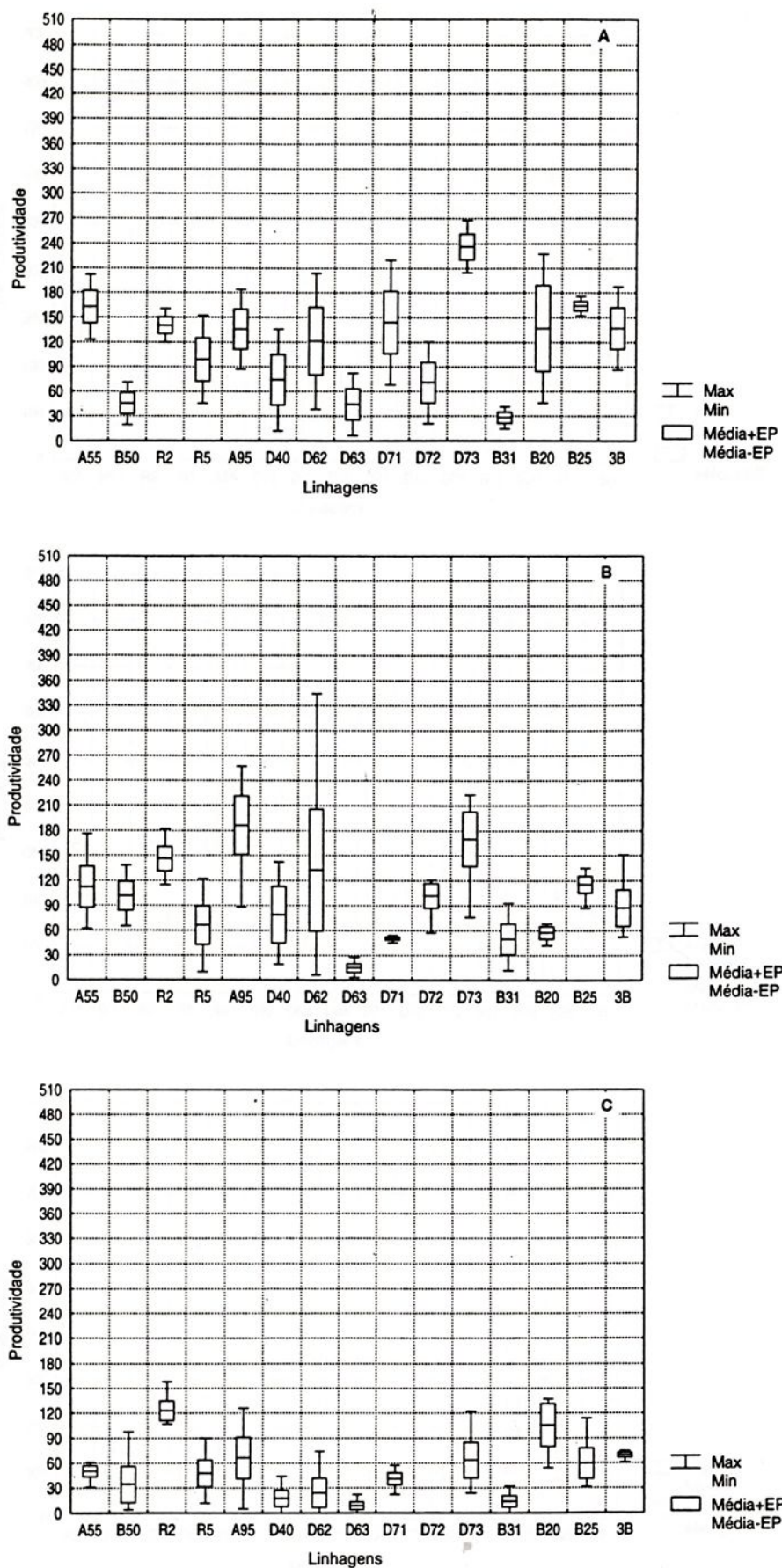


Figura 3. Box plot da produtividade de machos dos intracruzamentos, nos três períodos de oviposição.
A. 1º período. B. 2º período. C. 3º período.

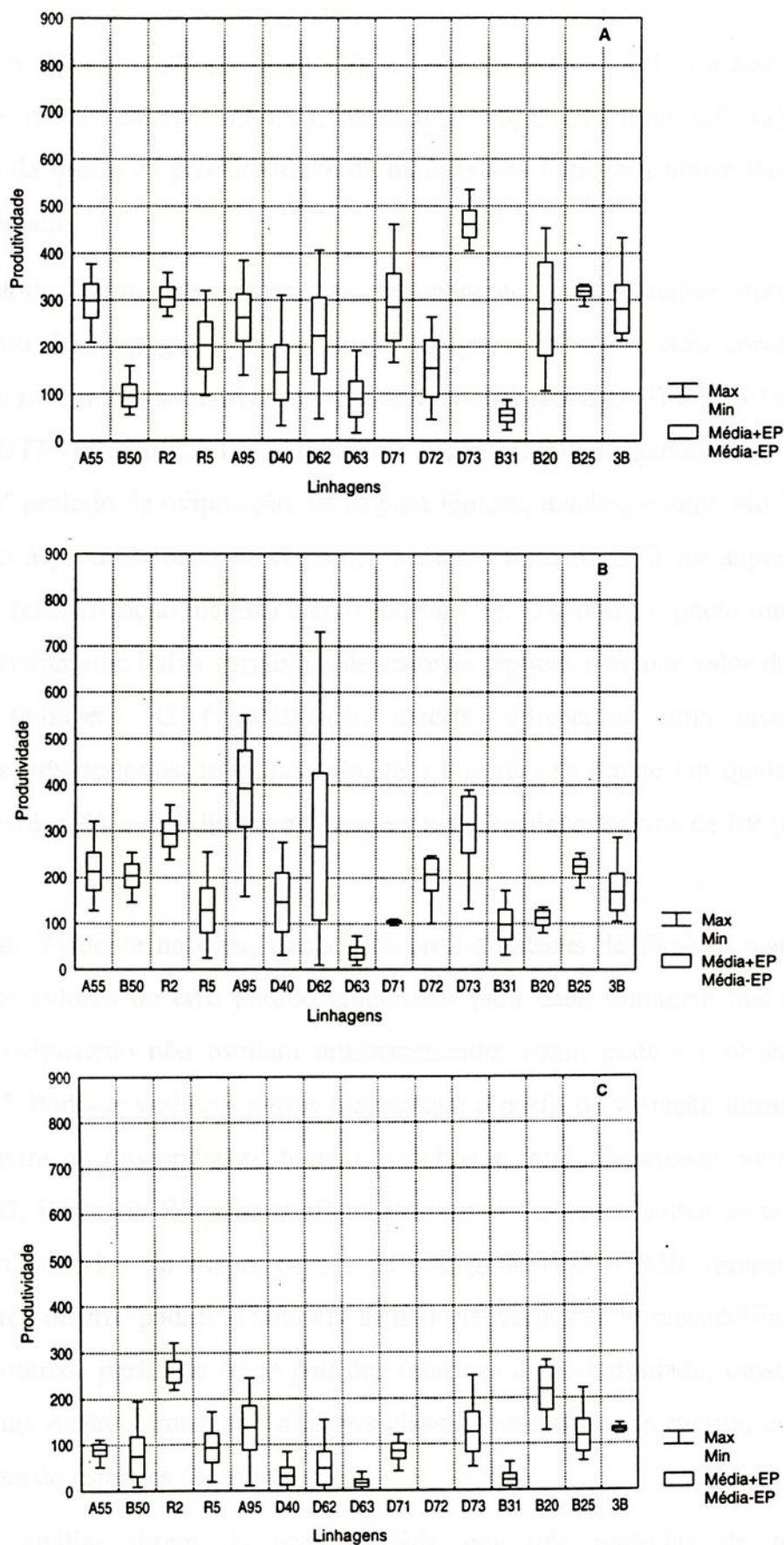


Figura 4. Box plot da produtividade total dos intracruzamentos, nos três períodos de oviposição. A. 1º período. B. 2º período. C. 3º período.

koepferae) e a linhagem 3B (*D. buzzatii*), e também entre C e E, de acordo com a produtividade de fêmeas ($p = 0,0453$), machos ($p = 0,0263$) e total ($0,0333$). Neste 3º período além da queda da produtividade da maioria das linhagens houve também uma queda da variância.

No geral, quanto ao número de descendentes, uma análise descritiva do comportamento das linhagens permite verificar que a linhagem B50 apresenta uma produtividade média baixa e mais semelhante à de B31 (edeago D) e D63 (edeago C). E também, D73 (edeago C) foi a linhagem mais produtiva, sendo este fato mais evidente no 1º período de oviposição, tanto para fêmeas, machos e total. No 3º período de oviposição a produtividade de fêmeas, machos e total de D73 foi superada pelas linhagens R2 (classificação incerta) e B20 (edeago E). Um outro aspecto importante é que D73 apresenta uma baixa variabilidade entre as réplicas e menor valor de EP (erro padrão). A linhagem R2 (classificação incerta) apresentou uma produtividade constante nos três períodos de oviposição, fato que não se repete em qualquer outra linhagem considerada, e esta linhagem também possui valores baixos de EP (Figuras 5 a 7).

Um fato evidente na comparação das produtividades de fêmeas, machos e do total é que os valores de erro padrão calculados para cada linhagem nos diferentes períodos de oviposição não oscilam uniformemente; como pode ser observado nas Figuras 5 a 7. Pode-se verificar nestas figuras que o perfil de variação intraespecífico é o mesmo para os descendentes fêmeas, machos e total. Destaca-se ainda que as linhagens A55, B50, R2, R5, B31 e 3B mostraram perfis semelhantes de erro padrão ao longo dos períodos de oviposição, e as linhagens D62 e B20 apresentaram os maiores valores de erro padrão e também as maiores variações intraespecíficas. Foram encontrados outros perfis de erros padrões relativos à produtividade, mostrando um comportamento variável entre as linhagens classificadas como da mesma espécie, ou entre linhagens de espécies diferentes.

Numa análise direta da produtividade nos três períodos de oviposição observamos que dos 15 intracruzamentos realizados, a maioria (8) foi mais produtivo no 1º período, seguido pelo 2º período (7), e nenhum foi mais produtivo no 3º período.



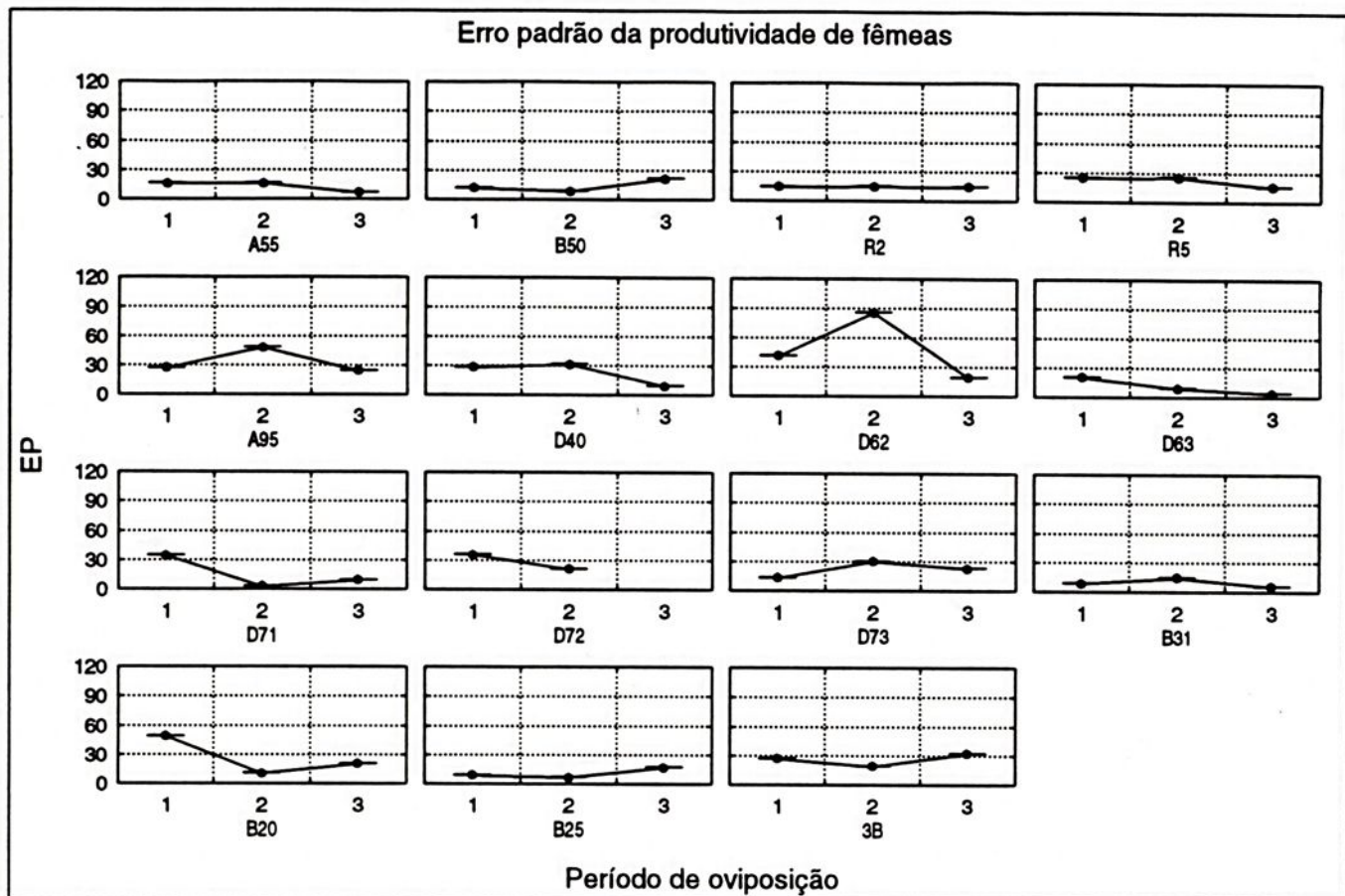


Figura 5. Erro padrão da produtividade de fêmeas das linhagens, por período de oviposição.

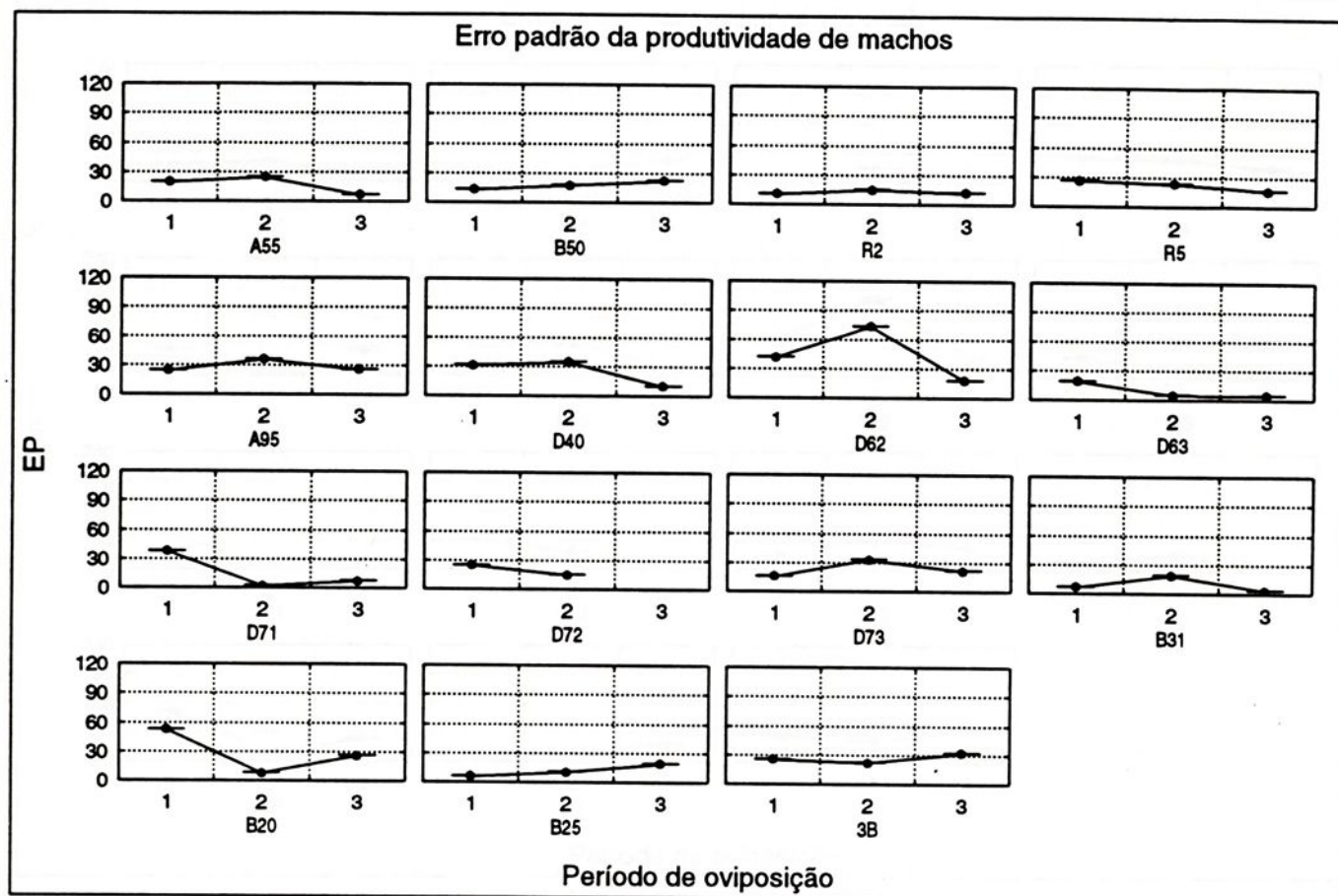


Figura 6. Erro padrão da produtividade de machos das linhagens, por período de oviposição.

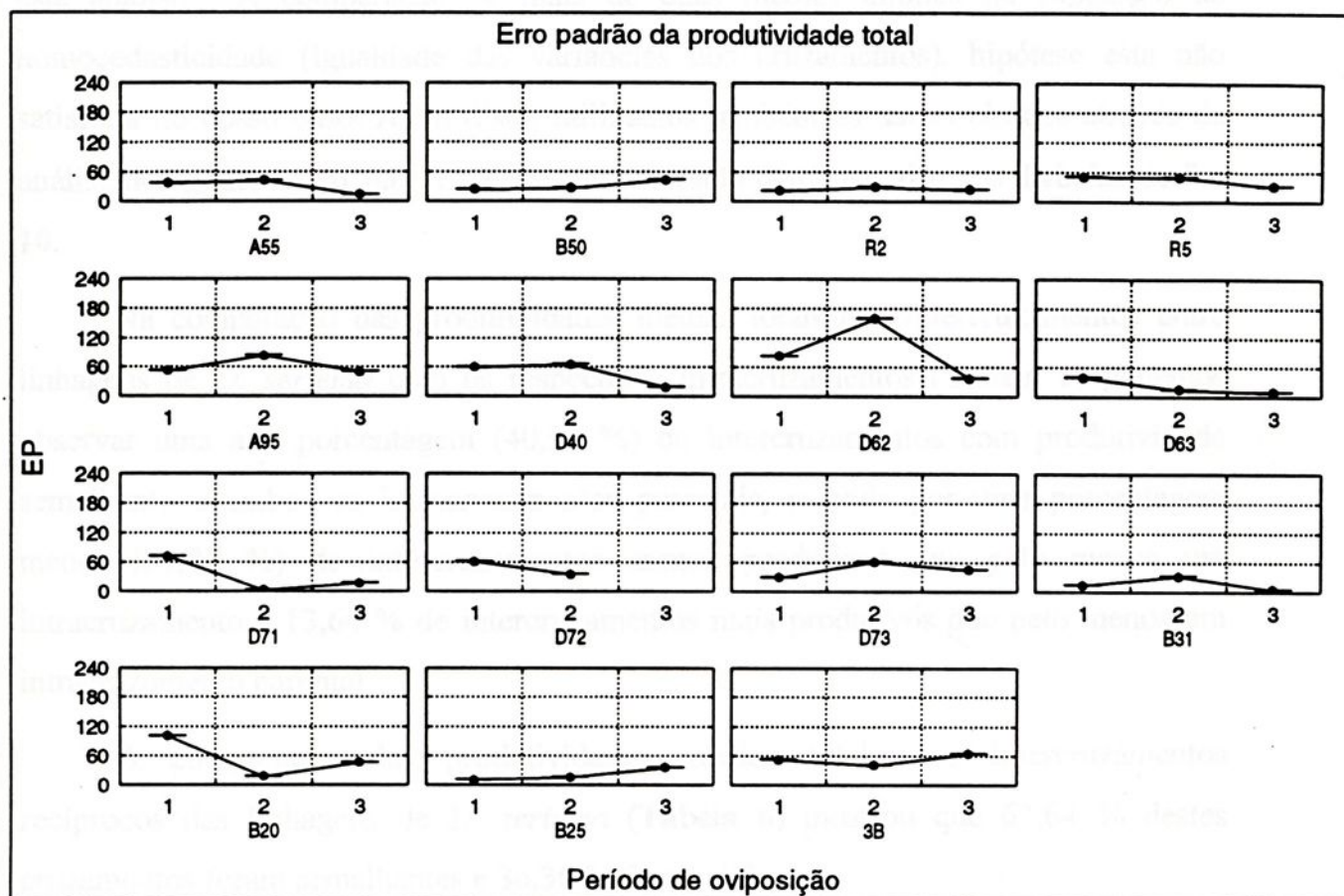


Figura 7. Erro padrão da produtividade total das linhagens, por período de oviposição.

b. Análise da fecundidade dos inter cruzamentos comparados com os respectivos intracruzamentos e inter cruzamentos de F1 correspondentes

Esta análise foi realizada primeiramente através das porcentagens obtidas dentro de cada grupo de inter cruzamentos, nas diferentes situações estabelecidas a partir da comparação das produtividades médias. Foi utilizado o teste t de Student para efetuar esta análise. A comparação de mais de duas médias implica na suposição de homocedasticidade (igualdade das variâncias dos cruzamentos), hipótese esta não satisfeita no nosso caso. Além disto, utilizamos também os dados obtidos através da análise dos gráficos *box plot*. Esses resultados estão demonstrados nas Tabelas de 5 a 10.

