



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Guilherme Matheus Amaro

História de vida, relações reprodutivas e alométricas no subgrupo *elliptica*
de *Drosophila*, espécies neotropicais com edeagos gigantes.

São José do Rio Preto
2023

Guilherme Matheus Amaro

História de vida, relações reprodutivas e alométricas no subgrupo *elliptica* de *Drosophila*, espécies neotropicais com edeagos gigantes.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lilian Madi-Ravazzi

São José do Rio Preto
2023

A485h Amaro, Guilherme Matheus
 História de vida, relações reprodutivas e alométricas no subgrupo
 elíptica de *Drosophila*, espécies neotropicais com edeagos gigantes. /
 Guilherme Matheus Amaro. -- São José do Rio Preto, 2023
 84 p.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
 Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
 Preto
 Orientadora: Lilian Madi Ravazzi

 1. Evolução. 2. *Drosófila*. 3. Genética animal. 4. Alometria. 5.
 Orgãos reprodutores. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Guilherme Matheus Amaro

História de vida, relações reprodutivas e alométricas no subgrupo *elliptica* de *Drosophila*, espécies neotropicais com edeagos gigantes.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Lilian Madi-Ravazzi
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Mauricio Osvaldo Moura
UFPR - Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus
UNICENTRO - Universidade Estadual do Centro-Oeste

São José do Rio Preto
2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais **Carmen** e **José** por sempre me apoiarem na minha jornada e a toda a minha família, em especial ao meu irmão **Gustavo Matheus Amaro** que me ajudou a solucionar algumas dificuldades que eu tive durante o meu Mestrado, apesar de não trabalharmos na mesma área.

À minha orientadora **Profa Dra. Lilian Madi-Ravazzi** por ter acreditado em mim e me dado uma oportunidade de desenvolver esse trabalho que contribuiu significativamente para o meu crescimento pessoal e profissional, além de todo o conhecimento que me passou desde a Graduação até o Mestrado.

A todos os membros do **Laboratório de Biologia Evolutiva em Insetos** que conviveram comigo durante todo esse tempo e me ajudaram em diversos momentos, me dando apoio e conforto. Obrigado **Bruna Emília** por sempre ter me apoiado mesmo na correria do seu doutorado me ensinando diversas coisas que foram de suma importância para o desenvolvimento do meu projeto. Obrigado **Carolina Prediger** por também ter me ajudado muito, assim como sua contribuição valiosa para o meu trabalho que sem dúvidas foi essencial para a realização do mesmo. Obrigado **Natália Francielle**, técnica do laboratório durante o primeiro ano do meu mestrado, que me auxiliou muito tanto na realização de experimentos como serviços que me forneceram o total amparo e apoio! A sua contribuição foi muito valiosa e importante, sem ela eu não teria conseguido realizar tantos experimentos que envolviam cruzamentos. Gostaria de agradecer também a **Nathalia Bertoni** e ao **Rodrigo Barbarotti**, técnicos durante meu segundo ano de mestrado, que também me auxiliaram de diversas formas e permitiram com que eu desenvolvesse a parte experimental do meu trabalho com muita segurança. Agradeço também a **Ana Carla**, membro recente do laboratório, que foi uma companhia muito agradável e que também me ajudou em diversos momentos. Todos, sem exceção, contribuíram muito para a minha formação e considero como amigos queridos que a pós-graduação me trouxe.

A todos os meus amigos que me acompanharam nessa jornada e me ofereceram total suporte nessa etapa que foi muito gratificante. Ao meu grupo de amigos do ensino médio (**divinos**) que estão comigo há décadas e sempre torceram pelo meu sucesso profissional e pessoal.

À **Lais Caldas Pescarmona**, parceira de graduação que esteve comigo desde o início da minha formação e sempre acreditou em mim e no meu potencial. Agradeço por estar ao meu

lado durante todos os momentos e por ser essa pessoa tão leve que me traz muita alegria. Obrigado também à sua mãe, **Lia Caldas** por todo carinho e apoio.

À **Vitória Navarrete**, o maior presente que a graduação me trouxe e uma das pessoas que eu mais admiro. Começamos o mestrado juntos, então você entendia exatamente como eu me sentia em certos momentos e sempre me trouxe conforto. Obrigado por sempre estar ao meu lado todos esses anos, me apoiar e me entender como ninguém. Uma mulher forte como você me faz acreditar que tudo é possível.

Ao meu melhor amigo e uma das minhas pessoas favoritas, **Yuri Stamillo**. Obrigado por sempre estar comigo durante todos esses anos e me apoiar em absolutamente todas as etapas da minha vida. Desde o ensino fundamental ao mestrado você acreditou em mim em momentos que às vezes nem eu acreditava. Agradeço o carinho e apoio todos esses anos, apesar da distância você sempre esteve presente e serei sempre grato por isso. Obrigado por todas as conversas, por todos os conselhos, por toda a ajuda, pelas risadas, pelas broncas, pelas fofocas, pelos momentos icônicos, pela parceria, por estar ao meu lado quando mais precisei e sempre torcer por mim.