Na comparação das produtividades médias totais dos inter cruzamentos entre linhagens de *D. seriema* com os respectivos intracruzamentos (Tabela 5) podemos observar uma alta porcentagem (40,91 %) de inter cruzamentos com produtividade semelhante a ambos os intracruzamentos parentais, seguida por uma porcentagem menor (31,81 %) de inter cruzamentos menos produtivos que pelo menos um intracruzamento e 13,64 % de inter cruzamentos mais produtivos que pelo menos um intracruzamento parental.

A comparação das produtividades médias totais dos inter cruzamentos recíprocos das linhagens de *D. seriema* (Tabela 6) mostrou que 63,64 % destes cruzamentos foram semelhantes e 36,36 % foram diferentes.

Na análise das produtividades médias totais dos inter cruzamentos de F1 com os inter cruzamentos parentais deste grupo (Tabela 7) verificou-se uma alta porcentagem (45,45 %) de inter cruzamentos de F1 semelhantes em sua produtividade com os inter cruzamentos parentais, seguida de 40,91 % de inter cruzamentos de F1 menos produtivos que os inter cruzamentos parentais. Somente 13,64 % dos inter cruzamentos de F1 foram mais produtivos que os inter cruzamentos parentais correspondentes.

Na Tabela 8 verificamos uma porcentagem pequena (12,50 %) dos inter cruzamentos entre linhagens com edeagos diferentes que tiveram produtividade



Tabela 5. Comparação das produtividades médias totais dos inter cruzamentos entre linhagens de *D. seriema* com os respectivos intracruzamentos.

SITUAÇÃO	NÚMERO E (%) DO TOTAL DE INTERCRUZAMENTOS DENTRO DE CADA SITUAÇÃO	INTERCRUZAMENTOS ENCONTRADOS EM CADA SITUAÇÃO
A. Intercruzamentos mais produtivos que ambos os intracruzamentos parentais	2 (9,10)	FD40 x MD63 e FD63 x MD40
B. Intercruzamentos mais produtivos que pelo menos um intracruzamento parental	3 (13,64)	FD40 x MD62, FD63 x MD72 e FD72 x MD63
C. Intercruzamentos menos produtivo que um intra e mais que o outro intra parental	1 (4,54)	F A95 x MD63
D. Intercruzamentos menos produtivos que pelo menos um intracruzamento	7 (31,81)	FD63 x MA95, FA95 x MD71, FA95 x MD72, FD72 x MA95, FD40 x MD73, FD73 x MD40 e FD73 x MD72
E. Intercruzamentos semelhantes a produtividade de ambos os intracruzamentos parentais	9 (40,91)	FA95 x MD40, FD40 x MA95, FD71 x MA95, FA95 x MD73, FD73 x MA95, FD62 x MD40, FD40 x MD71, FD71 x MD40 e FD72 x MD73

Tabela 6. Comparação das produtividades médias totais dos inter cruzamentos recíprocos entre linhagens de *D. seriema*.

SITUAÇÃO	NÚMERO E (%) DO TOTAL DE INTERCRUZAMENTOS DENTRO DE CADA SITUAÇÃO	INTERCRUZAMENTOS ENCONTRADOS EM CADA SITUAÇÃO
A. Recíprocos semelhantes	14 (63,64)	FA95x MD40, FD40 x MA95, FA95x MD73, F D73 x M A95, FD40x MD62, FD62 x MD40, FD40x MD63, FD63 x MD40, FD40x MD71, F D71 x MD40, FD40x MD73, FD73 x MD40, FD72x MD73 e FD73 x MD72
B. Recíprocos diferentes	8 (36,36)	FA95x MD63, FD63 x MA95, FA95x MD71, F D71 x M A95, FA95x MD72, FD72 x MA95, FD63x MD72 e FD72 x MD63



Tabela 7. Comparação das produtividades médias totais dos inter cruzamentos de F1 com os inter cruzamentos parentais, em linhagens de *D. seriema*.

SITUAÇÃO	NÚMERO E (%) DO TOTAL DE INTERCRUZAMENTOS DENTRO DE CADA SITUAÇÃO	INTERCRUZAMENTOS ENCONTRADOS EM CADA SITUAÇÃO
A. Intercruzamentos de F1 menos produtivos que os inter cruzamentos parentais	9 (40,91)	FD40 x MD62, FD40 x MD63, FD40 x MD71, FD71 x MD40, FD40 x MD73, FD73 x MD40 FD71 x MA95, FD72 x MD63 e FD73 x MA95
B. Intercruzamentos de F1 mais produtivos que os inter cruzamentos parentais	3 (13,64)	FA95 x MD72, FA95 x MD40 e FD73 x MD72
C. Intercruzamentos de F1 semelhantes em sua produtividade com os inter cruzamentos parentais	10 (45,45)	FD40 x MA95, FA95 x MD63, FD63 x MA95, FA95 x MD71, FD72 x MA95, FA95 x MD73 FD62 x MD40, FD63 x MD40, FD63 x MD72 e FD72 x MD73

Tabela 8. Comparação das produtividades médias totais dos inter cruzamentos entre linhagens de espécies ou eideagos diferentes com os respectivos intracruzamentos.

SITUAÇÃO	NÚMERO E (%) DO TOTAL DE INTERCRUZAMENTOS DENTRO DE CADA SITUAÇÃO	INTERCRUZAMENTOS ENCONTRADOS EM CADA SITUAÇÃO
A.. Intercruzamentos menos produtivos que pelo menos um intracruzamento parental	7 (21,87)	FA55 x MD63, FD63 x MA55, FA55 x MD71, FD71 x MA55, FB25 x MB50, FR2 x MD63 e FB31 x MR5
B. Intercruzamentos menos produtivos que ambos os intracruzamentos parentais	8 (25,00)	FB50 x MB25, FA55 x MR2, FR2 x MA55, FA95 x MB25, FB25 x MA95, FR2 x MB50, FA55 x MR5 e FR5 x MA55
C. Intercruzamentos semelhantes a produtividade de ambos os intracruzamentos parentais	4 (12,50)	FD63 x MR2, FR5 x M3B, F3B x MR5 e FR5 x MB31
D. Intercruzamentos Estéreis	13 (40,63)	FR2 x MA95, FA95 x MR2, FR2 x MD62, FD62 x MR2, FR2 x MD71, FD71 x MR2, FR2 x MD72, FD72 x MR2, FR2 x MD73, FD73 x MR2, FR5 x MB20, FB20 x MR5 e FB50 x MR2



Tabela 9. Comparação das produtividades médias totais entre inter cruzamentos recíprocos das linhagens de espécies ou edeagos diferentes.

SITUAÇÃO	NÚMERO E (%) DO TOTAL DE INTERCRUZAMENTOS DENTRO DE CADA SITUAÇÃO	INTERCRUZAMENTOS ENCONTRADOS EM CADA SITUAÇÃO
A. Recíprocos semelhantes	28 (87,50)	FR5 x MA55, FA55 x MR5, FA55 x MR2, FR2 x MA55, FA95 x MR2, FR2x MA95, FA95 x MB25, FB25 x MA95, FD62 x MR2, FR2 x MD62, FD63 x MA55, FA55 x MD63, FD63x MR2, FR2 x MD63, FD71 x MA55, FA55 x MD71, FD71 x MR2, FR2 x MD71, FD72 x MR2, FR2 x MD72, FD73 x MR2, FR2 x MD73, FR5 x M3B, F3B x MR5, FR5 x MB31, FB31 x MR5, FR5 x MB20 e FB20 x MR5
B. Recíprocos diferentes	4 (12,50)	FR2 x MB50, FB50 x MR2, FB50 x MB25 e FB25 x MB50

Tabela 10. Comparação das produtividades médias totais dos inter cruzamentos de F1 entre linhagens de espécies ou edeagos diferentes com os inter cruzamentos parentais.

SITUAÇÃO	NÚMERO E % DO TOTAL DE INTERCRUZAMENTOS DENTRO DE CADA SITUAÇÃO	INTERCRUZAMENTOS ENCONTRADOS EM CADA SITUAÇÃO
A. Intercruzamentos de F1 menos produtivos que os inter cruzamentos parentais	3 (15,79)	FA55 x MR5, FR5 x M3B e F3B x MR5
B. Intercruzamentos de F1 mais produtivos que os inter cruzamentos parentais	2 (10,53)	FR2 x MA55 e FR2 x MB50
C. Intercruzamentos de F1 semelhantes em sua produtividade com os inter cruzamentos parentais	11 (57,89)	FB25 x MA95, FD63 x MA55, FA55 x MD63, FD63 x MR2, FR2 x MD63, FD71 x MA55, FR5 x MB31, FB31 x MR5, FB50 x MB25, FR5 x MA55 e FA55 x MR2
D. Intercruzamentos de F1 estéreis	3 (15,79)	FA55 x MD71, FA95 x MB25 e FB25 x MB50



semelhante a dos intracruzamentos parentais, todos envolveram as linhagens R2 e R5. Já, na observação das produtividades dos intercruzamentos recíprocos (Tabela 9) verificamos que a maioria (87,50 %) foi semelhante. Vale destacar que no grupo dos recíprocos diferentes entre si em suas produtividades, todos os intercruzamentos deste grupo incluíam os intercruzamentos com a linhagem B50.

Quando comparamos as produtividades médias totais dos intercruzamentos de F1 com as dos intercruzamentos parentais (Tabela 10), verificamos que a maioria (57,89 %) teve produtividade semelhante à produtividade dos intercruzamentos parentais.

Analisando os dados da produtividade nos três períodos de oviposição observamos que dos 22 intercruzamentos realizados entre linhagens com mesmo tipo de edeago, os períodos mais produtivos foram o 1º (10) e o 2º (10), e o 3º foi o menos produtivo (2). Já nos intercruzamentos de F1 deste grupo o 2º período foi o mais produtivo (13).

Dos 19 intercruzamentos férteis realizados entre linhagens com tipos de edeagos diferentes, o 1º período foi ligeiramente mais produtivo (8) que o 2º (7), e o 3º foi o menos produtivo (4). Nos intercruzamentos de F1 deste grupo, o 1º período também foi o mais produtivo (13).

A maioria dos intercruzamentos em que a análise dos *box plot* e EP foi realizada pertence aos intercruzamentos entre linhagens com mesmo tipo de edeago, com exceção dos intercruzamentos entre a linhagem R2 (classificação incerta) com as linhagens A55 e B50 (edeago B), e entre a linhagem R5 (classificação incerta) e A55. Este fato foi devido ao grande número de intercruzamentos entre linhagens com edeagos diferentes que apresentaram réplicas estéreis ou no próprio intercruzamento parental, ou nos intercruzamentos de F1, ou intercruzamentos que apresentaram baixo número de descendentes (como pode ser observado na Tabela 4), ou ainda os intercruzamentos estéreis. Quanto a esta análise, as Figuras 8 a 19 mostram que:

Quando comparados aos intracruzamentos observa-se uma maior produtividade nos cruzamentos F D40 x M D63, F D63 x M D40, F D40 x M D62 e F A95 x M D73,



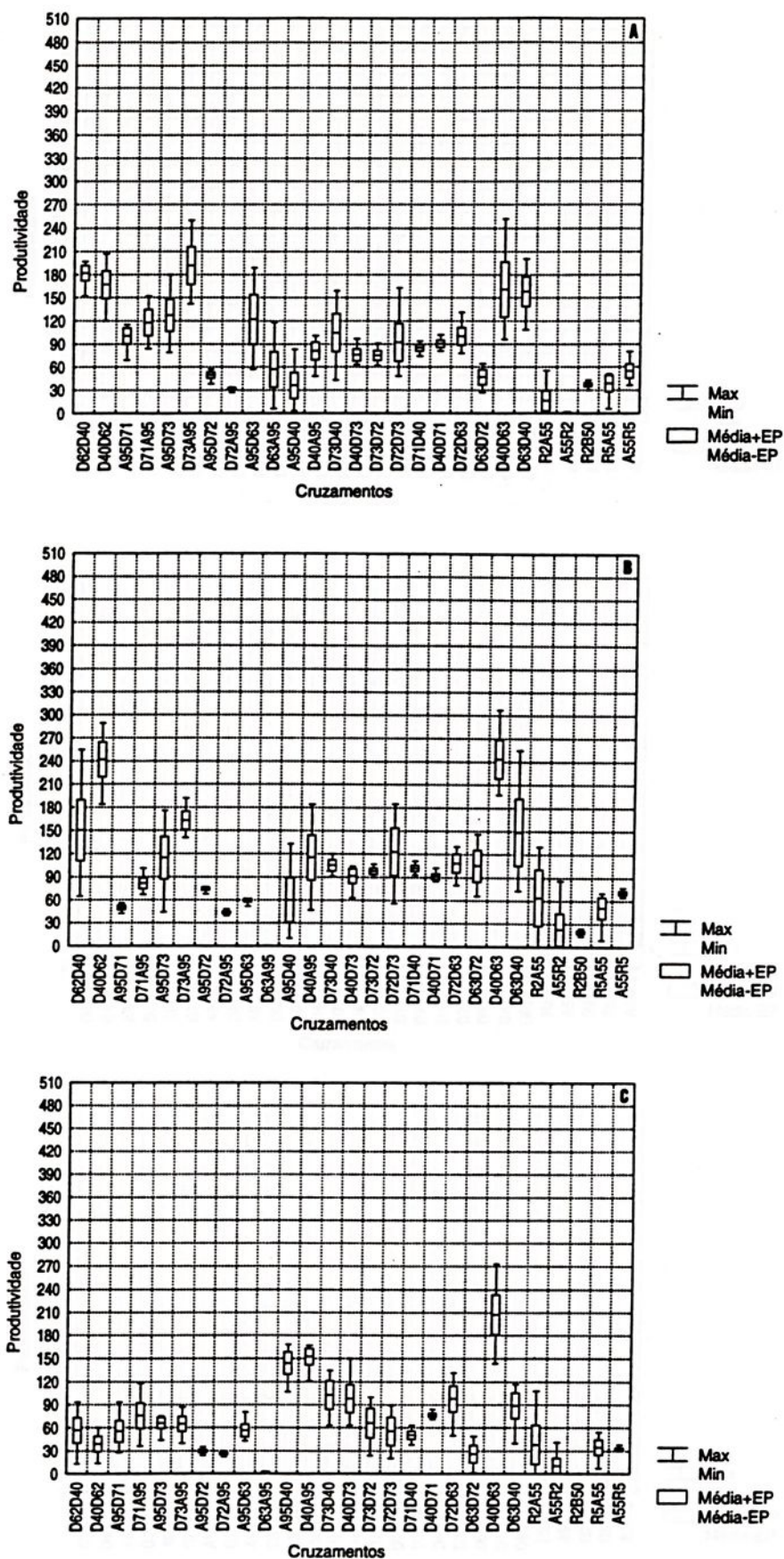


Figura 8. Box plot da produtividade de fêmeas dos intercruzamentos com os recíprocos, nos três períodos de oviposição. A. 1º período. B. 2º período. C. 3º período.

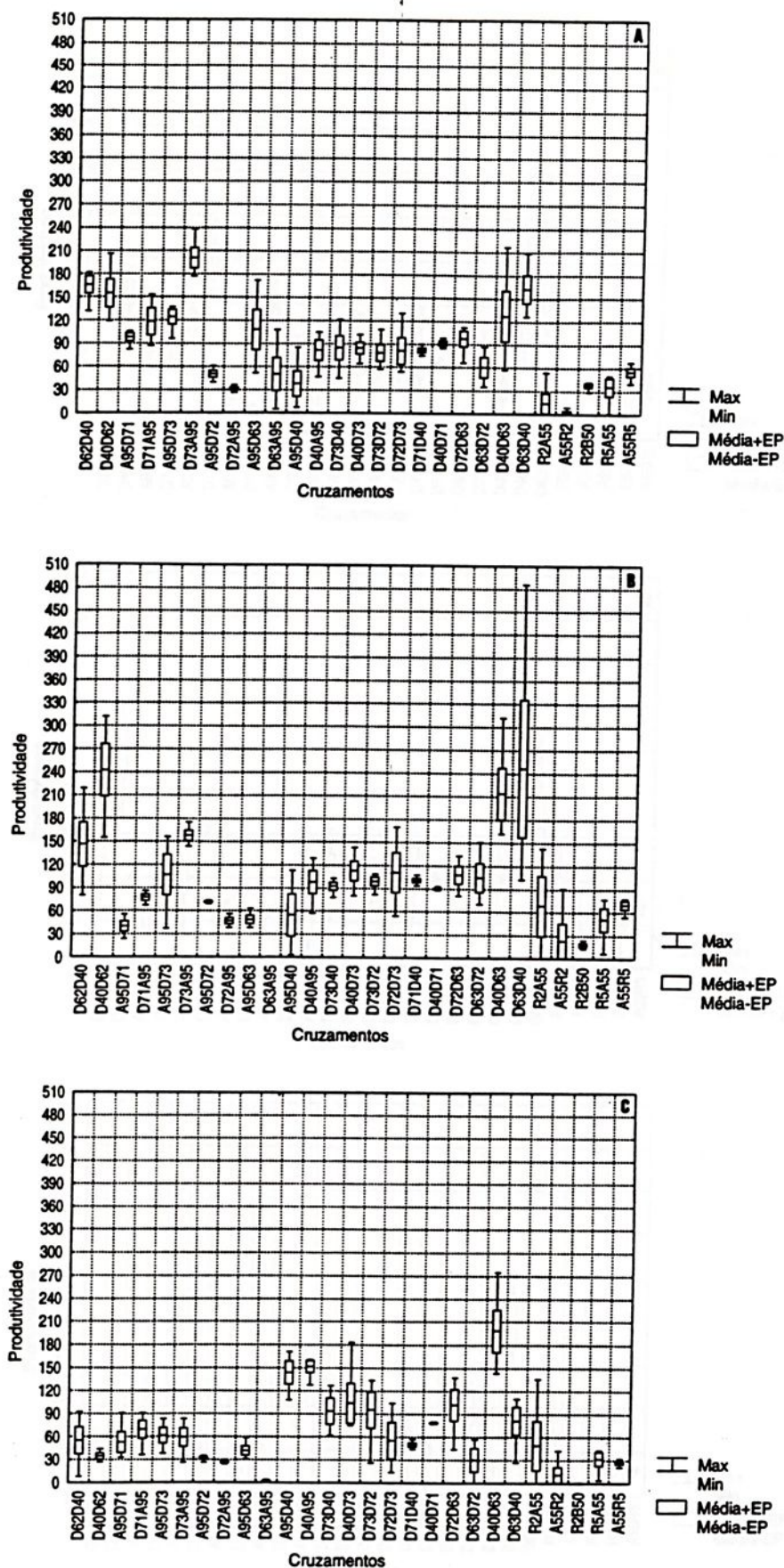


Figura 9. Box plot da produtividade de machos dos intercruzamentos com os recíprocos, nos três períodos de oviposição. A. 1º período. B. 2º período. C. 3º período.

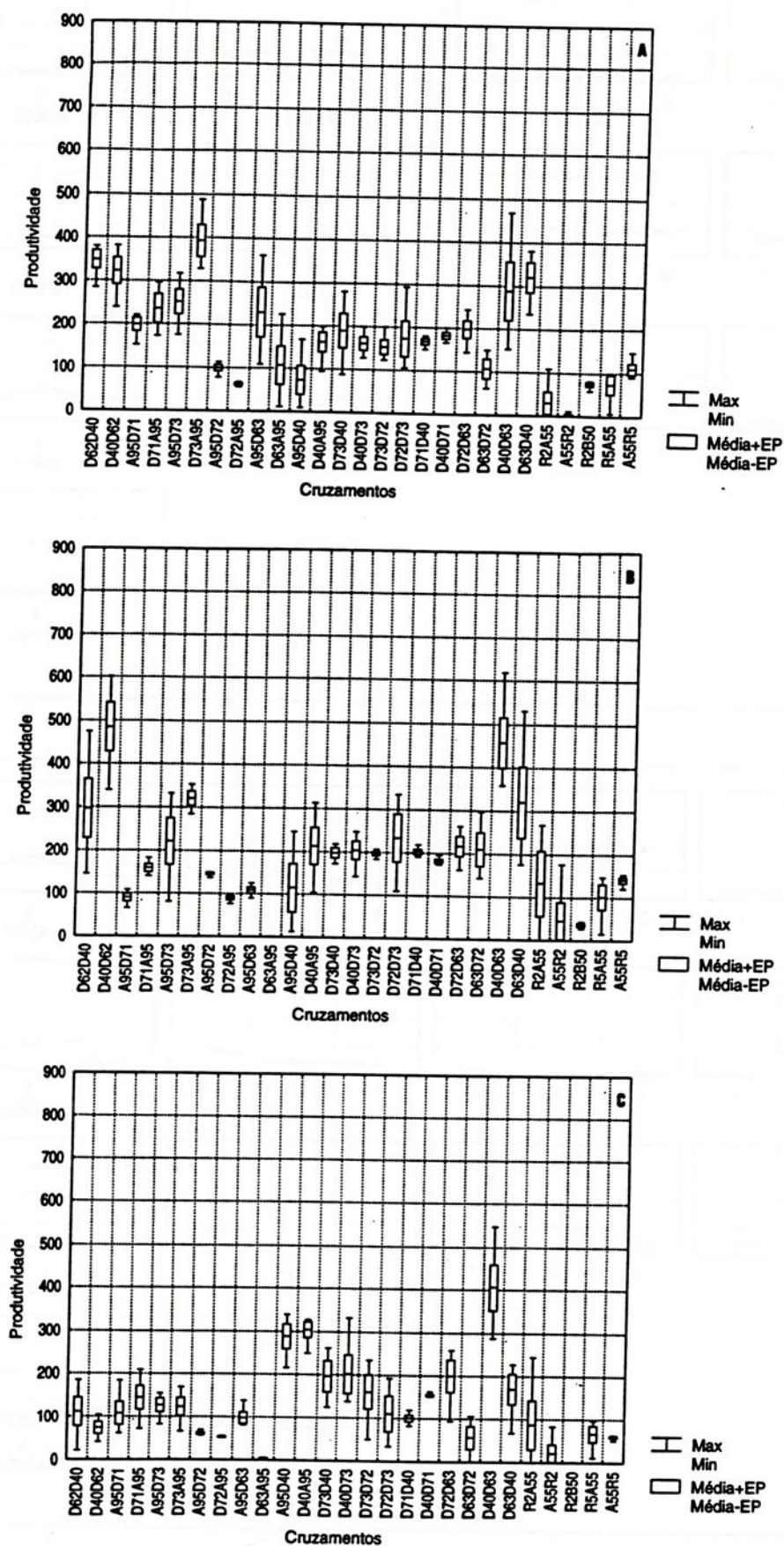
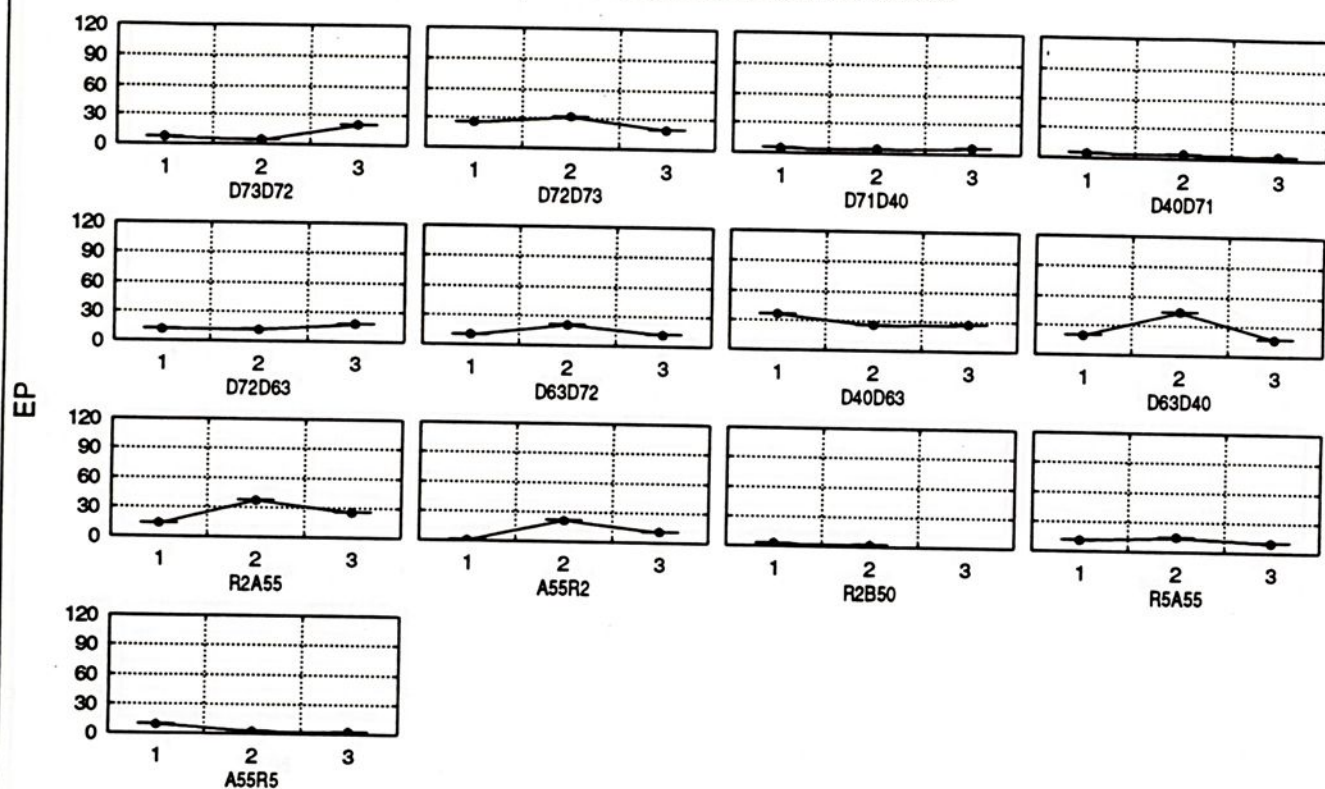


Figura 10. Box plot da produtividade total dos intercruzamentos com os recíprocos, nos três períodos de oviposição. A. 1º período. B. 2º período. C. 3º período.



Erro padrão da produtividade de fêmeas



Período de oviposição

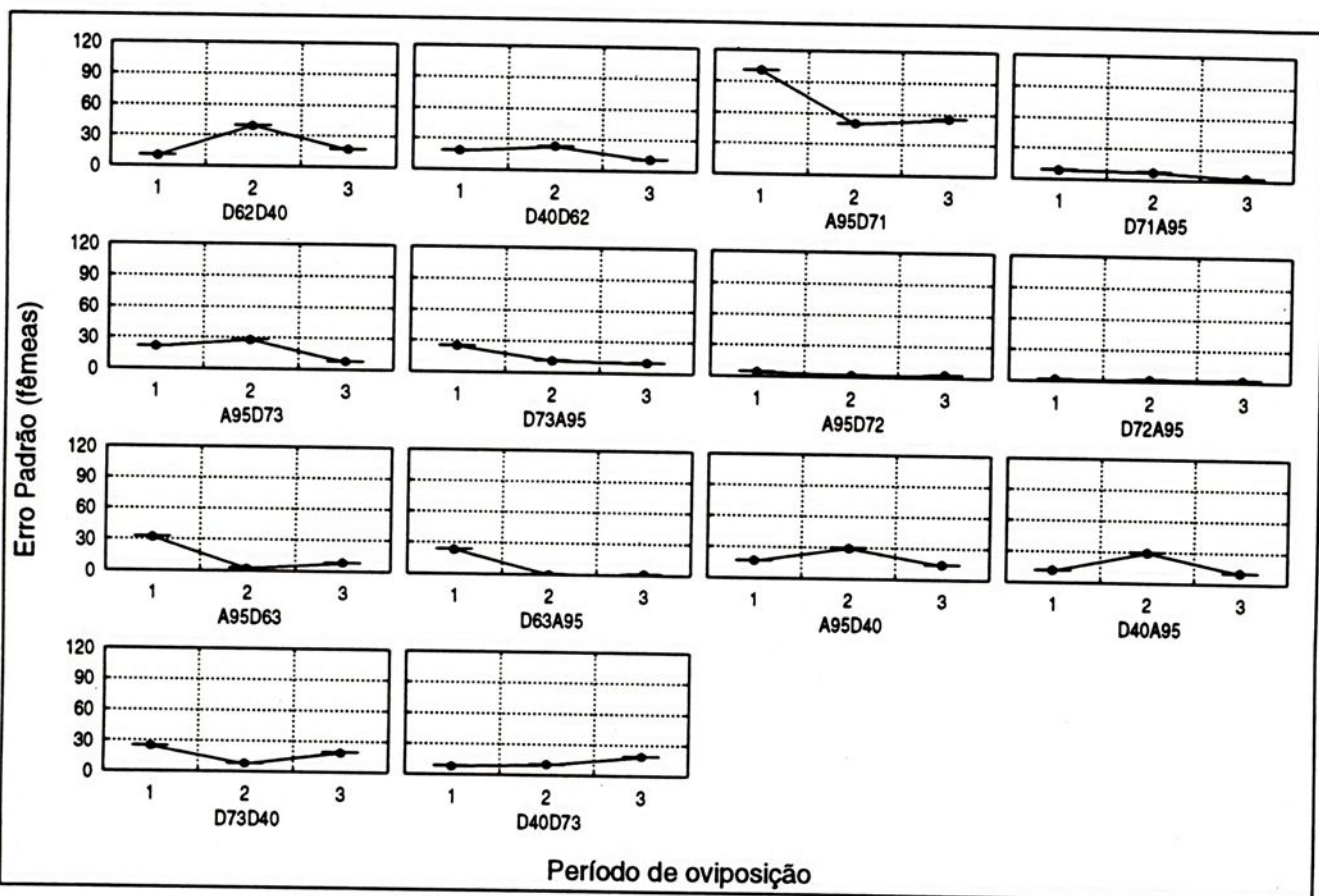


Figura 11. Erro padrão da produtividade de fêmeas dos intercruzamentos e os respectivos recíprocos, por período de oviposição.

Erro padrão da produtividade de machos

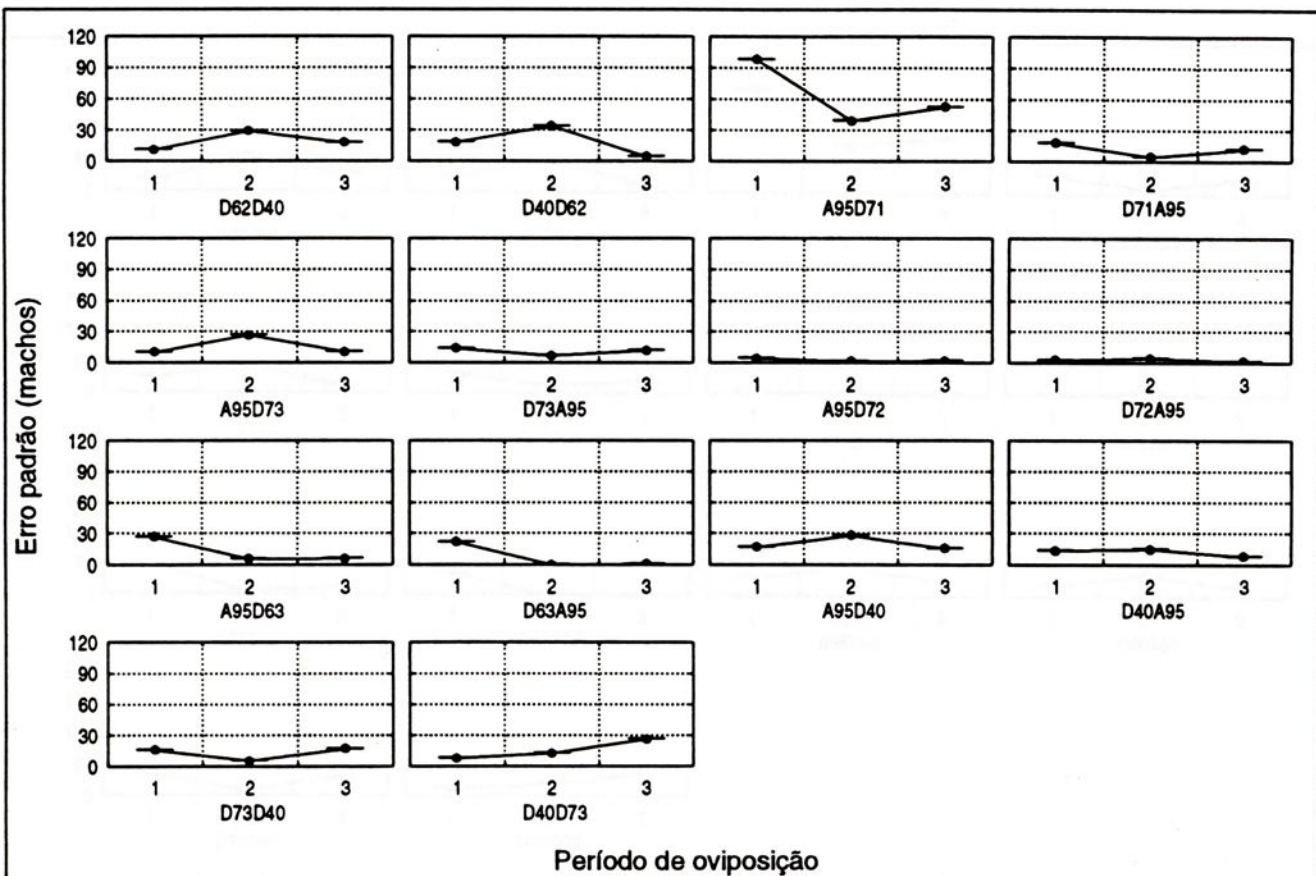
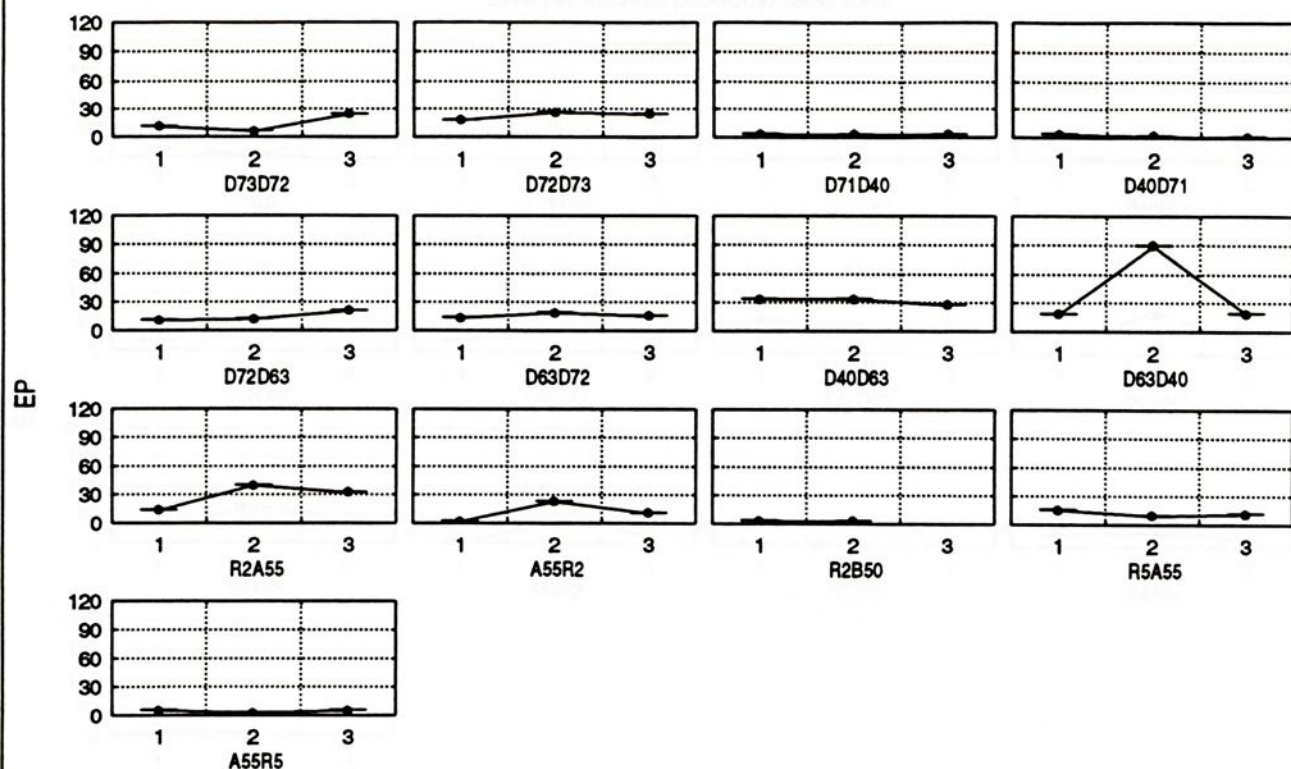


Figura 12. Erro padrão da produtividade de machos dos inter cruzamentos e os respectivos recíprocos, por período de oviposição.

Erro padrão da produtividade total

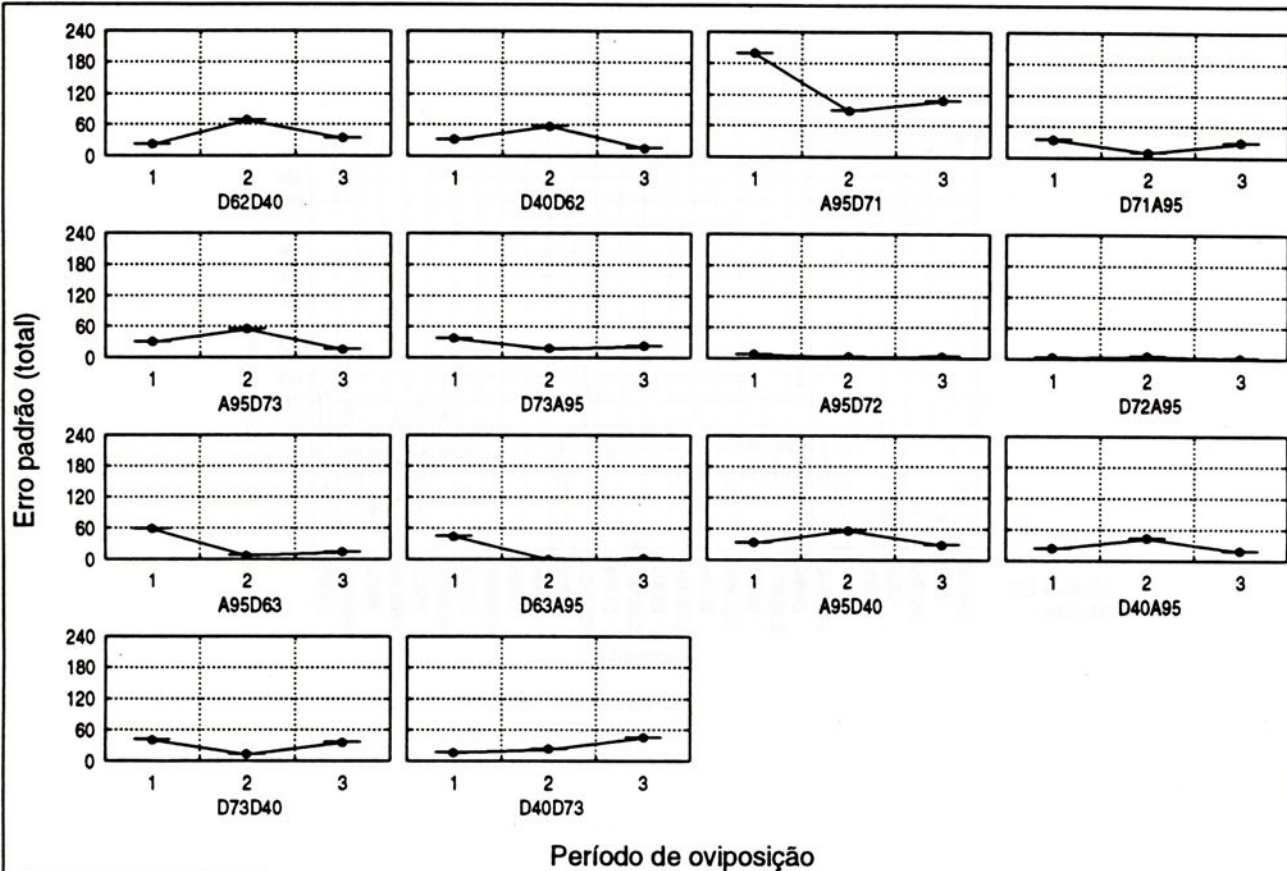
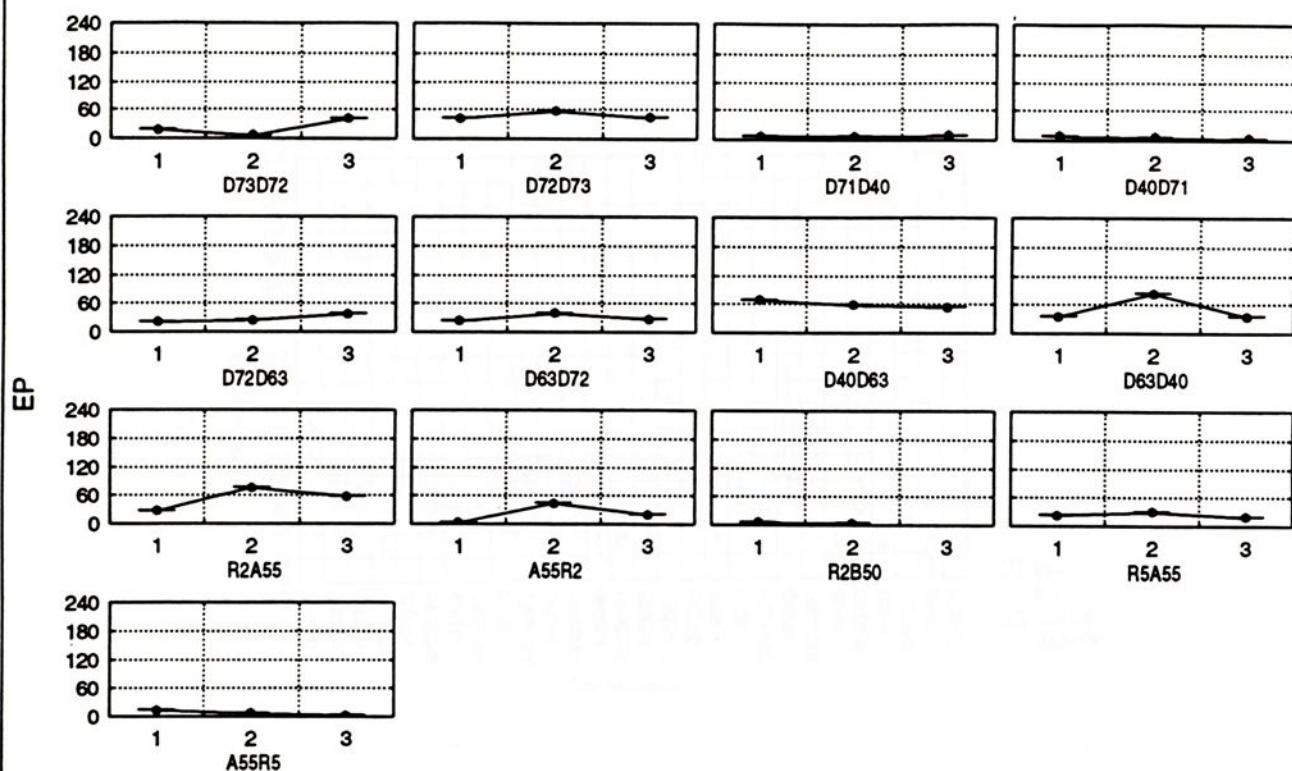


Figura 13. Erro padrão da produtividade total dos intercruzamentos e os respectivos recíprocos por, período de oviposição.