Às professoras que participaram da minha banca de qualificação **Profa. Dra. Claudia Carareto** e **Profa. Dra. Luciana Machado** pelas contribuições valiosíssimas que permitiram com que eu aprimorasse ainda mais o meu trabalho.

Agradeço ao **Prof. Dr. Luis Gustavo Galego** que também contribuiu com meu trabalho me ajudando em algumas análises, além de sempre estar presente me motivando e acreditando no meu potencial desde a minha Iniciação Científica.

Aos funcionários do **Departamento de Biologia** e da **Seção de Pós-Graduação** que me ajudaram indiretamente e diretamente durante esses dois anos. E a todos os outros funcionários do **IBILCE** que fizeram parte do meu dia-a-dia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O subgrupo *elliptica* do grupo *saltans* de *Drosophila* é composto por quatro espécies neotropicais as quais apresentam uma característica notável: o gigantismo fálico. A escassez de estudos para esse subgrupo e a presença de edeagos com tamanhos incomuns, não observado para outras espécies da família Drosophilidae motivou o presente estudo. Os principais objetivos foram: avaliar a história de vida, as barreiras reprodutivas das espécies *D. emarginata*, *D. neoelliptica* e *D. neosaltans* (2 linhagens) e a alometria estática no subgrupo. Os parâmetros da história de vida investigados foram: tempo de corte e cópula, fecundidade, fertilidade, tempo de desenvolvimento e longevidade. As barreiras reprodutivas foram avaliadas por meio de intercruzamentos recíprocos entre as espécies. Para a análise morfométrica e de alometria foram realizadas medições individuais de machos e fêmeas do tórax, asa, edeagos e ovipositores. Os resultados para os traços biológicos demonstraram que *D. neosaltans* diferiu significativamente das outras duas espécies para o tempo médio de cópula, fertilidade e fecundidade. Além disso, *D. neoelliptica* apresentou o tempo de desenvolvimento superior às demais espécies e houve diferença significativa na sobrevivência entre machos e fêmeas. Nos intercruzamentos não foi observado cópula, espermatozoides na espermateca e geração de descendentes, sugerindo isolamento pré-zigótico entre elas. Foi observado também que as espécies do subgrupo *elliptica* se desviam do padrão alométrico geral encontrado na família, com o edeago correspondendo a 1/2 do tamanho do corpo dos machos em *D. emarginata* e a observação de um alto coeficiente de variação (CV) no edeago sugere a influência da seleção sexual na evolução do órgão. Dessa forma, os dados desse trabalho sugerem que há diferença no parâmetro reprodutivo e de sobrevivência dessas espécies, sendo que o isolamento reprodutivo entre elas é observado. As espécies do subgrupo *elliptica* fogem do padrão encontrado em Drosophilidae e o edeago foi a estrutura morfológica que obteve uma grande variação, ao contrário do ovipositor, sugerindo que a seleção sexual pode ter tido influência na evolução na morfologia distinta dessa estrutura fálica. Não foi observado a coevolução do tamanho dos órgãos reprodutores nas espécies analisadas.

Palavras-chave: Alometria estática. Bionomia. Evolução da genitália. Gigantismo fálico. Isolamento reprodutivo.

ABSTRACT

The *elliptica* subgroup of the *saltans* group of *Drosophila* is composed of four neotropical species which have a notable feature: phallic gigantism. The lack of studies for this subgroup and the presence of aedeagus with unusual sizes, not observed for other species of the Drosophilidae family, motivated the present study. The main objectives were: to evaluate the life history, the reproductive barriers of the species *D. emarginata*, *D. neoelliptica* and *D. neosaltans* (2 strains) and the static allometry in the subgroup. The life history parameters investigated were: courtship and copulation time, fecundity, fertility, developmental time and longevity. The reproductive barriers were tested through intercrosses between species in both directions. For the morphometric and allometry analysis, individual measurements of males and females of the thorax, wing, aedeagus and ovipositors were made. The results for biological traits showed that *D. neosaltans* differed significantly from the other two species in terms of mean copulation time, fertility and fecundity. In addition, *D. neoelliptica* presented a longer development time than the other species and significant difference in survival between males and females was obtained. In the intercrosses, copulation, spermatozoa in the spermatheca and generation of descendants were not observed, suggesting pre zygotic isolation between them. It was also observed that the species of the *elliptica* subgroup deviate from the general allometric pattern found in the family, with the aedeagus corresponding to 1/2 of the body size of the males in *D. emarginata* and the observation of a high coefficient of variation (CV) in the aedeagus suggests the action of sexual selection in the evolution of the organ. Thus, the data from this work suggest that there is a difference in the reproductive and survival parameters of these species, and the reproductive isolation between them is observed. The species of the *elliptica* subgroup deviate from the pattern found in Drosophilidae and the aedeagus was the morphological structure that obtained a great variation, unlike the ovipositor, suggesting that sexual selection may have influenced the evolution of the distinct morphology of this phallic structure. The reproductive organs' size coevolution doesn't occur.