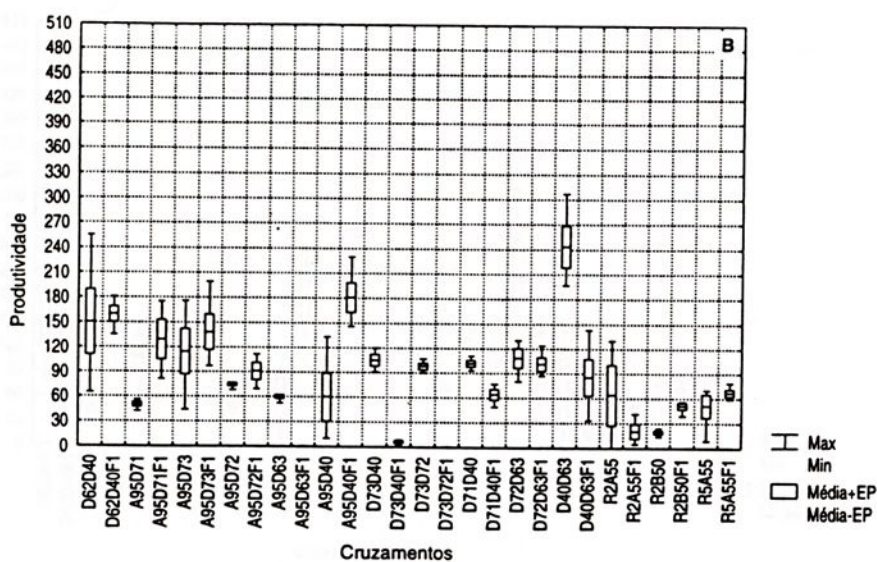
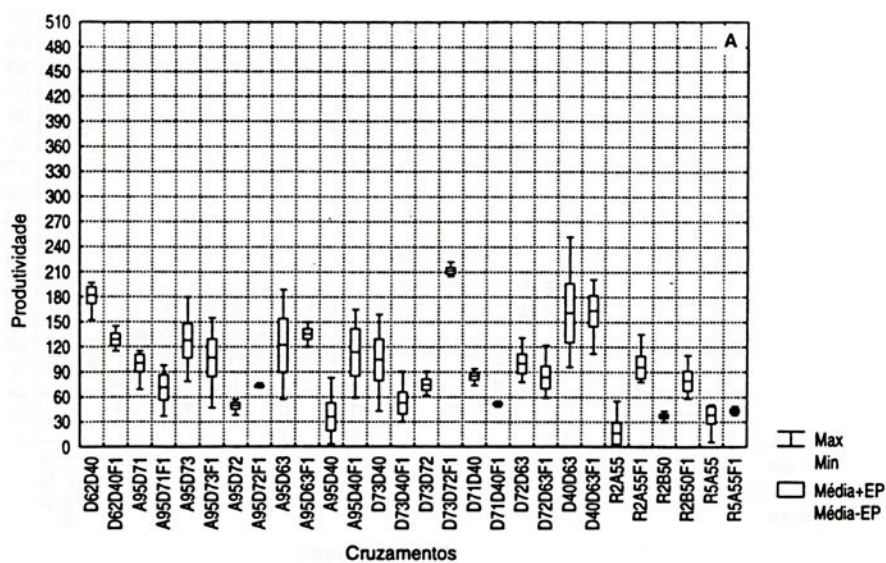


Figura 14. Box plot da produtividade de fêmeas dos intercruzamentos com os F1 correspondentes, nos dois períodos de oviposição. A. 1º período. B. 2º período.

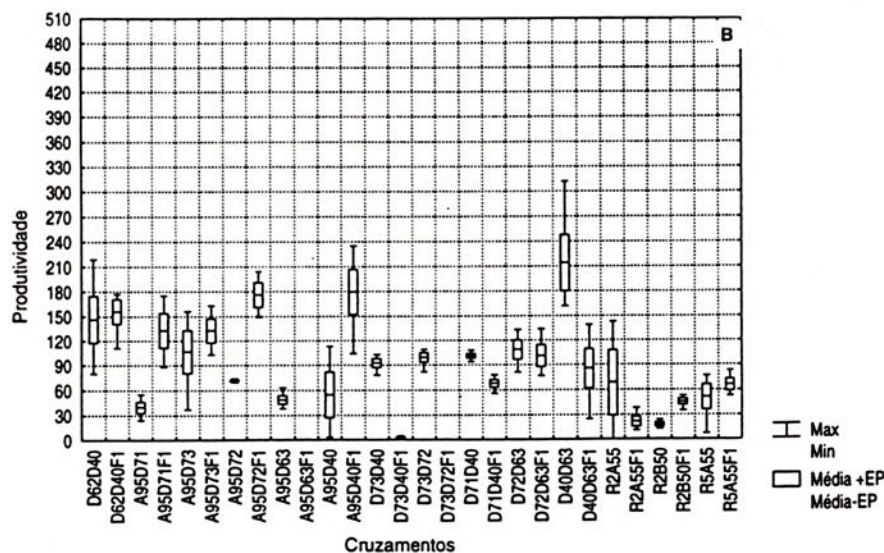
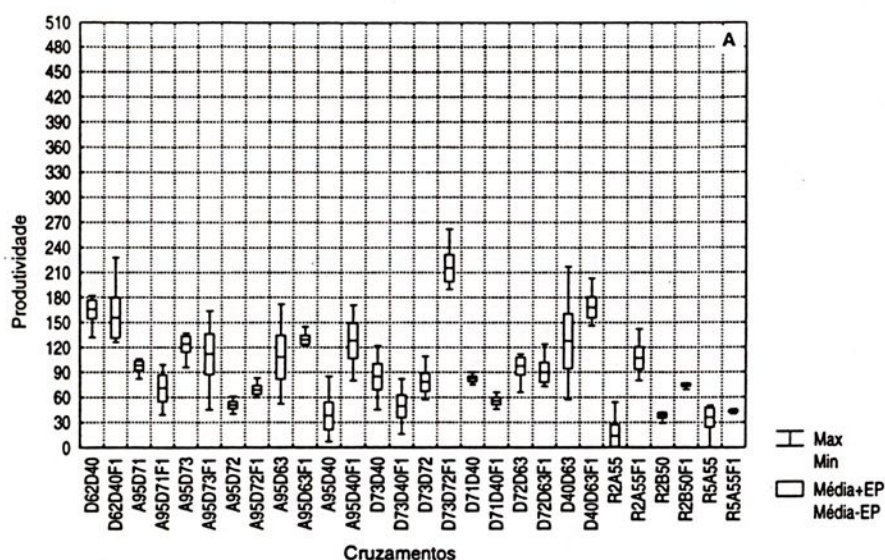


Figura 15. Box plot da produtividade de machos dos intercrossamentos com os F1 correspondentes, nos dois períodos de oviposição. A. 1º período. B. 2º período.



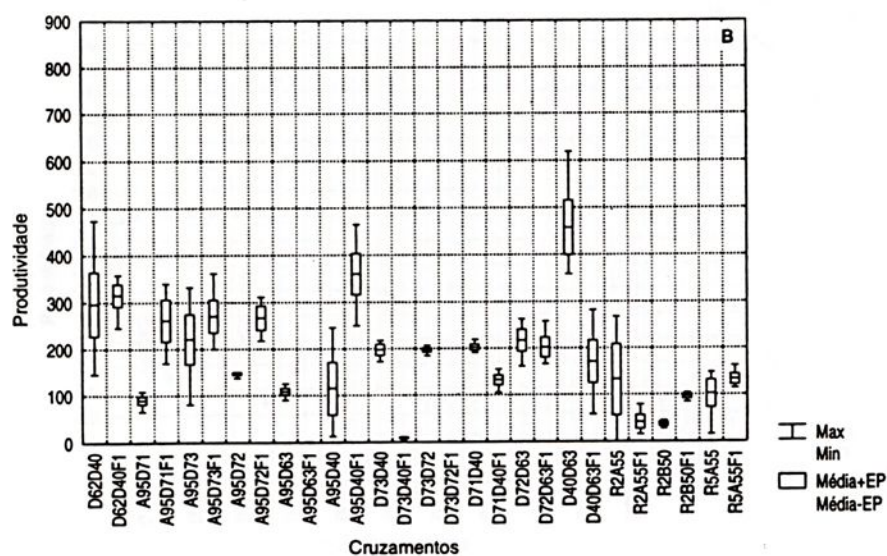
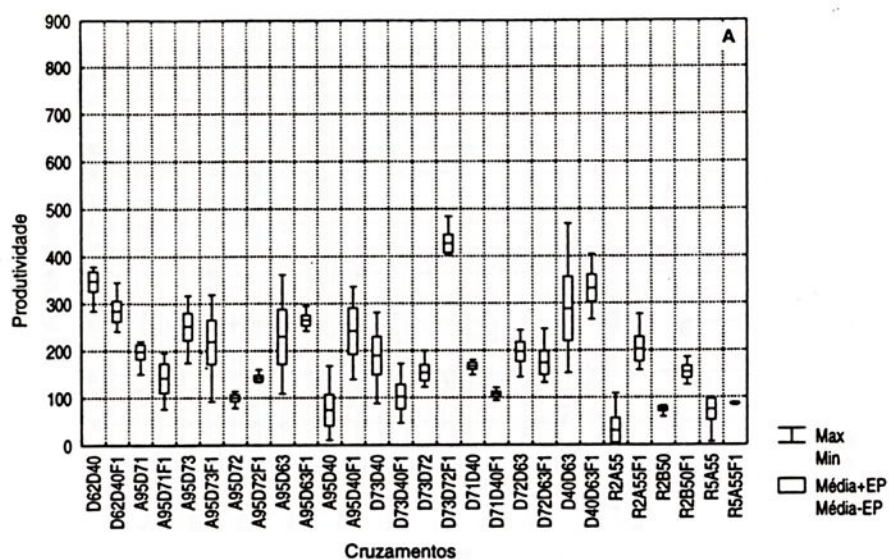


Figura 16. Box plot da produtividade total dos inter cruzamentos com os F1 correspondentes, nos dois períodos de oviposição. A. 1º período. B. 2º período.

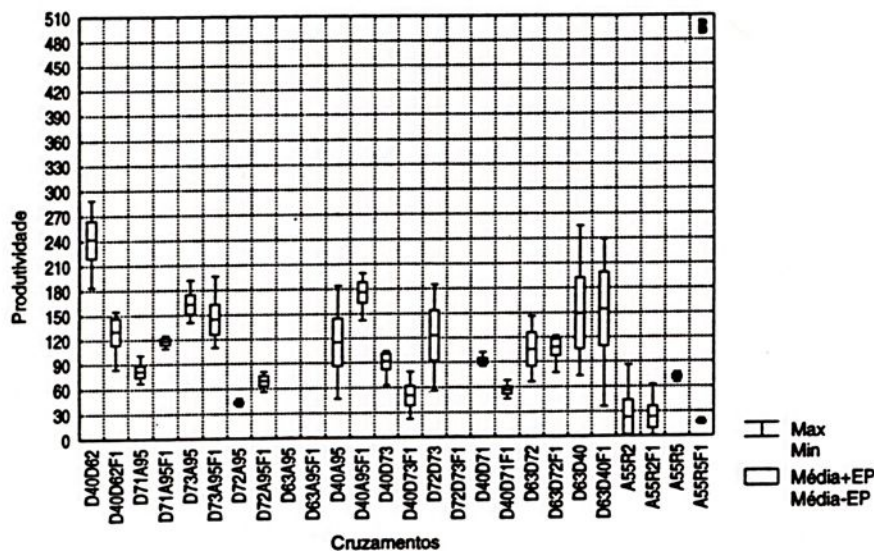
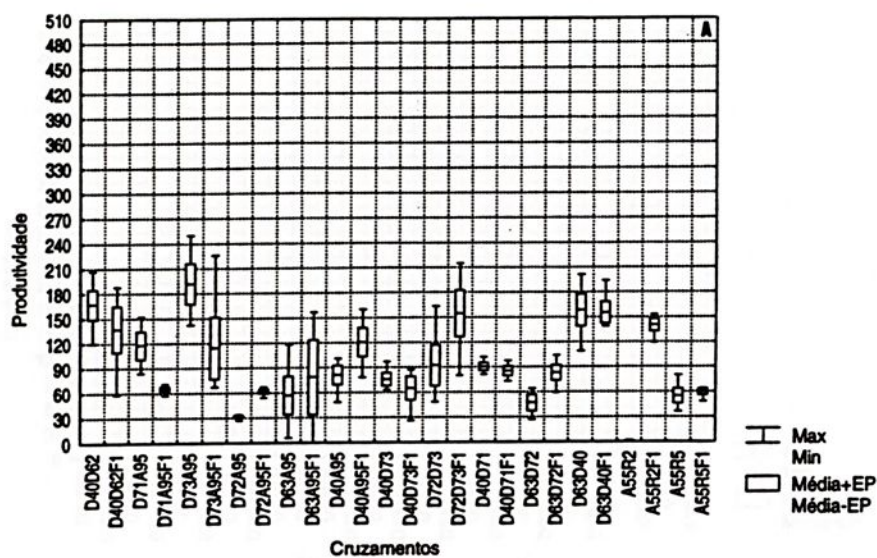


Figura 17. Box plot da produtividade de fêmeas dos intercrossamentos recíprocos indicados nas Figuras 14, 15 e 16 com os F1 correspondentes, nos dois períodos de oviposição. A. 1º período. B. 2º período.

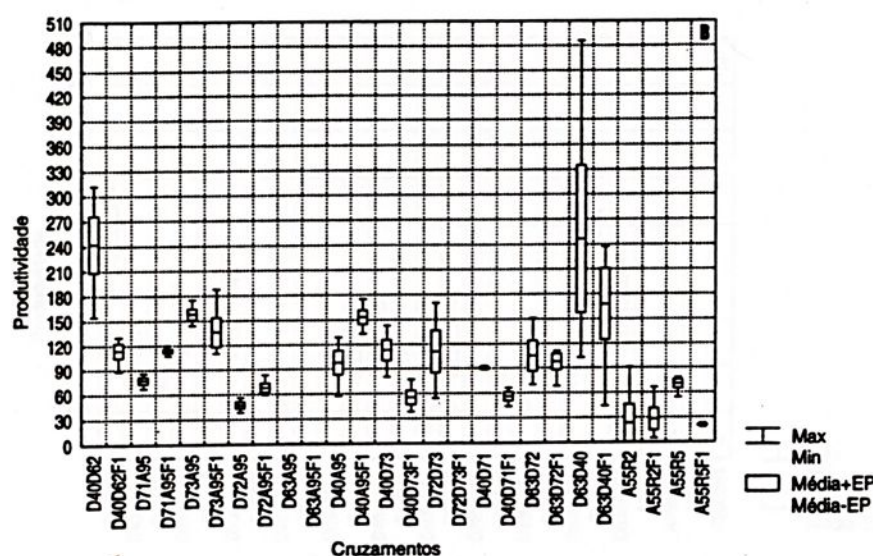
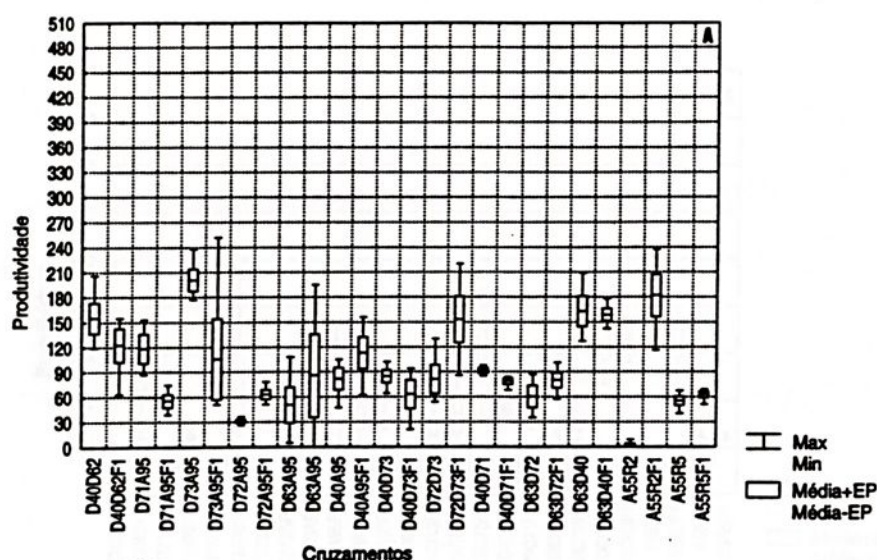


Figura 18. Box plot da produtividade de machos dos intercruzamentos recíprocos indicados nas Figuras 14, 15 e 16 com os F1 correspondentes, nos dois períodos de oviposição. A. 1º período. B. 2º período.

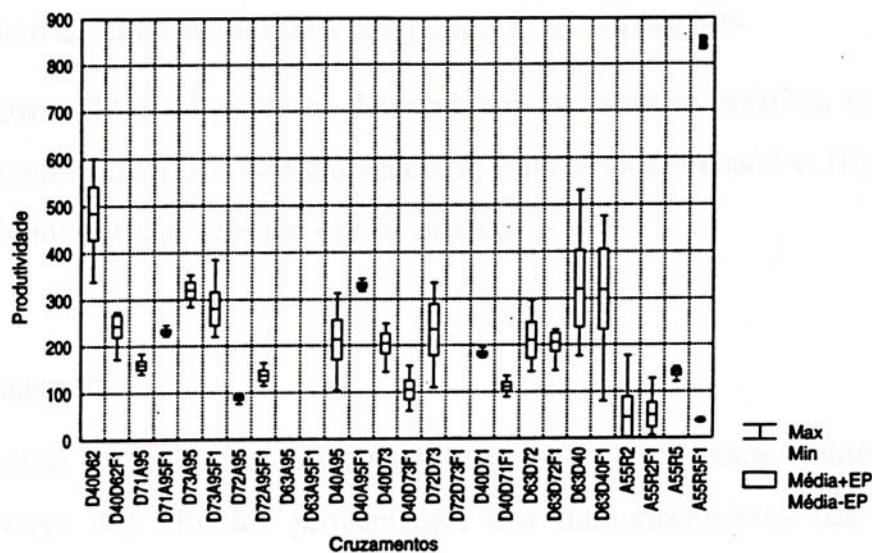
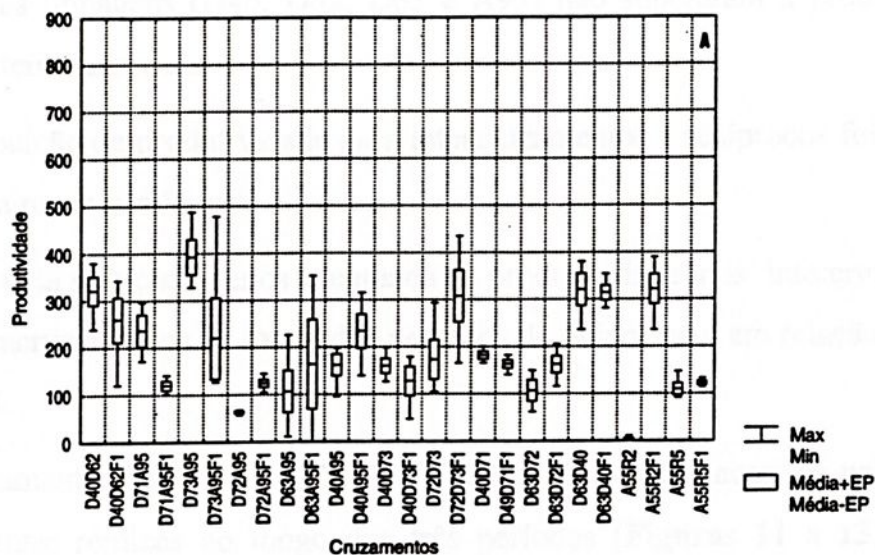


Figura 19. Box plot da produtividade total dos intercruzamentos recíprocos indicados nas Figuras 14, 15 e 16 com os F1 correspondentes, nos dois períodos de oviposição. A. 1º período. B. 2º período.

sendo que o primeiro se manteve nos três períodos de oviposição com produtividade média mais elevada. Vale destacar que exceto D73, os demais intracruzamentos envolvendo estas linhagens (D40, D62, D63 e A95) não superaram a produtividade média destes intercruzamentos.

A distribuição de produtividade para intercruzamentos e recíprocos foi bastante semelhante para machos e fêmeas.

Nota-se uma redução menos acentuada da produtividade nos intercruzamentos do que nos intracruzamentos ao longo dos períodos de oviposição, em relação a ambos os sexos e total.

Os cruzamentos F A95 x M D71 e F D63 x M D40 destacam-se pela grande variabilidade entre réplicas ao longo dos três períodos (**Figuras 11 a 13**). Para o primeiro intercruzamento os maiores valores de EP da produtividade são encontrados no 1º período de oviposição, já no último (F D63 x M D40), o 2º período é o mais heterogêneo.

Os intercruzamentos F D72 x M A95, F R2 x M B50 e F A55 x M R2 geraram um menor número de descendentes nos três períodos de oviposição.