Keywords: Bionomy. Genitalia Evolution. Phallic gigantismo. Reproductive isolation. Static allometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Medições corporais realizadas nas espécies do subgrupo <i>elliptica</i> .	31
Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura dos edeagos das espécies do subgrupo <i>elliptica</i> .	32
Figura 3. Fertilidade média das espécies do subgrupo <i>elliptica</i> durante 7 dias.	36
Figura 4 – Longevidade de fêmeas (curva com esferas vermelhas) e machos (curva com quadrados verdes) espécies do subgrupo <i>elliptica</i> .	37
Figura 5 – Gráfico de alometria estática do comprimento do ovipositor, edeago e asas em relação ao comprimento do tórax em <i>Drosophila emarginata</i> .	43
Figura 6 – Gráfico de alometria estática do comprimento do ovipositor, edeago e asas em relação ao comprimento do tórax em <i>Drosophila neoelliptica</i> .	44
Figura 7 – Gráfico de alometria estática do comprimento do ovipositor, edeago e asas em relação ao comprimento do tórax em <i>Drosophila neosaltans</i> (Aguai).	45
Figura 8 – Gráfico de alometria estática do comprimento do ovipositor, edeago e asas em relação ao comprimento do tórax em <i>Drosophila neosaltans</i> (Ouro Preto).	46
Figura 9 – Análise de Componentes Principais das características morfológicas (asa, tórax, edeago e ovipositor) de machos e fêmeas do subgrupo <i>elliptica</i> .	48
Figura 10 – Casais em cópula de <i>D. emarginata</i> .	49
Figura 11 – Casais em cópula de <i>D. neoelliptica</i> .	50
Figura 12 – Casais em cópula de <i>D. neosaltans</i> .	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens e procedência geográfica das espécies do subgrupo <i>elliptica</i> de <i>Drosophila</i> .	26
Tabela 2 – Média e desvio padrão do tempo da corte e cópula nas espécies do subgrupo <i>elliptica</i> .	34
Tabela 3 – Média e desvio padrão da fertilidade e fecundidade total nas espécies do subgrupo <i>elliptica</i> .	35
Tabela 4 – Fertilidade e fecundidade média das espécies do subgrupo <i>elliptica</i> , por casal.	35
Tabela 5 – Média e desvio padrão do tempo de desenvolvimento nas espécies do subgrupo <i>elliptica</i> .	36
Tabela 6 – Mediana da longevidade (dias) nas espécies do subgrupo <i>elliptica</i> .	37
Tabela 7 – Correlação dos componentes da história de vida do subgrupo <i>elliptica</i> .	38
Tabela 8 – Fertilidade e fecundidade média dos intercruzamentos entre as espécies do subgrupo <i>elliptica</i> .	39
Tabela 9 – Média, desvio padrão, coeficiente de variação (entre parênteses, em %) e teste de variância obtidos para os dados morfométricos dos machos das espécies do subgrupo <i>elliptica</i> .	41
Tabela 10 – Média, desvio padrão, coeficiente de variação (entre parênteses, em %) e teste de variância obtidos para os dados morfométricos das fêmeas das espécies do subgrupo <i>elliptica</i> .	42
Tabela 11 – Análise de regressão dos caracteres morfológicos em relação ao tamanho corporal (machos).	46
Tabela 12 – Análise de regressão dos caracteres morfológicos em relação ao tamanho corporal (fêmeas).	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Aguaí
OP	Ouro Preto
SC	Serra da Cantareira
TIR	Tirimbina
EM	<i>D. emarginata</i>
NEO	<i>D. neoelliptica</i>
NEOS(A)	<i>D. neosaltans</i> (Aguaí)
NEOS(OP)	<i>D. neosaltans</i> (Ouro Preto)

LISTA DE SÍMBOLOS

min minutos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Parâmetros reprodutivos da história de vida	26
3.2 Experimentos do isolamento reprodutivo (IR)	27
3.3 Preparação das lâminas dos edeagos e ovipositores para as análises por microscopia óptica	28
3.4 Análises morfométricas do tórax, asa, edeago e ovipositor	28
3.5 Casais em cópula	29
3.6 Análises estatísticas	29
4. RESULTADOS	33
4.1 História de vida	33
4.2 Relações reprodutivas das espécies do subgrupo <i>elliptica</i>	39
4.3 Mensuração do tamanho do edeago e do ovipositor em relação ao tamanho do tórax, asa e corpo por meio da morfometria	40
4.4 Alometria estática das espécies do subgrupo <i>elliptica</i> .	42
4.5 Observação dos casais em cópula	48
5. DISCUSSÃO	52
5.1 Componentes da história de vida das espécies do subgrupo <i>elliptica</i> e suas relações reprodutivas.	52
5.2 Alometria estática do subgrupo <i>elliptica</i> e coevolução entre edeago e ovipositor.	57
6. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62
APENDICE A – Tabelas suplementares	77