Nas **Figuras 14 a 19** pode-se destacar que os intercruzamentos de F1 com produtividade maior que a dos intercruzamentos parentais (**Tabelas 7 e 10**) foram de menor variabilidade entre as réplicas que os mesmos.

2. Análise Citogenética

Esta análise foi efetuada principalmente nos cromossomos politênicos das glândulas salivares dos híbridos provenientes dos intracruzamentos das linhagens classificadas como *D. seriema* e dos intercruzamentos entre estas e outras espécies.

Pela análise qualitativa realizada em 410 lâminas, 15 células/lâmina, não foi observada diferença acentuada entre o grau de assinapse cromossômica observado intralinhagem e o dos intercruzamentos de *D. seriema*. A maioria dos cromossomos mostraram sinapse completa em toda sua extensão (**Figuras 20, 21 e 22**), com exceção



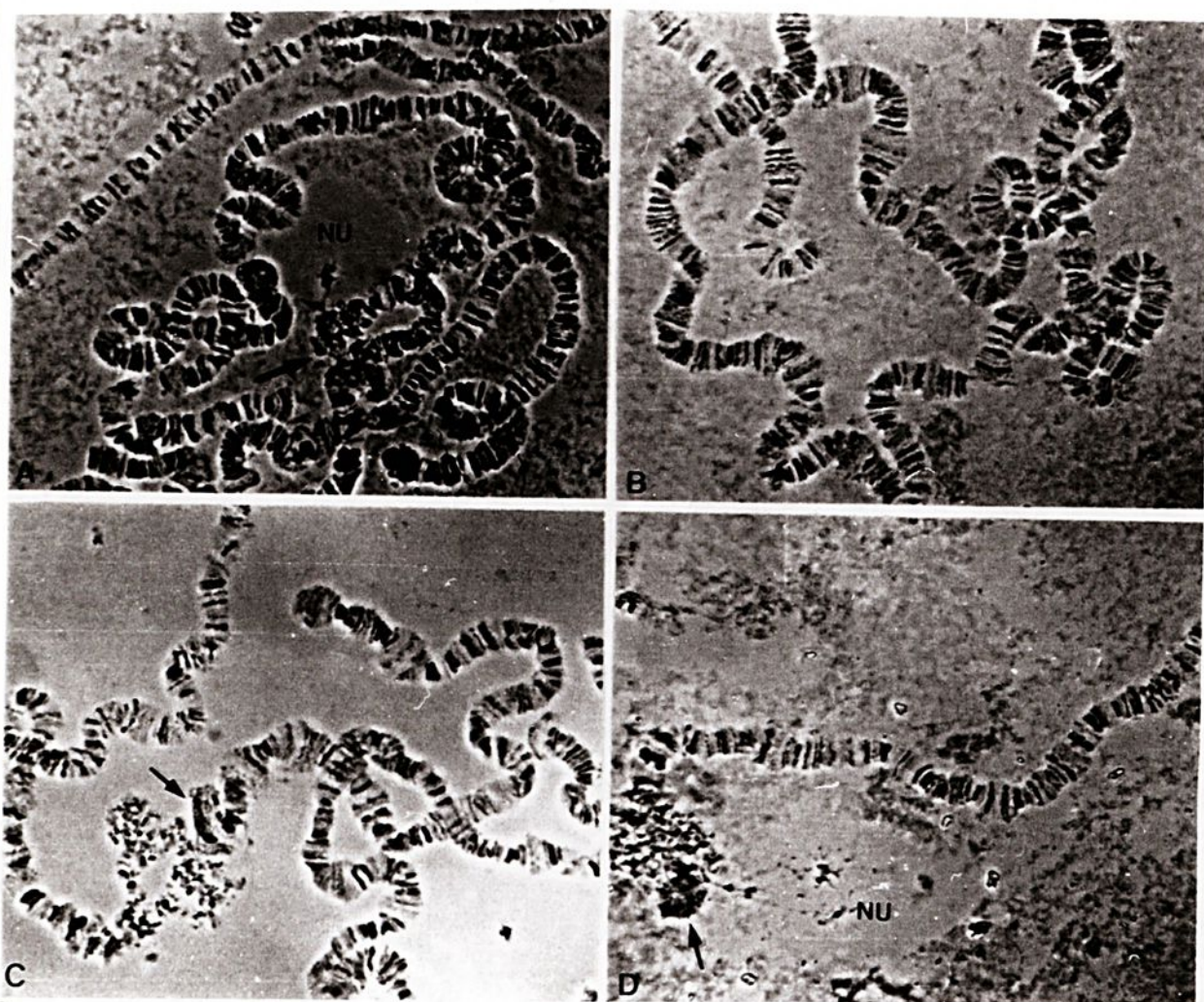


Figura 20. Sinapse nos intracruzamentos. **A.** Fêmea D63. **B.** Macho D62. **C.** Macho D63. **D.** Macho D62. Em **A** a seta indica a região proximal do cromossomo X desemparelhada. Em **B** observar o pareamento completo dos cromossomos. Em **C** e **D** a seta indica os microcromossomos; observar nessas figuras a associação do micro e do cromossomo X e em **D** a associação desses cromossomos ao nucléolo (NU).

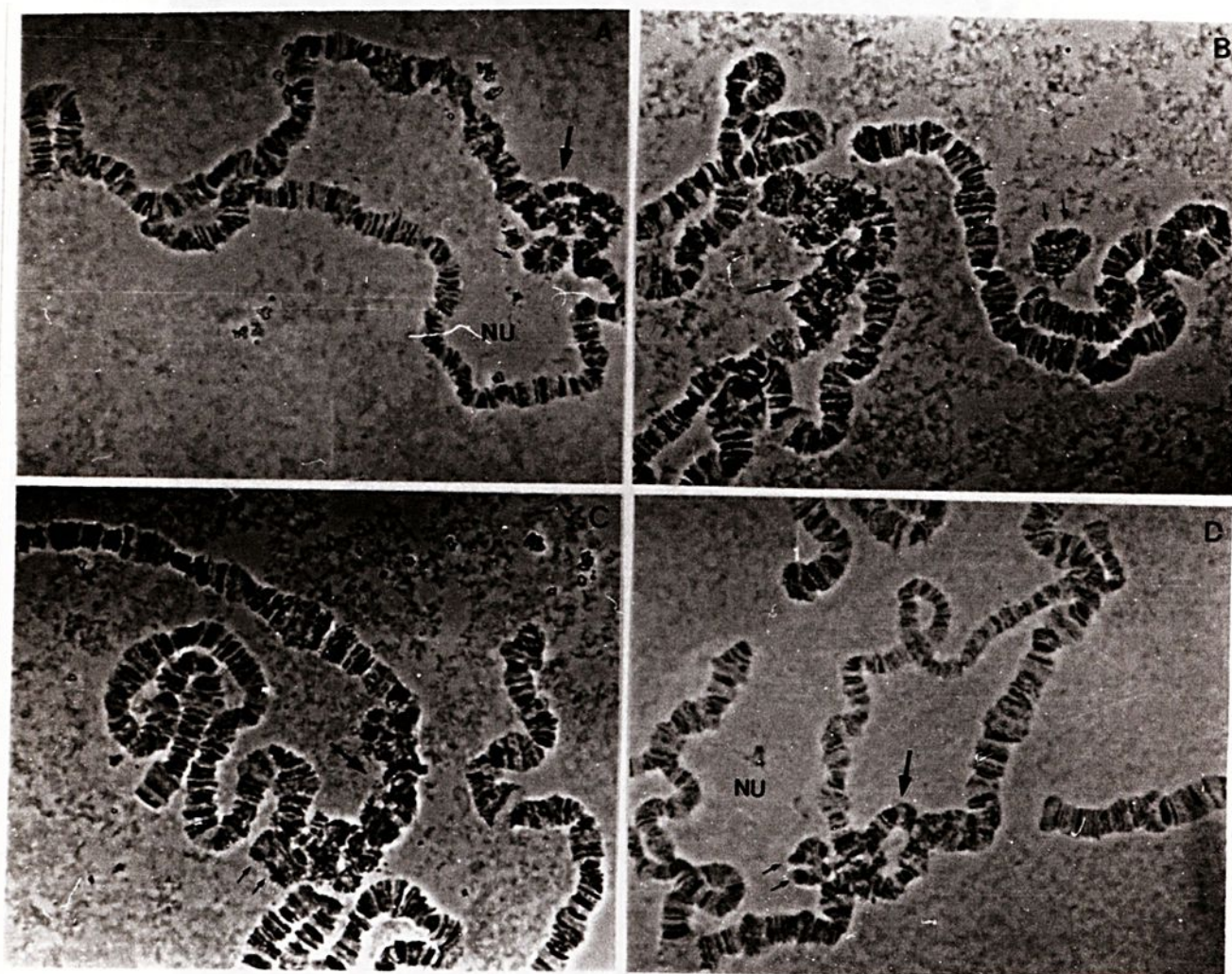


Figura 21. Sinapse nos híbridos provenientes dos inter cruzamentos entre F A95 x M D72 (*D. seriema*). As setas duplas indicam os microcromossomos, os quais estão levemente desemparelhados em A e B, e, completamente em C e D. A seta única mostra o terço proximal do cromossomo X com aspecto heterocromático. Em D esta região mostra um desemparelhamento evidente. NU: nucléolo.

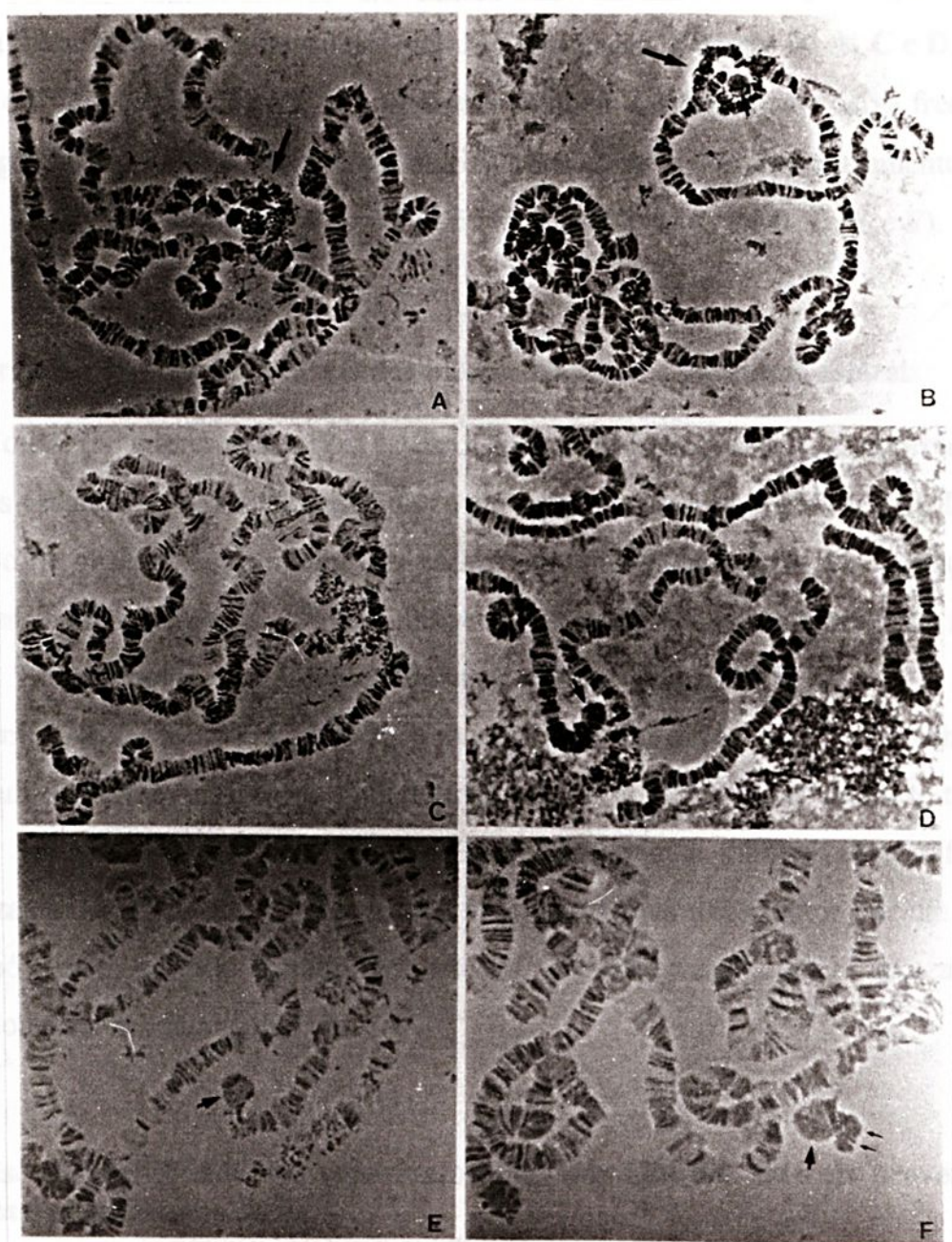


Figura 22. Sinapse nos híbridos provenientes de intercruzamentos entre linhagens classificadas como *D. seriema*. **A-B.** Fêmeas híbridas dos intercruzamentos entre F D40 x M D73. **C-D.** Machos híbridos dos intercruzamentos entre F D72 x M D63, com desemparelhamento da região proximal do cromossomo X. **E-F.** Machos híbridos dos intercruzamentos entre F A95 x M D63. Em A, B, D, E e F as setas pequenas indicam os microcromossomos. Em A e B a seta maior mostra a região proximal do X desemparelhada. Em C observar o pareamento dos cromossomos. Observar um leve desemparelhamento nos microcromossomos das figuras E e F e, um material associado ao micro na figura F (setas duplas).

do terço proximal do cromossomo X e dos microcromossomos, os quais apresentaram uma alta frequência de assinapse nas células analisadas (**Figuras 20 A, C e D, 21, 22 A, B, E e F, 23 C e D e 24 C**). Foi observada também assinapse com baixa frequência na linhagem D63 (**Figura 24 A**) e em outros cromossomos dos intercruzamentos F R5 x M 3B, F D73 x M D40 e F D72 x M A95 (**Figuras 23 A, C, 24 B, D, E e F**).

3. Observação da corte dos casais dos intercruzamentos parentais estéreis

Todos os intercruzamentos estéreis foram avaliados quanto à ocorrência de corte dos casais, período de duração da corte, e se houve cópula (**Tabela 11**). Durante o período de observação, nenhum dos casais copulou, e houve uma alta variação nos diferentes intercruzamentos, na porcentagem dos machos que cortejaram as fêmeas, desde 4 %, observado nos intercruzamentos entre F R5 x M B20, até 44 % nos cruzamentos de fêmeas A95 ou D73 e machos R2. De modo geral, os machos que cortejaram as fêmeas o fizeram mais de uma vez. A duração média da corte também mostrou variação de aproximadamente 30 segundos a 2 minutos, nos diferentes intercruzamentos analisados. Estes casais foram ainda mantidos juntos por um mês, e logo após este período foram descartados. A observação destes cruzamentos evidenciou a esterilidade completa.

4. Análise da mobilidade dos espermatozóides dos híbridos estéreis provenientes dos intercruzamentos de F1

Os machos analisados foram divididos em três classes quanto à mobilidade dos espermatozóides: 1) com abundância de espermatozóides móveis; 2) com poucas “malhas” de espermatozóides móveis; e 3) que não apresentavam espermatozóides móveis.

A análise da mobilidade dos espermatozóides dos machos híbridos provenientes dos intra (D40, A55 e D62) e intercruzamentos (F B50 x M B25, F B25 x M A95, D40 com D63, D62 e A95, nas duas direções; A55 com D63 e R2, nas duas direções e, F D71 x M A55) controles evidenciou pouca ou quase nenhuma mobilidade para a



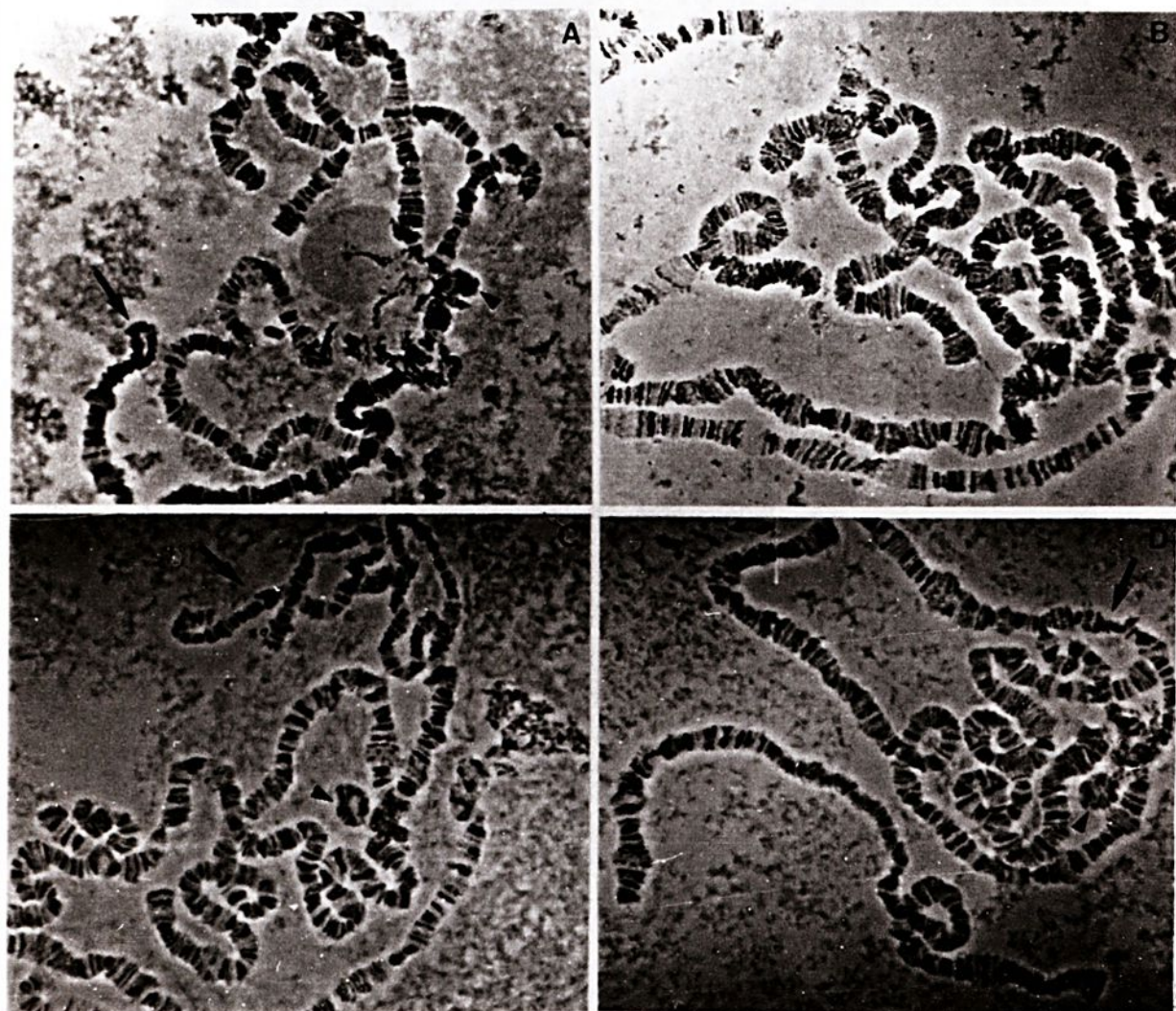


Figura 23. Sinapse nos híbridos provenientes de intercruzamentos. **A.** Machos híbridos dos intercruzamentos entre F R5 x M 3B. **B.** Fêmeas híbridas dos intercruzamentos entre F R5 x M 3B. **C.** Machos híbridos dos intercruzamentos entre F D63 x M R2. **D.** Fêmeas híbridas dos intercruzamentos entre F R2 x M D63. A seta em **A** mostra a extremidade distal do cromossomo II desemparelhada, em **C** o cromossomo IV quase que inteiramente desemparelhado e em **D** o terço proximal do cromossomo X. Em **A**, **C** e **D** as pontas de setas mostram os microcromossomos.

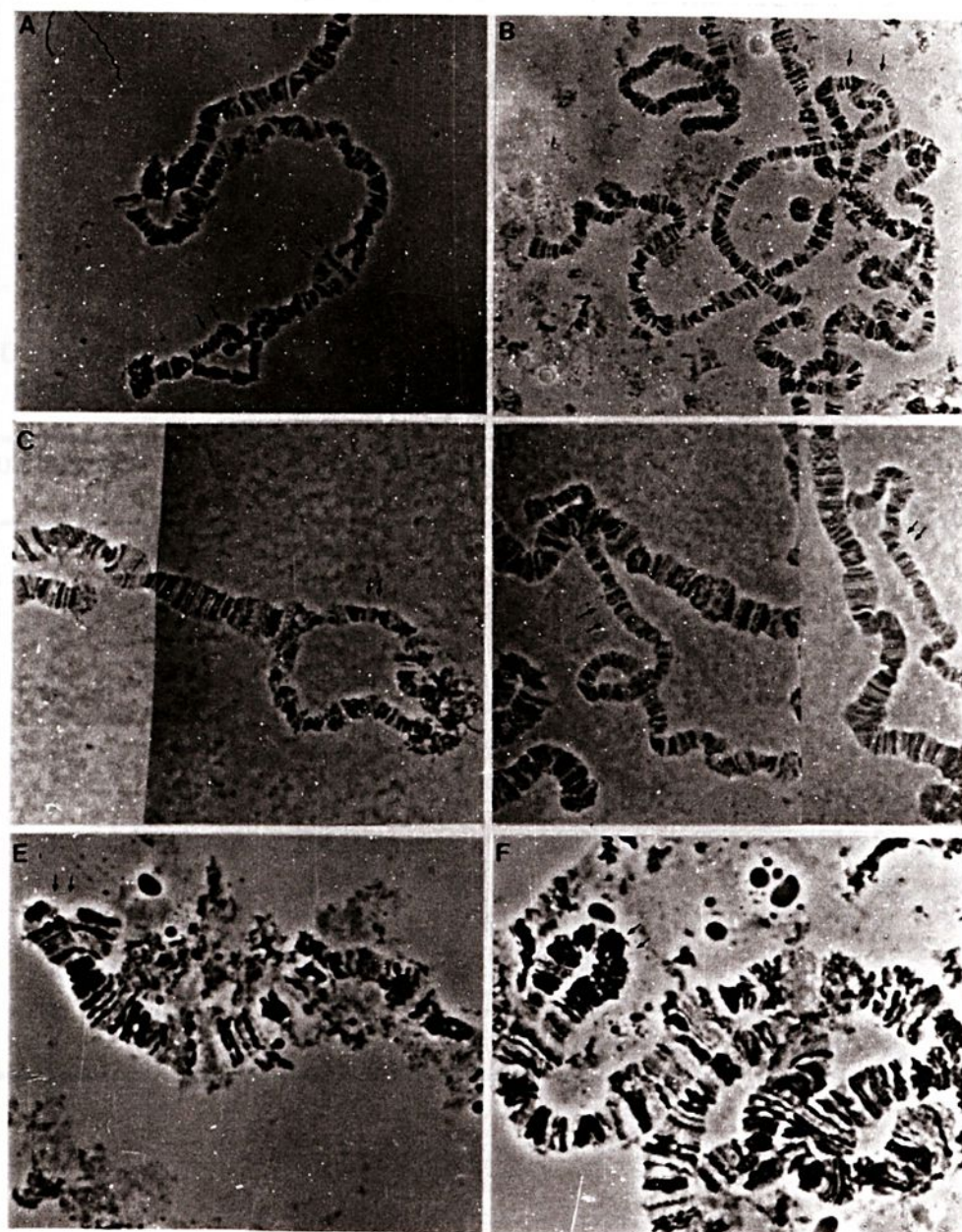


Figura 24. Graus diferentes de assinações observados nos intra e intercrossamentos. **A.** Regiões intermediárias do cromossomo II de D63. **B.** Região intermediária do cromossomo IV do híbrido entre F D73 x M D40. **C.** Região proximal do cromossomo X de fêmea híbrida entre F D72 x M A95. **D.** Cromossomo V de fêmea híbrida entre F D72 x M A95. **E.** Região proximal do cromossomo V do macho híbrido entre F D73 x M D40. **F.** Região proximal do cromossomo II de macho híbrido entre F D73 x M D40. As setas indicam as regiões e cromossomos desemparelhados.

Tabela 11. Duração média em segundos e erro padrão da corte entre os casais em que os cruzamentos foram estéreis e a porcentagem total dos casais em que houve a corte

Cruzamentos			Duração média da corte			Porcentagem de machos que cortejaram as fêmeas
F		M				
A95	x	R2	130,00	±	46,10	44 %
R2	x	A95	46,43	±	8,05	28 %
D62	x	R2	30,30	±	13,60	8 %
R2	x	D62	43,00	±	12,10	12 %
D71	x	R2	39,25	±	3,20	20 %
R2	x	D71	38,00	±	6,72	8 %
D72	x	R2	59,50	±	22,70	12 %
R2	x	D72	34,00	±	6,21	16 %
D73	x	R2	49,90	±	12,00	44 %
R2	x	D73	25,75	±	7,75	8 %
B50	x	R2	53,41	±	9,92	24 %
R5	x	B20	52	±	0,00	4 %
B20	x	R5	28,80	±	5,62	12 %

maioria dos machos observados até o quinto dia de idade, uma mobilidade relativa a partir do sétimo dia, e uma mobilidade ótima por volta do nono dia de idade. Os machos híbridos estéreis resultantes dos seguintes intercruzamentos: F A55 x M D71, F B25 x M B50, e F A95 x M B25 não apresentaram espermatozóides móveis em nenhuma idade.

Em uma revisão do gênero *Leucophaea* (Lacépede, 1804), após Martin et al. (1973) listou 206 locais de hibridação interspecífica no hemisfério e 1 caso de natureza intraespecífica. Outros autores que hibridação interspecífica entre gênero não é possível, em qualquer caso, pelo menos sob as condições artificiais de laboratório (Martin et al., 1973).

Deve ser salientado que as condições de laboratório, por exemplo, de duração de desenvolvimento, podem variar bastante, não sendo diferentes daqueles da natureza, mesmo os resultados desse trabalho não implicam em qualquer dúvida sobre a ocorrência de hibridação na natureza. Além disso, existem, entretanto, poucas informações sobre as condições ou o local onde as espécies (*Leucophaea*) se cruzam e procriam.

Deve ser salientado que as condições de laboratório, por exemplo, de duração de desenvolvimento, podem variar bastante, não sendo diferentes daqueles da natureza, mesmo os resultados desse trabalho não implicam em qualquer dúvida sobre a ocorrência de hibridação na natureza. Além disso, existem, entretanto, poucas informações sobre as condições ou o local onde as espécies (*Leucophaea*) se cruzam e procriam.

1. As linhagens geográficas e suas relações reprodutivas de fertilidade e fecundidade

Algumas das linhagens analisadas no presente estudo foram coletadas em diferentes localidades geográficas: Córrego do Bomfim, A. C. e do Espinheiro é formada por um conjunto de populações locais que constitui o divisor de águas entre a bacia do Rio São Francisco e a Bacia Atlântica, inicia-se na Serra do Ouro Branco,



IV. DISCUSSÃO

É geralmente aceito, que duas populações que estão isoladas geograficamente uma da outra deverão divergir no tempo. O isolamento reprodutivo surge, frequentemente, como subproduto incidental da divergência genética. O isolamento reprodutivo pode surgir da ação de muitos genes pleiotrópicos. Alguns genes são selecionados diferentemente por razões distintas ou resultando de deriva genética podendo ter efeito no isolamento. Alternativamente, a seleção pode atuar diretamente para construir e reforçar as barreiras de trocas gênicas entre as populações cuja hibridação resulta em um desperdício reprodutivo. Será verdadeiramente notável, se toda população alopátrica desenvolver seu isolamento sexual exatamente do mesmo modo e na mesma taxa (Ehrman e Wasserman, 1987).

Em uma revisão do gênero *Drosophila*, Bock (1984, *apud* Marin *et al.*, 1993) listou 266 casos de hibridação interespecífica no laboratório e 8 casos na natureza. Esses dados mostram que hibridação interespecífica neste gênero não é, no todo, um fenômeno raro, pelo menos sob as condições artificiais de laboratório (Marin *et al.*, 1993).

Deve ser enfatizado que as condições de laboratório, por exemplo, de direções de cruzamentos previamente determinadas, são muito diferentes daquelas da natureza, assim os resultados deste trabalho não implicam, em qualquer sentido, que ocorre hibridação na natureza. Eles podem revelar, entretanto, presença de afinidades genéticas ou não entre as espécies (linhagens), e isto é proposto aqui.

1. As linhagens geográficas e suas relações reprodutivas de fertilidade e fecundidade

Algumas das linhagens analisadas no presente estudo foram coletadas em diferentes localidades geográficas da Cadeia do Espinhaço. A Cadeia do Espinhaço é formada por um conjunto de pequenas serras que constitui o divisor de águas entre a Bacia do Rio São Francisco e o Oceano Atlântico. Inicia-se na Serra do Ouro Branco,



ao norte da cidade de Ouro Preto, em Minas Gerais, e estende-se até a porção norte da Bahia. Neste último Estado, recebe a denominação especial de Chapada Diamantina. A vegetação predominante nesta região é a de campos rupestres, associados a outras formações vegetais como cerrados, caatingas, brejos e matas, estas últimas acompanhando geralmente o curso de rios.

A linhagem A95, coletada em 1977 na Serra do Cipó (Cardeal Mota - MG), com tipo morfológico C de edeago (Silva e Sene, 1991), foi classificada como *D. seriema* (Tidon-Sklorz e Sene, 1995b) juntamente com outras linhagens desta área geográfica. A descrição desta espécie teve a corroboração de dados obtidos anteriormente quanto ao estudo da morfologia dos cromossomos metafásicos (Baimai *et al.*, 1983) isolamento reprodutivo (Bizzo, 1983, Madi-Ravazzi, 1988, 1992, Madi-Ravazzi e Bicudo, 1992), padrões de esterases (Lapenta, 1992) e morfometria do edeago (Tidon-Sklorz e Sene, 1995b).

As linhagens D71, D40, D63, D62, D72, D73, R2 e R5 da Cadeia do Espinhaço, analisadas no presente trabalho, não haviam sido estudadas até pouco tempo com relação a nenhum outro marcador biológico, exceto pela morfologia do edeago. Foram classificadas como pertencentes ao tipo C de edeago (Tidon-Sklorz e Sene, 1995b), exceto R2 e R5, inicialmente classificada como tipo B. Kuhn *et al.* (1996) analisaram os cromossomos metafásicos e politênicos de algumas linhagens desta região e com base nas relações cariotípicas e das inversões, estes autores sugeriram uma origem recente para *D. seriema*, segundo os autores, esta espécie parece essencialmente monomórfica e com baixa diferenciação interpopulacional quando comparada com outras espécies do complexo *buzzatii*. Os dados de DNA mitocondrial de Manfrin (1997) mostraram que *D. seriema* é observada como não monofilética, com grande divergência entre as diferentes populações examinadas. Também algumas destas linhagens estudadas no presente trabalho mostraram variação nos parâmetros reprodutivos analisados.

Ao realizarmos cruzamentos entre as linhagens R2 e R5 (previamente classificadas com edeago tipo B) e as linhagens de *D. seriema*, *D. koepferae* e *D. serido* tipo B, verificamos um alto índice de esterilidade que em um primeiro momento



avaliamos como sendo uma diferenciação genética acentuada entre estas linhagens. Entretanto, outros resultados obtidos através do estudo das esterases (Lapenta, 1998), de RAPD (Castro e Madi-Ravazzi, 1998), mostraram que essas linhagens, em relação a esses outros marcadores, estavam mais próximas geneticamente da linhagem 3B de *D. buzzatii*. Assim, resolvemos fazer uma avaliação dos edeagos das linhagens e verificamos que estes são mais semelhantes ao tipo de *D. buzzatii*, o qual denominamos de Z, do que de *D. serido*. A confirmação de que R2 e R5 venham a ser de fato linhagens de *D. buzzatii*, precisa ser suportada com outras análises principalmente em relação às inversões cromossômicas.

A alta fertilidade obtida nos intracruzamentos era um resultado esperado devido à metodologia empregada através de cruzamentos em massa, este tipo de cruzamento aumenta a probabilidade de haver fêmeas receptivas a corte daqueles machos. Também uma fertilidade muito alta, ou muito baixa de alguns cruzamentos podem ser características da linhagem. Merece um estudo mais detalhado o fato de todas as réplicas dos intracruzamentos de D72 terem sido estéreis no 3º período de oviposição e também da réplica número 2 de B20. Também foi observada esterilidade no 2º período de oviposição nos intercruzamentos envolvendo fêmeas D63 e machos A95, ambas linhagens de *D. seriema*. Esterilidade no 2º período de oviposição foi encontrada também nos intercruzamentos de F1 de A95 e D63 e de D72 e D73, em ambas as direções, além de completa esterilidade das réplicas 3 e 4 dos intercruzamentos de F1 de fêmeas D63 e machos A95.

Nos intercruzamentos realizados entre linhagens de espécies ou edeagos diferentes, além de encontrarmos esterilidade em ambas as direções em alguns cruzamentos, foi observada também esterilidade em alguns períodos de oviposição e em uma ou mais réplicas, tanto nos intercruzamentos parentais, como nos intercruzamentos de F1 correspondentes.

Do total de 54 intercruzamentos parentais realizados, 13 foram estéreis, mostrando isolamento reprodutivo completo. Destes, 10 foram entre a linhagem R2 e linhagens de *D. seriema*, 2 foram entre a linhagem R5 e a linhagem B20 (*D. koepferae*) e um entre fêmeas B50 (*D. serido* tipo B) e machos R2.



Três inter cruzamentos de F1 foram estéreis, todos eles com linhagens de espécies diferentes, F A55 x M D71 (F *D. serido* B x M *D. seriema*), F A95 x M B25 (F *D. seriema* x M *D. koepferae*) e, F B25 x M B50 (F *D. koepferae* x M *D. serido* B).

Mais de 50 % dos inter cruzamentos interespecíficos foram férteis, demonstrando as relações de proximidades das linhagens estudadas, embora com certa variação na fertilidade e fecundidade de seus cruzamentos. Isto já havia sido verificado em outros trabalhos em espécies deste *cluster* (Moraes, 1992, Marin *et al.*, 1993, Madi-Ravazzi *et al.*, 1997). O rompimento das barreiras de isolamento em experimentos de laboratório tem sido obtido com certa frequência em alguns grupos de espécies (Singh & Chartterjee, 1987, Carracedo *et al.*, 1998), embora a fertilidade, nestes casos, muitas vezes mostre-se reduzida quando comparada com a dos parentais (Madi-Ravazzi *et al.*, 1997).

O maior número de inter cruzamentos estéreis foram obtidos com a linhagem R2 (edeago tipo Z) e linhagens de *D. seriema* (edeago tipo C). Diversos trabalhos já haviam demonstrado que *D. buzzatii*, *D. borborema*, *D. serido* (tipos A, B, D de edeago e *D. seriema*) estão geneticamente isoladas uma das outras. *D. koepferae* é potencialmente capaz de troca gênica, em experimentos de laboratório, com as espécies alopátricas do Brasil, *D. borborema* e *D. serido* (Wasserman, 1992). O ancestral do *cluster buzzatii* pode ter sido uma espécie adaptada a uma grande variedade de cactos que invadiram a maioria das zonas áridas geradas durante a transição Plioceno-Pleistoceno na América do Sul. Depois, *Drosophila buzzatii* e *Drosophila serido* podem ter se diferenciado em resposta a um isolamento produzido pela restrição da distribuição dos cactos nos períodos menos áridos. A presente distribuição pode ser o resultado de contactos secundários entre estas espécies nos períodos áridos pós-glaciais (Ruiz *et al.*, 1982).

Um resultado interessante foi a hibridação experimental encontrada entre as linhagens D63 (*D. seriema*) e R2 (*D. buzzatii*?), já que o mesmo não ocorreu quando a linhagem R2 foi cruzada com as outras linhagens de *D. seriema*. Este fato pode ser devido a uma variação intraespecífica em *D. seriema*, com relação à compatibilidade reprodutiva com *D. buzzatii*.



Madi-Ravazzi *et al.* (1997) avaliando a compatibilidade reprodutiva entre espécies do *cluster buzzatii* também verificaram alta cruzabilidade entre linhagens de espécies diferentes, com graus variados de fertilidade dependendo das linhagens utilizadas. Foi encontrada alta fertilidade nos intercruzamentos de machos de *D. seriema* (A95) e fêmeas de *D. serido* (B59Q1-Petrolina, PE), fertilidade moderada com as linhagens B50, A55 e B31 (as mesmas utilizadas no presente estudo). Os intercruzamentos de fêmeas de qualquer uma dessas linhagens com a linhagem B25 de *D. koepferae* foram férteis, mas diferentes, significativamente, de pelo menos um dos intracruzamentos parentais. Estes autores verificaram ainda um maior grau de isolamento na linhagem B20 que na B25, ambas de *D. koepferae*. No presente trabalho, encontramos esterilidade completa nos intercruzamentos de B20 com R5, em ambas as direções.

No trabalho de Marin *et al.* (1993) sobre as relações reprodutivas entre espécies do *cluster buzzatii*, também foi verificada a produção de híbridos em 10 de 12 combinações interespecíficas e, em 5 casos, as fêmeas F1 foram parcialmente férteis. Diferentes linhagens geográficas de *D. koepferae* mostraram diferenças de produtividade quando intercruzadas com uma linhagem de *D. serido* da Bahia. Foram obtidos poucos híbridos quando machos de *D. buzzatii* foram cruzados com *D. koepferae* e *D. serido* e nenhum descendente foi produzido quando fêmeas de *D. buzzatii* foram testadas.

Nossos resultados concordam com os de Marin *et al.* (1993) em relação às diferenças reprodutivas entre *D. koepferae* e *D. seriema*. Também os intercruzamentos entre as linhagens R2 e R5, provavelmente linhagens de *D. buzzatii*, segundo a semelhança de edeago, e a maioria das linhagens de *D. seriema* e com *D. koepferae* foram estéreis em ambas as direções. E ainda, os intercruzamentos entre fêmeas B50 (*D. serido* B) e machos R2 também foram estéreis. No entanto, os recíprocos foram férteis, entretanto Marin *et al.* (1993), avaliando cruzamentos entre linhagens diferentes das utilizadas no presente estudo para estas espécies, encontrou fertilidade inversa na direção do cruzamento, ou seja, fêmeas de *D. buzzatii* com machos de *D. serido*. Neste mesmo ponto nossos dados concordam parcialmente com os de Madi-



Ravazzi *et al.* (1997), em que *D. buzzatii* foi completamente estéril quando cruzada com *D. serido*. Em nosso trabalho também a linhagem A55 de *D. serido* B foi fértil quando cruzada com as linhagens R2 e R5.

A análise realizada através dos gráficos *box-plot*, efetuada separadamente por sexo nos três períodos de oviposição e total, mostrou alguns agrupamentos para as produtividades dos intracruzamentos de linhagens de localidades diferentes, destacando uma maior produtividade para a linhagem D73, a qual também apresentou uma homogeneidade entre as réplicas e um menor valor de erro padrão. As menores produtividades foram obtidas nas linhagens de D63 (*D. seriema*) e B31 (*D. serido* tipo D). A linhagem R2 foi a única que apresentou produtividade constante nos três períodos de oviposição. Um maior grau de variância foi observado no 2º período de oviposição e a avaliação da produtividade média no 3º período de oviposição mostrou para a maioria das linhagens uma queda no número total de descendentes e também na variância. Foi verificado também que o perfil de variação intraespecífico é o mesmo para os descendentes fêmeas, machos e total.

Quanto aos perfis de erro padrão ao longo dos períodos de oviposição foi observado que as linhagens do tipo B de edeago (A55 e B50), tipo Z de edeago (R2, R5 e 3B) e tipo D (B31), mostraram perfis semelhantes, e que as linhagens D62 (tipo C) e B20 (tipo E) foram as que apresentaram os maiores valores de erro padrão e as maiores variações intraespecíficas.

A análise descritiva da fecundidade dos intercruzamentos entre linhagens de *D. seriema* mostrou uma alta porcentagem de intercruzamentos com produtividade semelhante à de ambos os intracruzamentos parentais, e o restante dos intercruzamentos em situações de maior ou menor produtividade que pelo menos um ou ambos os intracruzamentos parentais. Esses achados, somados às observações de uma maioria de intercruzamentos recíprocos que foram semelhantes em suas produtividades e também da análise da produtividade dos intercruzamentos de F1 que, em aproximadamente 50 % dos casos, foram semelhantes ao dos intercruzamentos parentais, mostraram que estas linhagens são altamente compatíveis em relação à sua cruzabilidade. Entretanto, alguns casos merecem destaque, como por exemplo, os



intercruzamentos entre F D40 x M A95, F A95 x M D73, F D62 x M D40 e F D72 x M D73 os quais mostraram-se semelhantes em suas produtividades quando comparados com os intra parentais, entre os seus recíprocos e entre a produtividade deles e de seus respectivos intercruzamentos de F1. Além disto, as linhagens D40 e D63, embora pouco produtivas em seus intracruzamentos, quando intercruzadas mostraram uma produtividade maior que ambos os intracruzamentos parentais. Os intercruzamentos que foram mais produtivos que pelo menos um intracruzamento parental envolveram ou D40 ou D63. Nenhum dos intercruzamentos com médias de produtividade semelhantes a ambos os intracruzamentos parentais envolveram a linhagem D63. A única combinação de intercruzamentos recíprocos, semelhantes entre si, envolvendo D63, foi aquela em que esta linhagem foi cruzada com D40. Os recíprocos que apresentaram diferenças quando comparados entre si envolveram os cruzamentos das linhagens A95 com D63, D71 e D72, e da linhagem D63 com D72.

A avaliação da produtividade dos intercruzamentos entre espécies ou edeagos diferentes mostrou uma porcentagem maior de cruzamentos menos férteis que pelo menos um ou ambos os parentais, refletindo a existência de incompatibilidades entre os genomas híbridos.

Os genes de um determinado conjunto são produtos de uma longa história seletiva para uma interação ótima, esperando-se assim uma redução drástica da adaptabilidade em cruzamentos interpopulacionais. Como as diferenças genotípicas que causam distribuição diferencial para a geração seguinte dependem não somente dos efeitos diretos dos genes destacados em cada estudo, mas também dos efeitos dos outros genes do genoma e do ambiente no qual a espécie vive, um dado gene pode ter efeito imediato, que em conjunção com outros genes podem afetar direta ou indiretamente um grande número de traços fenotípicos. Esses traços, em combinação com as circunstâncias ambientais, afetam a habilidade do organismo para sobreviver e reproduzir-se, mais ou menos, no futuro, ou em uma localidade diferente (Dobzhansky *et al.*, 1968).

No caso em que os híbridos obtiveram fertilidade superior a pelo menos um dos parentais, o que pode ter ocorrido é a interação harmônica entre os complexos gênicos.



Tal interação é dita, pela heterozigose estrutural das inversões, efeito heterótico, que é decorrente da interação dos complexos poligênicos, protegidos da desintegração pelo *crossing-over*. E a baixa fertilidade observada nesses híbridos pode ser explicada pelo desarranjo de complexos gênicos dos híbridos.