1 INTRODUÇÃO

Traços da história de vida

A história de vida de um organismo, ou seja, os eventos do nascimento até sua morte, constituem uma das áreas mais importantes de estudo para o conhecimento de um grupo de espécies (STEARNS, 1992; ROFF, 2007). A história de vida é o resultado da ação conjunta da história evolutiva, biologia funcional e genética de um organismo (ROSE, 1983; PARTRIDGE; SIBLY, 1991; REZNICK; TRAVIS, 1996; ROSE; BRADLEY, 1998), frequentemente conectada em correlações fenotípicas, fisiológicas ou genéticas conhecidas como *trade-offs* - que são eventos compensatórios das vantagens e desvantagens entre componentes do valor adaptativo (STEARNS, 1992; ROFF, 2002; CHARLESWORTH; HUGHES, 2000; FLATT, 2011). Dessa forma, estudar os componentes da história de vida, que são alvos diretos da seleção natural, é avaliar como os traços da morfologia, do comportamento, da fisiologia e outros podem influenciar no valor adaptativo, ou seja, na sobrevivência e a reprodução de um organismo (COLE, 1954; KNIGHT; ROBERTSON, 1957; CLUTTON-BROCK, 1988; STEARNS, 1992; ROFF, 1993; CHARLESWORTH, 1994; PRASAD; JOSHI, 2003; FLATT; HEYLAND, 2011; FABIAN; FLATT, 2012).

O entendimento sobre a evolução da história de vida tem sido construído ao longo do tempo e por diferentes perspectivas de diversos estudos. Alguns trabalhos focam principalmente no ponto de vista fenotípico (STEARNS, 1976, 1992, 2000; ROFF 1993, 2002), mas também houve um empenho na investigação genética mais aprofundada por trás dos componentes relacionados ao valor adaptativo (LEWONTIN, 1974; CHARLESWORTH, 1980, 1994, 2003, 2015; ROFF, 1993; CHARLESWORTH; HUGHES, 2000; LYMAN et al., 2023). A maioria desses trabalhos foram realizados em *D. melanogaster* e, dessa forma, eles puderam também proporcionar uma base para o desenvolvimento de modelos matemáticos que tentam explicar a seleção desses componentes em populações de drosofilídeos (GAVORA et al., 1971; CHARLESWORTH, 1980, 1994, 2003). Ainda, houve trabalhos que contribuíram no entendimento da origem, quantidade e manutenção da variação genética das características relacionadas ao valor adaptativo, assim como as adaptações referentes à

história de vida (LEWONTIN, 1974; SIMMONS; CROW, 1977; HOULE et al., 1994; CHARLESWORTH; HUGHES, 2000; CHARLESWORTH, 2015).

A reprodução em si é um dos processos mais importantes da história de vida pois afeta diretamente o sucesso dos organismos. Como elucidado anteriormente, ela está diretamente relacionada com os componentes de história de vida e pode ser caracterizada como o encontro entre indivíduos de ambos os sexos, e, para isso acontecer, o acasalamento é necessário. Em alguns organismos (como por exemplo em *Drosophila*) é necessário que antes da cópula uma série de comportamentos, que geralmente são espécie-específicos, aconteça em um processo denominado corte (MARKOW, 1996; GREENSPAN; FERVEUR, 2000).

No processo de corte dos drosofilídeos destacam-se o estímulo visual, os sinais acústicos e os feromônios com a função de encontro e reconhecimento de parceiros. Dentre os estímulos visuais, estão presentes os fatores dinâmicos como atividade motora das asas e a movimentação, e os estáticos como as cores e formas dos indivíduos. Os sinais acústicos se dão a partir da vibração das asas dos machos e são muito importantes para o reconhecimento em nível de espécie, pois possuem muita variação interespecífica. Por fim, os feromônios são componentes químicos essenciais que agem nesse processo de reprodução na identificação dos pares através de receptores presentes no corpo desses organismos (KYRIACOU; HALL, 1982; MARKOW, 1996; RITCHIE et al., 1999; GREENSPAN; FERVEUR, 2000; LASBLEIZ et al., 2006).

O processo reprodutivo está frequentemente relacionado com a coevolução antagonica existente entre os sexos opostos, pois há interesses e vantagens divergentes para os machos e para as fêmeas, em que traços que são favorecidos em um sexo podem exercer pressão seletiva ao outro (CHAPMAN et al., 2003). A razão desse conflito está diretamente relacionada ao êxito de ambos os sexos durante a reprodução, os traços reprodutivos que podem ser maximizados durante a interação sexual são diferentes entre machos e fêmeas. A duração da cópula é um exemplo de componente da história de vida que é resultado da coevolução antagonica e é influenciada pelo conflito sexual (EVARDSSON; CANAL, 2006).

A duração da cópula tem efeitos importantes no valor adaptativo tanto das fêmeas quanto dos machos. Para os machos, cópulas mais longas podem garantir a paternidade e

diminuir a chance de reacasamento, conhecido como hipótese da "guarda estendida" (ALCOOK, 1994; MAZZI et al., 2009). Para as fêmeas, pode ser vantajoso cópulas longas por proporcionarem a recepção de uma quantidade suficiente de esperma, assim como aumentar a sua fecundidade de acordo com a hipótese de transferência de ejaculado. Entretanto, cópulas mais curtas permitem uma maior chance de acasalamento e a seleção de espermatozoides no seu trato reprodutivo (MARKOW; HOCUTT, 1998; KNOWLES; MARKOW, 2001).