2. O Isolamento sexual

Os mecanismos de isolamento são usualmente classificados em dois grupos, pré-zigóticos e pós-zigóticos. A observação da corte dos casais dos cruzamentos estéreis mostrou que o isolamento reprodutivo nesses cruzamentos é pré-zigótico, pois não houve cópula entre os casais.

Como já mencionado, todos os intercruzamentos estéreis envolveram as linhagens R2 e R5 e linhagens de *D. seriema*, *D. serido* B e *D. koepferae*. O único isolamento pré-zigótico assimétrico foi observado entre B50 e R2. Entretanto, os cruzamentos entre A55 (a outra linhagem de *D. serido* B) com R2 e R5 foram férteis, mostrando que as fêmeas desta linhagem, diferentemente de B50, não discriminaram os machos de R2, como também de R5, o que é indicativo da variação, quanto a esse aspecto, entre essas linhagens de mesmo tipo de edeago.

Kelly & Noor (1996) assumiram que os machos cortejam as fêmeas indiscriminadamente, e que uma fêmea aceita a tentativa de corte baseada no seu genótipo e no genótipo do macho que a corteja. Para esses autores fêmeas híbridas F1 têm genótipos balanceados, porque os *loci* dos autossomos e dos cromossomos sexuais são heterozigotos. Contudo, nos machos, o desbalanço é inevitável porque existe apenas uma cópia gênica nos *loci* ligados ao sexo.

3. A esterilidade do macho híbrido

O isolamento pós-zigótico é um importante aspecto da especiação em *Drosophila*, evoluindo na mesma proporção que a discriminação para o acasalamento, quando duas populações tornam-se geograficamente isoladas, independente do mecanismo pelo qual o isolamento surgiu (Coyne & Orr, 1989).



A esterilidade do macho híbrido é o isolamento reprodutivo pós-zigótico mais comum entre espécies animais muito relacionadas e, portanto, tem recebido especial atenção nos estudos de especiação (Zeng & Singh, 1995).

Em todos os três intercruzamentos de F1 estéreis observados no presente trabalho foi verificado que a esterilidade era dos machos, através de retrocruzamentos realizados por Castro *et al.* (1996). Além disso, a análise da mobilidade dos espermatozóides desses machos híbridos, realizada por esses autores, mostrou que estes gametas são imóveis em todas as idades testadas. Os três intercruzamentos de F1 estéreis foram entre linhagens de espécies alopátricas, F A55 x M D71 (F *D. serido* B x M *D. seriema*), F A95 x M B25 (F *D. seriema* x M *D. koepferae*) e, F B25 x M B50 (F *D. koepferae* x M *D. serido* B).

Bizzo (1983), como nós, mostrou isolamento pós-zigótico entre populações alopátricas de *Drosophila*. Ele mostrou que o intercruzamento massal entre linhagens isofêmeas de A95 e a linhagem B53Q5 (de Milagres, BA) produziu machos estéreis e fêmeas férteis em ambas as direções de cruzamentos.

Um outro exemplo de espécies alopátricas que evoluíram um isolamento pós-acasalamento sem isolamento pré-acasalamento é o estudo de Wasserman e Richardson (1987) nas espécies *D. borborema*, *D. buzzatii* e *D. serido*. Estes pesquisadores observaram que as populações brasileiras de *D. borborema* estão completamente isoladas de *D. buzzatii* e *D. serido* do Brasil, mas produzem fêmeas férteis e machos estéreis em cruzamentos recíprocos com *D. koepferae* da Argentina. Ambos cruzamentos recíprocos entre as duas formas alopátricas, de *D. serido* e *D. koepferae*, produzem fêmeas férteis. Contudo, quando fêmeas de *D. serido* são usadas os machos originados são estéreis, enquanto que no cruzamento recíproco a prole de macho é fértil. Já em nossos dados, como mencionado acima, quando fêmeas *D. koepferae* foram cruzadas com machos *D. serido* B, os machos originados foram estéreis, enquanto que no cruzamento recíproco a prole de macho foi fértil.

A regra de Haldane (1922) propõe que em casos de inviabilidade e esterilidade híbrida unissexual, o sexo heterogamético é o mais afetado (Johnson *et al.*, 1993). Diversos autores propuseram modelos para explicar a regra de Haldane (Charlesworth



et al., 1987, Coyne e Orr, 1989, Hollocher e Chung-I, 1996). Aparentemente, a esterilidade do macho híbrido em *Drosophila* evolui muito mais rápido do que a inviabilidade do híbrido ou a esterilidade da fêmea quando espécies ligadas são comparadas (Hollocher e Chung-I, 1996). Contudo, parece que o isolamento sexual pode algumas vezes evoluir mais rápido que a esterilidade do macho híbrido, como observado no trabalho de Hollocher *et al.* (1997).

Diversos estudos têm invariavelmente mostrado que o cromossomo X tem o maior papel na esterilidade do macho híbrido (Coyne e Orr, 1989). O cromossomo X, é claro, não causa a esterilidade do macho híbrido por si só, ele exerce seu efeito pela interação com genes de outras espécies. Os genes, que interagem com o cromossomo X heteroespecífico, podem estar nos autossomos, no cromossomo Y ou citoplasma (nos casos em que as fêmeas são heterogaméticas). Dentre as três possibilidades, as interações X-autossomos e X-Y, são as duas hipóteses mais frequentemente discutidas, propostas para a base genética da regra de Haldane (Coyne e Orr, 1989, Zouros, 1989).

Dos quatro tipos possíveis de incompatibilidades cromossômicas, a incompatibilidade X-autossomos parece ser mais prevalente do que a autossomos-autossomos nos estudos de esterilidade de machos híbridos. Além disso, existe apenas um caso conhecido de incompatibilidade autossomos-autossomos causando a esterilidade do macho híbrido (Schafer, 1978). Contudo, este fato pode ser devido às incompatibilidades envolvendo os cromossomos sexuais serem mais facilmente detectadas que as incompatibilidades autossomos-autossomos (Lamnissou *et al.*, 1996).

Carvajal *et al.* (1996) demonstraram incompatibilidade cromossômica X-autossomos nos híbridos entre *D. koepferae* e *D. buzzatii*. Neste estudo os machos híbridos F1 de cruzamentos entre fêmeas *D. koepferae* e machos *D. buzzatii* foram viáveis. No entanto, híbridos retrocruzados, introgrididos com o segmento hmi-1 ou hmi-2 do cromossomo X de *D. koepferae*, em *D. buzzatii* foram inviáveis. Portanto, na análise da maioria dos cromossomos X de *D. koepferae* foram encontradas apenas estas duas regiões que causam a inviabilidade do macho. Quando elas são introgrididas separadamente em *D. buzzatii*; aparentemente a introgressão do resto do



cromossomo X não tem efeito. Este estudo também localizou dois fatores autossômicos de *D. koepferae* que não permitem que os machos híbridos introgrididos com hmi-1 sejam estéreis, constituindo um sistema de três componentes complementares interagindo entre si.

Na análise da esterilidade híbrida no grupo de *D. virilis*, Orr e Coyne (1989) avaliaram a mobilidade dos espermatozoides na F1 de *D. virilis* e *D. texana*. Eles encontraram que a taxa de imobilidade era de 0,05 para machos com o cromossomo Y de *D. virilis* e 0,34 para machos com o cromossomo Y de *D. texana*, um resultado consideravelmente similar aos de Lamnissou *et al.* (1996) com o mesmo grupo de espécies.

Alguns autores descreveram genes relacionados à esterilidade do macho. Eberhart *et al.* (1996) realizaram a clonagem e a caracterização do gene *boule* no cromossomo Y de *Drosophila* e demonstraram que a perda da função *boule* resulta em azoospermia; as divisões meióticas são bloqueadas, embora ocorra limitada diferenciação espermatídica. Foi verificado também, através da análise do RNA, que a expressão de *boule* é limitada aos testículos.

A esterilidade do macho de *D. melanogaster* pode estar relacionada com pelo menos cinco loci de um gene, o *ms* (1) T^+ , localizado no cromossomo X. Geer *et al.* (1979), estudaram a esterilidade de machos de *D. melanogaster* e verificaram que os espermatozoides mutantes *ms* (1) T^+ embora sejam capazes de penetrar no ovo não podem completar a fertilização.

4. O grau de sinapse nos cromossomos politênicos

A análise citogenética dos cromossomos politênicos dos híbridos evidenciou que o emparelhamento cromossômico é semelhante ao dos intracruzamentos, isto é, ocorre sinapse completa em toda a extensão cromossômica, exceto em alguns cruzamentos, nos quais foram observados desemparelhamentos nos microcromossomos e nas extremidades proximais dos cromossomos X.



Kuhn *et al.* (1996) observaram que os cromossomos politênicos dos híbridos provenientes dos cruzamentos entre fêmeas *D. seriema* e machos *D. borborema* mostraram bom pareamento, exceto nas regiões proximais de todos os cromossomos, onde foi detectada uma pequena diferença de bandamento. Estes autores não encontraram qualquer outra inversão nos outros cromossomos, além da inversão fixada $2e^8$. No entanto, a região proximal final do cromossomo X foi difícil de analisar devido à definição pobre das bandas e das frequentes assinapses observadas nesta região. Como esperado por estes autores, os cromossomos X, 4 e 5 foram homossequenciais, por outro lado, nos híbridos, o cromossomo 3 mostrou uma pequena inversão.

Esta baixa variabilidade cromossômica encontrada é comum nas áreas áridas de caatinga, de onde originaram nossos estoques. Foram relatadas nesta área, outras populações monomórficas de *Drosophila*, como *D. paranaensis* (Sene e Santos, 1988), *D. willistoni* (Da Cunha e Dobzhansky, 1954, *apud* Sene e Santos, 1988), e *D. mercatorum* (Sene, 1986).

A alta frequência de assinapses observadas no presente trabalho nos cromossomos X e microcromossomos dos híbridos provenientes dos intercruzamentos de *D. seriema* e de intercruzamentos interespecíficos pode refletir a homologia entre esses cromossomos devido à hipótese de uma origem comum para eles.

Em *Scaptodrosophila lebanonensis*, que não possui microcromossomos, foi verificado por hibridação *in situ*, que os genes dos microcromossomos de *D. melanogaster* e *D. virilis* estão intimamente ligados ao cromossomo X de *S. lebanonensis*. Estes autores sugerem uma fusão X-microcromossomo em *S. lebanonensis*, um possível caminho na evolução dos microcromossomos. A fusão X-microcromossomo é provavelmente ancestral nas espécies do grupo *victoria*, ao qual *S. lebanonensis* pertence (Papaceit e Juan, 1998).

Muitos trabalhos têm demonstrado que híbridos interespecíficos de *Drosophila* apresentam emparelhamento cromossômico incompleto em comparação com o emparelhamento cromossômico dentro da espécie (Cordeiro, 1968, Evgen'ev, 1971, Bicudo, 1979, Madi-Ravazzi, 1992, Madi-Ravazzi e Bicudo, 1992, Madi-Ravazzi *et al.*, 1997).



Madi-Ravazzi e Bicudo (1992) e Madi-Ravazzi *et al.* (1997) encontraram correlação positiva entre grau de assinapse nos híbridos e isolamento reprodutivo pós-zigótico entre linhagens das espécies de *D. serido*, *D. seriema* e *D. buzzatii*. Estes trabalhos detectaram diferenças no padrão de bandas da região proximal dos cromossomos politênicos 2, 3 e X, e um alto grau de assinapse nos híbridos. Mostraram também que o menor grau de sinapse foi o apresentado nos híbridos entre *D. koepferae* e *D. buzzatii*, *D. seriema* e *D. koepferae*, e *D. koepferae* e *D. serido*. Estas espécies também exibiram o menor grau de compatibilidade reprodutiva. Os híbridos entre *D. seriema* e *D. serido* mostraram um grau intermediário de sinapse (pareamento ausente nas extremidades proximal e distal dos cromossomos), bem como fertilidade maior do que a encontrada em outros cruzamentos interespecíficos.

A análise dos cromossomos politênicos dos híbridos provenientes de cruzamentos entre linhagens de espécies diferentes, como por exemplo, *D. buzzatii* (?) (R2) x *D. seriema* (D63) não evidenciou o grau de desemparelhamento observado por Madi-Ravazzi *et al.* (1997) para híbridos provenientes de intercruzamentos entre outras linhagens destas espécies.

O trabalho de Perje (1955), que estudou a assinapse dos cromossomos das glândulas salivares em 10 linhagens de *D. funebris* e em 9 cruzamentos com uma linhagem denominada L, observou que a assinapse no cromossomo X foi maior nos cruzamentos do que nas linhagens “puras”. E estava principalmente localizado na região heterocromática proximal. Os autossomos mostraram íntimo pareamento nos dois casos. Usualmente as regiões heterocromáticas são consideradas ter pareamento não homólogo. A parte heterocromática proximal do cromossomo X de *D. funebris* tem mostrado ter tendências diferentes de pareamento em cruzamentos entre diferentes linhagens. Este fato pode explicar as diferenças encontradas entre este trabalho e o de Madi-Ravazzi *et al.* (1997). Essas diferenças podem significar variação nas regiões heterocromáticas dos cromossomos entre as linhagens utilizadas por Madi-Ravazzi *et al.* (1997) e as utilizadas neste trabalho.

O trabalho de Berendes (1963) investigou o fenômeno da assinapse nos cromossomos das glândulas salivares de *Drosophila hydei*. A frequência de assinapse



foi muito mais alta no cromossomo X do que em qualquer um dos autossomos. Nos híbridos entre os estoques selvagens de diferentes origens geográficas uma superficial frequência mais alta de assinapse foi encontrada quando comparada aos estoques selvagens. Este autor também detectou que não houve sucesso na revelação de assinapse específica em híbridos entre populações distantes geograficamente. Este trabalho concorda plenamente com nossos resultados, onde também encontramos assinapse principalmente no cromossomo X, tanto nos intracruzamentos como nos híbridos, não havendo assinapse específica dos híbridos.

Segundo Michailova (1987) a perda do emparelhamento homólogo nos híbridos é a primeira diferença visível entre populações que evoluem independentemente. Por outro lado, nem todas as espécies diferem em seus cariótipos. Somente no gênero *Drosophila* tem-se evidência da existência de alguns exemplos em que 2 a 5 espécies próximas têm cariótipo que são indistinguíveis nos cromossomos politênicos das glândulas salivares, sendo o padrão de bandas precisamente o mesmo. Carson *et al.* (1967) descreveram muitos grupos de espécies hawaianas com padrões de bandas idênticos nos cromossomos politênicos e introduziram o termo *complexos homossequenciais* para tais grupos. Muitas das espécies hawaianas homossequenciais são estritamente diferentes no fenótipo externo e suas relações filogenéticas não foram suspeitadas antes de terem sido estudadas citologicamente. Não é certo, entretanto, se todas as espécies homossequenciais têm precisamente a mesma distribuição de DNA satélite em seus segmentos heterocromáticos, ou até mesmo, a mesma quantidade e distribuição de heterocromatina, a qual não pode ser facilmente analisada nos cromossomos politênicos. De fato, Ward e Heed (1970) mostraram que duas espécies mexicanas de *Drosophila*, consideradas homossequenciais, diferem em seus segmentos heterocromáticos. Por outro lado, espécies como *Drosophila simulans* e *Drosophila melanogaster* que têm uma distribuição semelhante da eucromatina e heterocromatina diferem quanto aos tipo de DNA satélite (Peacock e Lohe, 1982).

A existência dos complexos homossequenciais deixa claro que rearranjos cromossômicos não são um elemento *sine qua non* para a especiação. Não obstante, complexos homossequenciais são muito raros em *Drosophila* e não têm sido



encontrados em todas as numerosas espécies com cromossomos politênicos, da ordem Diptera (*Sciara*, *Rhynchosciara*, *Simulium*, *Prosimulium*, *Twinnia*, *Gymnopaia*, *Anopheles*, *Chironomus*, *Polypedilum*).

5. Considerações finais

A avaliação da capacidade reprodutiva entre as linhagens de *D. seriema* identificou a linhagem D63 de Mucugê-Ba com uma diferenciação mais acentuada que as demais, tanto pela sua baixa produtividade em laboratório quanto pelos resultados obtidos nos intercruzamentos realizados com as outras linhagens. Destaca-se o fato de ter sido a única linhagem de *D. seriema* que foi fértil quando intercruzada com a linhagem R2 (*D. buzzatii*?).

Verificamos que existe um isolamento reprodutivo maior entre as linhagens R2 e R5 e as demais espécies estudadas; se for confirmado que estas linhagens são de *D. buzzatii*, este fato é concordante com resultados obtidos anteriormente.

As duas linhagens de *D. serido* B de localidades geográficas distintas, avaliadas, mostraram-se diferentes quanto aos aspectos reprodutivos. A linhagem A55 de Bela Vista-MS foi receptiva aos machos das linhagens de R2 e R5 e seus cruzamentos foram férteis, enquanto B50 de Milagres-BA, apresentou isolamento assimétrico com R2.

Todos os intercruzamentos estéreis entre linhagens de espécies diferentes apresentaram isolamento pré-zigótico, pois não foi verificada a ocorrência de cópula entre os casais.

Ao avaliarmos a esterilidade de alguns intercruzamentos de F1 verificamos que os machos híbridos foram estéreis e ainda que os espermatozoóides destes machos não apresentaram mobilidade em nenhuma idade testada.

A análise citogenética dos cromossomos politênicos dos híbridos evidenciou que o emparelhamento cromossômico é semelhante ao dos intracruzamentos, i.e., ocorre sinapse completa em toda a extensão cromossômica, exceto nos microcromossomos e nas extremidades proximais dos cromossomos X.



V. RESUMO E CONCLUSÕES

A análise da compatibilidade reprodutiva de linhagens geográficas é uma importante fonte de informação para o *status* evolutivo da espécie à qual a linhagem pertence. No presente trabalho, linhagens de *Drosophila serido* (tipos B e D), *D. seriema*, *D. koepferae* e *D. buzzatii* (grupo *repleta*, subgrupo *mulleri*, *cluster buzzatii*) e seus híbridos foram analisados quanto as suas compatibilidades reprodutivas (fertilidade e fecundidade) e grau de sinapse nos cromossomos de glândulas salivares.

No geral, as linhagens foram altamente férteis nos intracruzamentos. Foram observadas diferenças quanto à fertilidade em intracruzamentos e intercruzamentos de linhagens pertencentes à mesma espécie. A fecundidade do intracruzamento de D63M foi significativamente menor do que qualquer outra linhagem de *D. seriema* e D63M foi também a única linhagem desta espécie que foi fértil em cruzamentos com D69R2 (linhagem de *D. buzzatii*?). Outro caso foi relacionado às linhagens geográficas B50Q3 e A55F11, ambas classificadas como *D. serido* tipo B, mas exibindo comportamento diferente. As fêmeas da linhagem A55F11 foram receptivas a machos de D69R2 e D69R5 (linhagens de *D. buzzatii*?), e o cruzamento foi fértil. Por outro lado, B50Q3 mostrou isolamento assimétrico quando intercruzada com as mesmas linhagens.

As linhagens D69R2 e D69R5 (linhagens de *D. buzzatii*?) foram completamente estéreis nos intercruzamentos com linhagens de *D. seriema*. A análise da corte mostrou que mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos operam nesses casos.

Também foi detectada esterilidade dos machos híbridos F1 provenientes de cruzamentos envolvendo *D. serido* B (A55F11) x *D. seriema* (D71C1BM), *D. seriema* (A95F3) x *D. koepferae* (B25D7) e *D. koepferae* (B25D7) x *D. serido* B (B50Q3).

Nos intracruzamentos foi observada sinapse completa dos cromossomos politênicos. Em alguns intracruzamentos e intercruzamentos foram observadas assinapses no microcromossomo (VI) e na região proximal do cromossomos X.



A morfologia do edeago é um bom caráter para definir grupos que correspondem à espécies biológicas, contudo, a divergência intraespecífica exibida em algumas linhagens e outros resultados obtidos neste estudo, como a compatibilidade reprodutiva e pareamento cromossômico, mostraram que estes e outros marcadores têm similar importância devido à complexidade do processo de especiação.

In general, the males were highly fertile in intercrosses. Differences in fertility were observed in lines and intercrosses of males belonging to the same species. Intercross D6982 was significantly lower than that of every other *D. sericeus* strain and D6984 was also the only strain of this species that was fertile in crosses with D6983 (*D. obscura* strain). Another case was related to geographic strains B5003 and A35F11, both classified as *D. obscura* type B, but exhibiting different behaviors. The female from strain A35F11 were receptive to males of D6982 and D6985 (71 random strains), and the cross was fertile. On the other hand, strain B5003 showed reciprocal isolation when intercrossed with the same strains.

Strains D6982 and D6985 (*D. obscura* strain) were completely fertile in intercrosses with males of *D. sericeus*. The analysis of crosses showed reciprocal reproductive isolation mechanisms operating in these cases.

Male hybrid fertility involving F1 intercrosses was also detected in crosses involving *D. obscura* B (A35F11) versus *D. sericeus* (D71C18M), *D. sericeus* (A35F11) versus *D. obscura* B (B21D7) and *D. obscura* B (B21D7) versus *D. sericeus* B (B21D7).

Complete pairing of chromosomes polymers was observed in intercrosses. Asynapsis in the microchromosomes (V) and paracentric region of chromosome X in some intercrosses and intercrosses was observed.

Aedeagus morphology is a good character to define groups that correspond to biological species, however, the intraspecific divergence exhibited in some strains and other results obtained in this study as in reproductive compatibility and chromosomal



VI. ABSTRACT AND CONCLUSIONS

The analysis of the reproductive compatibility of geographical strains is an important source of information as to the evolutionary status of the species to which the strains belong. In the present study strains of *Drosophila serido* (type B and D), *D. seriema*, *D. koepferae* and *D. buzzatii* (*repleta* group, *mulleri* subgroup, *buzzatii* cluster) and their hybrids were investigated for their reproductive compatibility (fertility and fecundity) and degree of chromosome pairing in salivary glands.