Os machos tendem a transferir muito mais esperma que o necessário para fertilizar os ovos de suas parceiras (EBERHARD, 1996), inclusive ultrapassando a capacidade dos órgãos de armazenamento de espermatozoides das fêmeas, por exemplo as espermatecas e receptáculos seminais dos drosofilídeos. Desta forma, fazem seleção de esperma em seu trato reprodutivo, chamada escolha críptica das fêmeas, resultando na competição de esperma dos machos copulantes (BIRKHEAD, 1998).

A análise da fertilidade, definida como a quantidade de ovos depositados pela fêmea ao longo de sua vida, também é uma parte substancial do estudo da biologia dos drosofilídeos e em diversas espécies ela possui um comportamento muito similar (NOVOSELTEV et al., 2003): normalmente em idades mais jovens as fêmeas depositam muito mais ovos e, após atingir um pico na produção, há um declínio gradual conforme o progresso da senescência (PARTRIDGE; FOWLER, 1992; NOVOSETELV et al., 2002, 2003, 2004, 2005; KLEPSATEL et al, 2013). Essa atividade reprodutiva (produção de ovos) é muito custosa, podendo ter efeitos negativos na sobrevivência e longevidade desses organismos (KOUFOPANOOU, 1985; PARTRIDGE, 1986), por isso, em alguns casos a redução na produção de ovos é acompanhada de aumento da longevidade das fêmeas (SMITH, 1958).

A fecundidade, definida como a proporção de imagos resultantes em relação à quantidade de ovos depositados, também é um relevante componente do valor adaptativo dos organismos, assim como a fertilidade, devido a sua direta ligação com a reprodução, mais precisamente com a produção de descendentes. Ela pode ser definida de três diferentes formas: a viabilidade ovo-larva ("*hatchability*"), ou seja, aqueles ovos que eclodiram em larvas; a viabilidade larva-pupa, que é a proporção de larvas que conseguem se desenvolver e chegar ao estado de pupa; e por fim a viabilidade pupa-imago que é quantidade de indivíduos adultos que emergem das pupas (DAVID et al., 2014).

Outro caráter importante da história de vida é a longevidade, o período de vida dos indivíduos, o qual é determinado pelos processos fisiológicos que levam à senescência, ou seja, os eventos degenerativos resultantes do envelhecimento. Diferentes hipóteses foram propostas para explicar a evolução da senescência. A primeira delas, conhecida como hipótese do acúmulo de mutações, prediz que se o efeito de mutações deletérias fosse restrito a idades mais avançadas, seria possível que houvesse a transmissão desses alelos para a próxima geração sem que o efeito negativo dessas mutações estivesse presente na vida inicial dos parentais e interferisse em seu valor adaptativo. Nessa situação, a seleção natural seria fraca na eliminação dessa mutação e, durante o tempo evolutivo, tais mutações com características neutras no início da vida se acumulariam na população por meio da deriva genética, o que levaria à evolução do envelhecimento (MEDAWAR, 1946; 1952). A partir dessa ideia de Medawar, George C. Williams (1957) propôs uma nova teoria que viria a ser conhecida como hipótese pleiotrópica antagonística. Nela, o autor propôs que mutações ou alelos teriam efeitos pleiotrópicos em diferentes idades, no qual variantes genéticas poderiam exibir efeitos benéficos no começo da vida enquanto no final da vida dos organismos poderia exibir efeitos deletérios (WILLIAMS, 1957).

A longevidade é muito variável entre as espécies, populações, e até mesmo em indivíduos da mesma população (FINCH, 1990; ROSE, 1991; STEARNS, 1992; FLATT; SCHMIDT, 2009; FABIAN; FLATT, 2011, 2012). Além disso, a longevidade, assim como a sobrevivência, são muito influenciados por fatores ambientais. Os drosofilídeos, de modo geral, são altamente sensíveis e plásticos às mudanças no ambiente, sendo que essas mudanças podem causar alterações drásticas na longevidade ou capacidade de sobrevivência deles. Diversos fatores podem interferir nesse componente biológico como a dieta, umidade, temperatura, entre outros. Frequentemente as populações da natureza vivenciam ameaças a sua sobrevivência como temperaturas extremas, variação na umidade ou até escassez de alimentos e esses fatores são denominados estresse (FINCH, 1990; ROSE, 1991; STEARNS, 1992; FLATT; SCHMIDT, 2009; KENYON, 2010; FABIAN; FLATT, 2011, 2012; FLAT et al., 2013).

Os ambientes estão em constante mudança e por isso muitas vezes impõem grandes desafios à sobrevivência e também à reprodução do organismo, visto que o sucesso reprodutivo está atrelado à sobrevivência individual. A evolução das características relacionadas à reprodução e longevidade podem ser resultados de

adaptações que proporcionam o sucesso reprodutivo tanto nas fêmeas como nos machos (REDMER et al., 1996), possibilitando que mesmo sob circunstâncias de alteração ambiental, os indivíduos possam apresentar diferentes mecanismos que otimizam o valor adaptativo. As condições ambientais variam ao longo da distribuição de um organismo e a seleção deve levar a respostas às condições locais, podendo culminar com uma variação espacial nas características da história de vida. (KIRKWOOD, 1977; KIRKWOOD et al., 2000; FLATT; SCHMIDT, 2008; FLAT et al., 2013).