In general, the strains were highly fertile in intracrosses. Differences as to fertility were observed in intra and intercrosses of strains belonging to the same species. Intracross fecundity of D63M was significantly lower than that of every other *D. seriema* strain and D63M was also the only strain of these species that was fertile in crosses with D69R2 (*D. buzzatii* strain?). Another case was related to geographic strains B50Q3 and A55F11, both classified as *D. serido* type B, but exhibiting different behaviour. The females from strain A55F11 were receptive to males of D69R2 and D69R5 (*D. buzzatii* strain?), and the cross was fertile. On the other hand, B50Q3 showed asymmetrical isolation when intercrossed with the same strains.

Strains D69R2 and D69R5 (*D. buzzatii* strains?) were completely sterile in intercrosses with strains of *D. seriema*. The analysis of courtship showed prezygotic reproductive isolation mechanisms operating in these cases.

Male hybrid sterility preventing F1 intercrosses was also detected in crosses involving *D. serido* B (A55F11) versus *D. seriema* (D71C1BM), *D. seriema* (A95F3) versus *D. koepferae* (B25D7) and *D. koepferae* (B25D7) versus *D. serido* B (B50Q3).

Complete pairing of chromosomes polytene was observed in intracrosses. Assynapsis in the microchromosomes (VI) and proximal region of chromosomes X in some intracrosses and intercrosses was observed.

Aedeagus morphology is a good character to define groups that correspond to biological species, however, the intraspecific divergence exhibited in some strains and others results obtained in this study as to reproductive compatibility and chromosome



pairing, showed that these and others markers have similar importance due to the complexity of the process of speciation.

- AB'SABER, A. N. Evidências correladas pela expansão dos limites entre as Américas do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. *in: Paleogeografia*, v. 1, p. 1-19, 1971.
- ANANIEV, E. V., BARSKY, V. E., H. TIM, Y. V., KYZIC, M. V. The arrangement of transposable elements in the polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma (Berl.)*, v. 90, p. 363-371, 1981.
- BAIMAL, V., SINEL, F. M., PEREIRA, M. A. O. Heterozygosity and speciation: differentiation of some neotropical catfishes - the fish species of the *Ictalurus* riparia species group. *Genetica*, v. 60, p. 81-92, 1983.
- BARKER, J. S. F., SINEL, F. M., F. M. F. SINEL, F. O., PEREIRA, M. A. O. H. Polymorphism and chromosomal polymorphism of *Drosophila buzzatii* in Brazil and Argentina. *Genetica*, v. 67, p. 161-164, 1985.
- BERTELMUS, H. D. Asymmetry in the salivary gland chromosomes of *D. obscura*. *Genetica*, v. 33, p. 288-301, 1963.
- BICUDO, D. E. M. C. Estudo citogenético de células de *Drosophila melanogaster* mutantes (Rutgers replicata), com ênfase à regulação da estrutura organizacional nuclear. São José do Rio Preto, 1979. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Humanas, Universidade Estadual Paulista.
- BIZZO, N. M. V. Estudos sobre a citologia e histologia reprodutiva em *D. serrata*. São Paulo, 1983. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1983.
- BURR, G. L. Modes of sexual selection. *Am. Rev. Sci.*, v. 6, p. 239-264, 1973.
- CARRACEDO, M. C., ALENYA, A., CHARRAS, P. Interactions mol. of *Drosophila obscura* females mating propensity with *D. melanogaster* males. *The Journal of Heredity*, v. 89, n. 1, p. 101-104, 1998.
- CARSON, H. L., CLAYTON, F. E., STALKEA, H. D. Allopatric isolation and speciation in Hawaiian *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 57, p. 1280-1285, 1967.
- CARVAJAL, A. R., GANDURELA, M. R., SA-VEIRA, H. E. A three locus system of interspecific incompatibility markers under recombination in hybrids between *Drosophila buzzatii* and *D. obscura*. *Genetica*, v. 90, p. 1-10, 1998.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, A. N. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos da América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. In: *Paleoclimas*, v. 3, p. 1-19, 1977.
- ANANIEV, E. V., BARSKY, V. E., ILYIN, Y. V., RYZIC, M. V. The arrangement of transposable element in the polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* (Berl.), v. 90, p. 366-377, 1984.
- BAIMAI, V., SENE, F.M., PEREIRA, M.A.Q.P. Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactus - breeding species of the *Drosophila repleta* species group. *Genetica*, v. 60, p.81-92, 1983.
- BARKER, J. S. F., SENE, F. M., EAST, P. D., PEREIRA, M. A. Q. R. Allozyme and chromosomal polymorphism of *Drosophila buzzatii* in Brazil and Argentina. *Genetica*, v. 67, p. 161-170, 1985.
- BERENDES, H. D. Asynapsis in the salivary gland chromosomes of *Drosophila hydei*. *Genetica*, v.33, p.288-300, 1963.
- BICUDO, H. E. M. C. *Estudo citogenético de espécies de Drosophila do complexo mulleri (Grupo repleta), com ênfase à regulação da atividade organizadora nucleolar*. São José do Rio Preto, 1979. Tese (Livre Docência). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- BIZZO, N.M.V. *Estudos sobre a biologia e isolamento reprodutivo em D. serido*. São Paulo, 1983. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1983.
- BUSH, G. L. Modes of animal speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v. 6, p. 339-364, 1975.
- CARRACEDO, M. C., ASENJO, A., CASARES, P. Inheritance mode of *Drosophila simulans* female mating propensity with *D. melanogaster* males. *The Journal of Heredity*, v. 89, n. 1, p.101-104, 1998.
- CARSON, H. L., CLAYTON, F. E., STALKER, H. D. Karyotypic stability and speciation in Hawaiian *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 57, p. 1280-1285, 1967.
- CARVAJAL, A. R., GANDERELA, M. R., NAVEIRA, H. F. A three-locus system of interspecific incompatibility underlies male inviability in hybrids between *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Genetica*, v. 98, p. 1-19, 1996.



- CASTRO, J. P., MADI-RAVAZZI, L. Estudo do polimorfismo de DNA e caracterização genética de linhagens de *Drosophila* do *cluster buzzatii* através de marcadores RAPD. *Genetics and Molecular Biology*, v. 21, n. 3 - supplement, p. 257, 1998.
- CASTRO, J. P., TORRES, F. R., MACHADO, L. P. B., MADI-RAVAZZI, L. Reproductive features and chromosome pairing in *Drosophila* strains of *buzzatii* complex. *Rev. Bras. Genet.*, v. 19, n. 3 - supplement, p. 266, 1996.
- CHARLESWORTH, B., COYNE, J. A., BARTON, N. H. The relative rates of evolution of sex chromosomes and autosomes. *Am. Nat.*, v.130, n.1, p.113-146, 1987.
- CORDEIRO, A. R. Chromosomal pairing variability of interespecific hybrids of *Drosophila willistoni* crytic group. *Proc. XII Congr. Genet.* 191p., 1968.
- COYNE, J. A., ORR, H. A. Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution*, v.43, n.2, p.362-381, 1989.
- DOBZHANSKY, T. *Genetics and the origin of species*. 1 ed., Nova York: Columbia Univ. Press, 1937.
- DOBZHANSKY, T. The X-chromosome in the larvae salivary glands of hybrids *Drosophila insularis* X *Drosophila tropicalis*. *Chromosoma*, v. 8, p. 691-698, 1975.
- DOBZHANSKY, T., EHRMAN, L., KASTRITSIS, P. A. Ethological isolation between sympatric and allopatric species of the *obscura* group of *Drosophila*. *Animal Behavior*, v. 16, p. 79-87, 1968.
- DOBZHANSKY, T., AYALA, F. J., STEBBINS, G. L., VALENTINE, J. W. *Evolution*. San Francisco, Freeman, 1977.
- EBERHART, C. G., MAINES, J. Z., WASSERMAN, S. A. Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human deleted in azoospermia. *Nature*, v. 381, p. 783-785, 1996.
- EHRMAN, L., WASSERMAN, M. The significance of asymmetrical sexual isolation. *Evol. Biol.*, v. 21, p. 1-20, 1987.
- EVGEN'EV, M. B. The pattern of polytene chromosome conjugation and crossing-over in interespecific hybrids of *Drosophila*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 41, p. 249-254, 1971.
- EVGEN'EV, M. B., POLIANSKAYA, G. G. The pattern of polytene chromosome synapsis in *Drosophila* species and interspecific hybrids. *Chromosoma* (Berl.), v. 57, p. 285-295, 1976.



- EVGEN'EV, M. B., LUBENNIKOVA, E. I., SHAPIRO, I. M. Radioautographic study of the replication of salivary gland polytene chromosomes in *Drosophila*. Chronology of DNA replication in normal conditions and in translocation. *Dokl. Akad. Nauk.*, v. 20, n. 4, p. 215-217, 1972.
- FIGUEIREDO, V. L. C., SENE, F. M. Chromosome Variability in Brazilian Populations of *Drosophila buzzatii* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Brasil. Biol.*, v. 52, n. 4, p. 555-561, 1992.
- FONTDEVILA, A., HASSON, E., WASSERMAN, M., SANCHEZ, A., NAVEIRA, H., RUIZ, A. *Drosophila koepferae*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera: Drosophilidae) superspecies taxon. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 81, p. 380-385, 1988.
- FUTUYMA, D. J. Especiação. In: *Biologia Evolutiva*. Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 2 ed., Ribeirão Preto, cap. 8, p. 232-264, 1992.
- GEER, B. W., BOWMAN, J. T., TYL, B. J. A gene necessary for late sperm function in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Zool.*, v. 209, p. 387-394, 1979.
- GUERRA, M. S. Os ciclos endomitóticos e os cromossomos politênicos. In: *Introdução à Citogenética Geral*. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, cap. 4, p. 36-44, 1988.
- HOLLOCHER, H., WU, SHUNG-I. The genetics of reproductive isolation in the *Drosophila simulans* clade: X vs. Autosomal effects and male vs. Female effects. *Genetics*, v.143, p.1243-1255, 1996.
- HOLLOCHER, H., TING, C-T, WU, M-L, WU, C-I. Incipient speciation by sexual isolation in *Drosophila melanogaster*: extensive genetic divergence without reinforcement. *Genetics*, v.147, p.1191-1201, 1997.
- JOHNSON, N.A., HOLLOCHER, H., NOONBURG, E., WU, C-I. The effects of interspecific Y chromosome replacements on hybrid sterility within the *Drosophila simulans* clade. *Genetics*, v.135, p.443-453, 1993.
- KELLY, J. K., NOOR, M. A. F. Speciation by reinforcement: a model derived from studies of *Drosophila*. *Genetics*, v. 143, p. 1485-1497, 1996.
- KUHN, G. C. S., RUIZ, A., ALVES, M. A. R., SENE, F. M. The metaphase and polytene chromosomes of *Drosophila seriema* (repleta group; mulleri subgroup). *Revista Brasileira de Genética*, v. 19, n. 2, p. 209-216, 1996.
- LAMNISSOU, K., LOUKAS, M., ZOUROS, E. Incompatibilities between Y chromosome and autosomes are responsible for male hybrid sterility in crosses between *Drosophila virilis* and *Drosophila texana*. *Heredity*, v. 76, p. 603-609, 1996.



- LAPENTA, A. S. *Padrão de esterases na superespécie Drosophila serido e em D. buzzatii*. São José do Rio Preto, 1992. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- LAPENTA, A. S. *Caracterização de espécies de Drosophila do "cluster" buzzatii, com base nos padrões de esterases*. São José do Rio Preto, 1998. 104p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.
- LAPENTA, A. S., BICUDO, H. E. M. C., CERON, C. R., MANZATO, J. A. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. *Cytobios*, v. 84, p.13-29, 1995.
- MADI-RAVAZZI, L. *Aspectos citogenéticos, reprodutivos e especiação em Drosophila serido*. São José do Rio Preto, 1988. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- MADI-RAVAZZI, L. *Estudo da diferenciação entre isolinhagens da superespécie Drosophila serido, com base em aspectos reprodutivos e citogenéticos*. São José do Rio Preto, 1992. 133p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- MADI-RAVAZZI, L., BICUDO, H.E.M.C. 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*. v.15, n.4, p.831-851. 1992.
- MADI-RAVAZZI, L., BICUDO, H. E. M. C., MANZATO, J. A. Reproductive compatibility and chromosome pairing in the *Drosophila buzzatii* complex. *Cytobios*, v.89, p. 21-30, 1997.
- MANFRIN, M.H. *Filogenia do "cluster" buzzatii (Diptera, Drosophilidae), inferida a partir do DNA mitocondrial, com ênfase nas populações brasileiras do "subcluster" serido*. Ribeirão Preto, 1997. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- MARIN, I., RUIZ, A., PLA, C., FONTDEVILA, A. Reproductive relationships among ten species of the *Drosophila repleta* group from South America and the West Indies. *Evolution*, v. 47, n. 5, p. 1616-1624, 1993.
- MARKOW, T. A. Courtship behavior and control of reproductive isolation between *Drosophila mojaviensis* and *Drosophila arizonensis*. *Evolution*, v. 35, n. 5, p. 1022-1026, 1981.
- MARKOW, T. A. Sexual isolation among populations of *Drosophila mojaviensis*. *Evolution*, v. 45, n. 6, p. 1525-1529, 1991.



- MAYFIELD, J. E., ELLISON, J. R. The organization of interphase chromatin in drosophilidae: the self adhesion of chromatin containing the same DNA sequences. *Chromosoma*, v. 52, n. 1, p. 37-48, 1975.
- MAYR, E. *Systematics and the origin of species*. New York, Columbia University Press, 1942.
- MAYR, E. *Populations, species, and evolution*. Cambridge, Belknap Press of Harvard University Press, 1970.
- MAYR, E. Multiplicação de espécies. In: *Populações, Espécies e Evolução*. Companhia Editora Nacional, 1ª ed., cap. 15, p. 264-296, 1977.
- MICHAILOVA, P. C-banding in the polytene chromosome of species of the plumosus group (Diptera, Chironomidae) and their experimental hybrids. *Genetica*, v. 74, p. 41-51, 1987.
- MICHAILOVA, P., FISCHER, J. Cytogenetic studies on *Chironomus plumosus* L. (Diptera, Chironomidae) from different populations and their experimental hybrids. *Mem. Amer. Entomol. Society*, v.34, p. 211-221, 1984.
- MONTEIRO, S.G. *Morfometria multivariada de populações naturais de Drosophila serido*. Ribeirão Preto, 1997. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- MONTEIRO, S.G., SENE, F.M. Estudo morfométrico de populações de *Drosophila serido* das regiões central e sul do Brasil. *Rev. Bras. Gen.*, v.18, n.3 (suplemento), p.283, 1995.
- MORAES, M.A.M. *Isolamento sexual entre populações da superespécie Drosophila serido (Diptera, Drosophilidae)*. São Paulo, 1992. 91p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- ORR, H. A. Mapping and characterization of a 'speciation gene' in *Drosophila*. *Genetical Research*, v. 59, n. 2, p. 73-80, 1992.
- ORR, H. A., COYNE, J. A. The genetics of isolation in the *Drosophila virilis* group. *Genetics*, v. 121, p. 527-537, 1989.
- PAPACEIT, M., JUAN, E. Fate of dot chromosomer genes in *Drosophila willistoni* and *Scaptodrosophila lebanonensis* determined by situ hybridization. *Chromosome Research*, v. 6, p.49-54, 1998.
- PATTERSON, J.T., STONE, W.S. *Evolution in the genus Drosophila*. Mac Millan Co., New York, 1952.
- PEACOCK, W. J., LOHE, A. R. Repeated sequences in the chromosomes of *Drosophila*. In: *Insect. Cytogenetics* Edit. Blackman, R. L., Heivitt, J. M., Ashburner, M. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 278p., 1982.



- PEREIRA, M.A.Q.R., VILELA, C.R., SENE, F.M. Notes on breeding and feeding sites on some species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Ciênc. e Cult.*, v.35, n.9, p.1313-1319, 1983.
- PERJE, A. M. Analysis of synapsis in salivary chromosomes of larvae from different strains of *Drosophila funebris*. *Acta Zoologica*, p.1-12, 1955.
- PRAKASH, S. Origin of reproductive isolation in the absence of apparent genic differentiation in a geographic isolate of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, v. 72, p. 143-155, 1972.
- RAFAEL, V., ARCOS, G. Subgrupo *inca*. Un nuevo subgrupo del grupo *repleta*. Con descripción de *Drosophila huancavilcae* n.sp. (Diptera, Drosophilidae). *Evolucion Biologica*, v.3, n.3, p.233-243, 1989.
- RIEDE, I., RENZ, M. Study on the somatic pairing of polytene chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*, v. 88, n. 2, p. 116-123, 1983.
- RUIZ, A., FONTDEVILA, A. Ecología y evolution del subgrupo *mulleri* de *Drosophila* en Venezuela y Colombia. *Acta Cient. Venezolana*. v.32, p.338-345, 1981.
- RUIZ, A., WASSERMAN, M. Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Heredity*, v. 70, n. 6, p. 582-596, 1993.
- RUIZ, A., FONTDEVILA, A., WASSERMAN, M. The Evolutionary History of *Drosophila buzzatii*. III. Cytogenetic Relationships Between two Sibling Species of the *Buzzatii* Cluster. *Genetics*, v. 101, p. 503-518, 1982.
- RUIZ, A., HEED, W.B., WASSERMAN, M. Evolution of the *Mojavensis* cluster of cactophilic *Drosophila* with description of two new species. *Journal of Heredity*. v.81, p.30-42, 1990.
- RUIZ, A., CANSIAN, A., ALVES, M.R., SENE, F.M. Alteração na filogenia cromossômica do subcluster *D. serido*. *Rev. Bras. Genet.*, v.19, n.3 (suplemento), 269p. (B-298), 1996.
- SCHAFER, U. Sterility in *Drosophila hydei* x *D. neohydei* hybrids. *Genetica*, v.49, n.2/3, p.205-214, 1978.
- SENE, F. M. Geographic and ecological pattern of chromosome polymorphism in *Drosophila mercatorum pararepleta*. *Rev. Bras. Genet.*, v. 9, p. 573-591, 1986.
- SENE, F. M., SANTOS, T. H. F. Chromosomal variability in *Drosophila paranaensis* from Brazil, South America. *Evolución Biológica*, v. 2, p. 261-271, 1988.
- SENE, F.M., PEREIRA, M.A.Q.R., VILELA, C.R. Evolutionary aspects of cactus breeding *Drosophila* species in South America. In: *Ecological genetics and evolution*. Academic Press. Australia, p.97-106, 1982.



- SENE, F.M., PEREIRA, M.A.Q.R., VILELA, C.R. Contrasting patterns of differentiation inferred from tradicional genetic markers in the process of speciation. *Pacific Science*. v.42, p.81-88, 1988.
- SILVA, A.F.G. Sistemática de *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Ciência e Cultura*. v.33, n.7, p.684, 1981.
- SILVA, A.F.G., SENE, F.M. Morphological geografic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.* v.35, n.2, p.455-468, 1991.
- SINGH, B. N., CHATTERJEE, S. Variation in mating propensity fertility in isofemale strains of *Drosophila ananassae*. *Genetica*, v. 73, p. 237-242, 1987.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. Evolution of the Buzzatii Cluster (*Drosophila Repleta* Species Group) in Middle South America. *Evolución Biológica*, v. 8, n. 9, p. 71-85, 1995a.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. *Drosophila seriema* n. sp.: New Member of the *Drosophila serido* (Diptera: Drosophilidae) Superspecies Taxon. *Annals of the Entomological Society of America*, v.88, n.2, p.139-142, 1995b.
- TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. Fauna of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) in the northern area of the "Cadeia do Espinhaço", States of Minas Gerais and Bahia, Brazil: Biogeographical and ecological aspects. *Iheringia, Sér. Zool.*, v.78, p.85-94, 1995c.
- TOSI, D. *Análise das inversões cromossômicas de D. serido*. São Paulo, 1982. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- TOSI, D., SENE, F.M. Further studies on chromosomal variability in the complex taxon *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Genética*. v.12, n.4, p.729-745, 1989.
- VANZOLINI, P. E. A quasi-historical approach to the natural history of the differentiation of reptiles in tropical geographic isolates. *Papeis Avulsos Zool.*, v.34, n.1, p.89-204, 1981.
- VILELA, C.R. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v.27, n.1, p., 1983.
- VILELA, C.R., SENE, F.M. Two new neotropical species of *D. repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Pap. avulsos Zool.* São Paulo: v.30, p. 295-299, 1977.
- WARD, B. L., HEED, W. B. Chromosome phylogeny of *Drosophila* and related species. *J. Hered.* v. 61, p. 248-258, 1970.
- WASSERMAN, M. Cytological studies of the *repleta* group. *Univ. Texas Publ.*, v. 5422, p. 130-152, 1954.



- WASSERMAN, M. Cytological studies of the **repleta** group of the genus *Drosophila*.
V. The **mulleri** group. *Univ. Texas Publ.*, v.6205, p.85-118, 1962.
- WASSERMAN, M. Evolution of the **repleta** group. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3b. Academic Press, Ashburner, M., Carson, H. L., Thompson, J. N., London, p. 61-139, 1982.
- WASSERMAN, M. Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. In: *Inversion polymorphism in Drosophila*. CRC Press. Inc., eds. Powell, J.R., Krimbas, C.B., Boca Raton, cap.9, p.455-533, 1992.
- WASSERMAN, M., RICHARDSON, R. H. Evolution of Brazilian *Drosophila mullericomplex* species. *J. Hered.*, v.78, p.282-286, 1987.
- WHITE, M. J. D. *Modes of speciation*. W. H. Freeman and col., San Francisco, 1978.
- ZENG, L-W., SINGH, R. S. A general method for identifying major hybrid male sterility genes in *Drosophila*. *Heredity*, v. 75, p.331-341, 1995.
- ZOUROS, E. Advances in the genetics of reproductive isolation in *Drosophila*. *Genome*, v.31, p.211-220, 1989.