Isolamento reprodutivo

Uma espécie, de acordo com o conceito biológico, pode ser definida por um grupo de indivíduos de uma determinada população que são capazes de cruzar e possuem fluxo gênico entre si, mas são isolados reprodutivamente de outros grupos/populações com características semelhantes (DOBZHANSKY, 1937; MAYR, 1940; COYNE; ORR, 2004). A primeira vez que esse conceito apareceu foi em 1935 (EMERSON, 1935) e desde então foi debatido por diversos autores para explicar as relações reprodutivas entre os organismos, recebendo destaque a partir de contribuições de Mayr e Dobzhansky (DOBZHANSKY, 1951; MAYR, 1940, 1959, 1963). Westram e colaboradores em uma revisão recente (2022), em concordância com estudos anteriores, definem que o isolamento reprodutivo (IR) está atrelado ao fluxo gênico, porque o nível dessa troca gênica é o que determina até que ponto as populações podem evoluir independentemente. Dessa forma, compreender a definição de isolamento reprodutivo é um tema central no entendimento do processo de especiação em organismos de reprodução sexuada e relações entre as espécies (WESTRAM et al., 2022).

As barreiras reprodutivas podem ser do tipo pré-zigótica, atuando antes da formação do zigoto impedindo o processo de cópula e fertilização e pode acontecer devido a preferência de habitats, especificidade de nicho, incompatibilidade de gametas, fatores comportamentais (como cruzamentos preferenciais e diferenças na corte) e mecânico (como morfologia da genitália) (TURISSINI et al., 2018); ou do tipo pós-zigótica, resultando em incompatibilidades que levam à redução do valor adaptativo da prole híbrida em relação aos parentais, podendo causar problemas na reprodução pela

esterilidade ou inviabilidade no desenvolvimento dos híbridos F1 ou F2 (ORR; PRESGRAVES, 2000; PRESGRAVES, 2010; TURISSINI et al., 2018).

O isolamento reprodutivo surge em muitos casos como um subproduto da ação da seleção natural ou deriva genética atuando nas populações, promovendo o rompimento do fluxo gênico e assim a ocorrência da especiação. Dois fatores genéticos podem contribuir para a evolução do isolamento reprodutivo pré-zigótico em populações naturais, um deles é conhecido como efeito carona que acontece quando a seleção natural favorece um determinado loco e os genes em locos ligados também podem aumentar em frequência (DODD, 1989). O outro é denominado pleiotropia e acontece quando um gene influencia em mais de uma característica fenotípica do organismo, podendo causar algum tipo de isolamento (RIDLEY, 2006).

Coyne e Orr contribuíram muito para o entendimento do isolamento reprodutivo (1989, 1997) demonstrando por meio de cruzamentos interespecíficos de 197 espécies de drosofilídeos alguns padrões observados, sendo eles: 1) o acasalamento seletivo, esterilidade e inviabilidade do híbrido aumenta gradativamente e proporcionalmente ao aumento da distância genética entre os pares estudados; 2) o menor valor adaptativo por parte dos híbridos, em especial a esterilidade, geralmente afeta os machos primeiro como um exemplo da regra de Haldane (1922) - que postula que quando há esterilidade híbrida em intercrossamentos o sexo heterogamético será afetado primeiro; 3) pares de populações distintas que vivem em simpatria podem desenvolver uma preferência por acasalamento entre pares geneticamente semelhantes mais rápido em comparação a populações que vivem em alopatria, sugerindo que populações diferentes que vivem no mesmo ambiente podem sofrer especiação mais rápido a partir da ação do reforço (COYNE; ORR, 1997; COYNE; ORR, 2004).

Os primeiros trabalhos que buscaram entender as bases genéticas do isolamento reprodutivo foram realizados em espécies crípticas de *Drosophila* por Dobzhansky e Patterson (DOBZHANSKY, 1944; PATTERSON; DOBZHANSKY, 1945). Apesar de estudos sobre isolamento em outros organismos serem realizados posteriormente (HOFREITER et al., 2004; LITI et al., 2006; AMATO et al., 2007), os trabalhos envolvendo indivíduos do gênero *Drosophila* são os mais frequentes, visando a compreensão de mecanismos ecológicos, genéticos e comportamentais desse isolamento (NOOR et al., 2001; SAWAMURA; TOMARU, 2002; MALLET, 2006; NANDA;

SINGH, 2012; LATURNEY; MOEHRING, 2012). Dessa forma, os estudos em drosofilídeos têm um papel muito importante também na caracterização de genes considerados responsáveis pelos processos de isolamento reprodutivo (ORR, 2005; PRESGRAVES, 2010; NOSIL; SCHLUTER, 2011).

Alguns exemplos de genes que podem causar o isolamento reprodutivo e possuem efeitos deletérios em híbridos foram descritos em espécies do grupo *melanogaster*. O *OdsH* (*Odysseus*), observado em cruzamentos de *D. simulans* x *D. mauritiana*, que pode resultar em esterilidade do macho híbrido a partir de uma desregulação da expressão nos testículos (TING et al., 1998; SUN et al., 2004); *Hmr* (*Hybrid male rescue*) que pode ser letal para machos e fêmeas da F1, caracterizado em híbridos de cruzamentos entre *D. simulans* x *D. melanogaster* (BARBASH et al., 2000; BARBASH; ASHBURNER, 2003; BARBASH et al., 2004), *Nup98* (nucleoporina 96-98) que causa letalidade em híbridos de *D. melanogaster* x *D. simulans* (PRESGRAVES et al., 2003), *Zhr* (*zygotic hybrid rescue*) que é letal à progênie em nível embrionário em híbridos de *D. melanogaster* x *D. simulans* (SAWAMURA; YAMAMOTO, 1993; ORTÍZ-BARRIENTOS; NOOR, 2005).

Em relação ao grupo *saltans* de *Drosophila*, sabe-se que o isolamento reprodutivo entre espécies de diferentes subgrupos é completo, entretanto, o isolamento reprodutivo dentro de um mesmo subgrupo pode variar dependendo do subgrupo e das espécies consideradas. O estudo do isolamento reprodutivo no subgrupo *saltans* foi realizado por Bicudo (1973) em sete espécies distribuídas do Haiti até o sudeste do Brasil (*D. saltans*, *D. prosaltans*, *D. septentriosaltans*, *D. austrosaltans*, *D. lusaltans*, *D. pseudosaltans*, *D. nigrosaltans*) e o isolamento entre elas aconteceu em nível de inseminação. A partir de dissecação das fêmeas parentais observou-se que em algumas direções de cruzamentos não havia fêmeas inseminadas, apesar disso, em alguns deles houve produção de híbridos. A autora observou também que linhagens dessas espécies com distribuição sobreposta da Costa Rica possuem isolamento reprodutivo completo. Dentre as linhagens estudadas, espécies que são separadas geograficamente como *D. saltans* e *D. prosaltans* podem produzir híbridos férteis. A autora sugeriu que a divergência entre essas espécies pode ter acontecido de forma alopátrica e em algum momento histórico elas terem retornado em simpatria – favorecendo cruzamentos preferenciais entre indivíduos da mesma espécie (BICUDO, 1973ab).

Ainda no subgrupo *saltans*, Bicudo (1978) realizou intercruzamentos de linhagens da América Central e América do Sul de *D. prosaltans*. A partir dos resultados obtidos a autora observou que houve a formação de três grupos distintos quanto à distribuição geográfica e de isolamento reprodutivo. Um deles é formado por linhagens do norte da América do Sul, da Colômbia, Guiana e Venezuela; outro da América Central que englobou linhagens da Costa Rica e Panamá; e o último por linhagens brasileiras. Cruzamentos entre essas linhagens foram realizados e mostraram isolamento entre elas, sendo que os intercruzamentos das linhagens brasileiras com as demais apresentaram isolamento mais evidente (BICUDO, 1978).

Já no subgrupo *sturtevantii*, o estudo do isolamento reprodutivo foi majoritariamente realizado a partir de cruzamentos por casal e em massa de *D. magalhães*, *D. sturtevantii* e *D. milleri* (BICUDO, 1979; HOSAKI-KOBAYASHI; BICUDO, 1994), demonstrando graus variáveis de isolamento reprodutivo entre as espécies. Recentemente foi feita a descrição de uma nova espécie do subgrupo *sturtevantii*, conhecida como *D. lehrmanae* (MADI-RAVAZZI, et al., 2021). A princípio acreditava-se que indivíduos dessa linhagem tratavam-se de *D. sturtevantii* pela morfologia do edeago, entretanto, baseado em uma série de experimentos envolvendo marcadores moleculares, morfológicos e também intercruzamentos, os autores chegaram à conclusão que os indivíduos dessa linhagem podem ser caracterizados como uma nova espécie do subgrupo. Os intercruzamentos foram entre machos e fêmeas de *D. lehrmanae* com as espécies *D. sturtevantii*, *D. dacunhai* e *D. milleri* (pertencentes ao subgrupo *sturtevantii*) para analisar o isolamento reprodutivo entre elas. A fecundidade e fertilidade foram estudadas, assim como a presença ou não de espermatozoides na espermateca das fêmeas.

A partir da realização dos intercruzamentos entre *D. lehrmanae* e as outras espécies do subgrupo *sturtevantii* previamente citadas, foi observada a existência de barreiras de isolamento pré-zigótico entre elas. Não foram encontrados espermatozoides nas espermatecas das fêmeas parentais dos intercruzamentos de fêmeas *D. lehrmanae* com machos de linhagens brasileiras de *D. sturtevantii*. Além disso, nos intercruzamentos entre *D. lehrmanae* e *D. milleri* não foi observado a postura de ovos pelas fêmeas. Dos 26 intercruzamentos realizados, 77% deles não produziram descendentes e dos 23% restantes foram obtidos 179 imagos, sendo 99 fêmeas e 80 machos. Desse número total, 176 foram obtidos em intercruzamentos entre machos de *D. lehrmanae* e fêmeas de *D. sturtevantii*, contudo, no cruzamento recíproco não houve descendência, sugerindo uma

incompatibilidade unilateral. Em ambas as direções de cruzamentos entre *D. lehrmanae* e *D. dacunhai* foi observada uma baixa fecundidade, com o nascimento de dois machos em uma direção e somente um na outra.

No subgrupo *parasaltans* também foram realizados intercruzamentos das espécies *D. parasaltans* e *D. subsaltans* no qual demonstraram isolamento completo entre as espécies estudadas (BICUDO; PRIOLI, 1978). Em relação ao subgrupo *elliptica*, alvo deste trabalho, somente um estudo foi realizado em linhagens de *D. emarginata*, provindas de diferentes localidades, e os dados sugeriram um isolamento incipiente entre elas (BICUDO; PRIOLI, 1978). Foram utilizadas populações oriundas do México e Costa Rica e realizados tanto intercruzamentos quanto intracruzamentos. Os intercruzamentos foram tão bem sucedidos quanto os intracruzamentos em relação à produtividade, entretanto, as autoras sugeriram a existência de isolamento incipiente entre fêmeas do México e machos da Costa Rica devido a uma menor fertilidade e fecundidade nessa direção.

Coevolução das genitálias

Na maioria dos animais cuja fertilização é interna, a genitália masculina é um dos órgãos que evoluem mais rapidamente em comparação com outras partes do corpo e geralmente é uma das primeiras características morfológicas a divergir durante o processo de especiação (EBERHARD, 1985; EBERHARD; LEONARD, 2010; SOTO et al., 2013; ROMAN; MADI-RAVAZZI, 2021).

De todas as interações entre os sexos de espécies com fertilização interna, a interação das genitálias durante o processo copulatório é o mais direto, assim, a coevolução entre a morfologia genital dos machos e fêmeas é esperada, e, essa covariação morfológica entre a genitália masculina e feminina tem sido bastante evidenciada na literatura em diversos táxons (SOTA; KUBOTA, 1998; ILLANGO; LANE, 2000; ARNQVIST; ROWE, 2002; BRENNAN et al., 2007; RONN et al., 2007; KUNTNER et al., 2009; TATARNIC; CASSIS, 2010; CAYETANO et al., 2011; EVANS et al., 2011, 2013; SIMMONS; GARCÍA-GONZÁLEZ, 2011; YASSIN; ORGOGOZO, 2013).

A coevolução da genitália pode ocorrer quando mudanças evolutivas em uma característica genital encontrada em determinado sexo exerce pressão seletiva no outro sexo. Assim, o momento mecânico da cópula muitas vezes é resultado da coevolução das estruturas genitais masculinas e femininas. (BRENNAN; PRUM, 2015). O estudo dos traços morfológicos genitais fornece oportunidade de entender a evolução quando mudanças morfológicas e funcionais de um sexo pode afetar diretamente o outro (BRENNAN, 2016).

A morfologia genital masculina pode exercer pressão seletiva nas fêmeas que, como consequência, desencadeia mudanças na fisiologia e comportamento, assim como na morfologia da estrutura. Essas respostas das fêmeas podem ocasionar na seleção de características da genitália masculina levando a ciclos de coevolução. Durante a coevolução das genitálias a seleção pode atuar em determinadas características das fêmeas que evitem danos no seu trato reprodutivo, assim como mudanças comportamentais e fisiológicas que garantem o comando dela durante o acasalamento (EBERHARD, 2004; ARNQVIST; ROWE, 2005; SIMMONS, 2014; LANGERHANS et al, 2016).

Estudos comparativos de espécies e/ou populações podem fornecer evidências sobre as mudanças dinâmicas na morfologia da genitália de ambos os sexos. Isso inclui investigações sobre correspondência morfológica, compatibilidade entre estruturas morfológicas assim como estudos com estruturas correspondentes (RONN et al., 2007; CAYETANO et al., 2011; KAMIMURA; MITSUMOTO, 2011, 2012). Abordagens microevolutivas podem incluir estudos de correlação entre características genitais (correspondência ou antagônica), manipulação experimental para medir variações no valor adaptativo de mudanças na morfologia genital em ambos os sexos e também abordagens evolutivas experimentais que informam diretamente sobre as pressões seletivas que atuam nas características genitais e na presença de alterações em ambos os sexos (BRENNAN; PRUM, 2015). Assim, a variação morfológica é o resultado da mudança nos genes, enquanto o destino dessas mudanças depende da ação da seleção atuando sobre a morfologia (YASSIN, 2016).

Diferente da evolução rápida das genitálias masculinas em animais de fertilização interna (EBERHARD, 1985; ARNQVIST, 1998; SIMONS et al., 2009), estudos das genitálias femininas em espécies do gênero *Drosophila* demonstraram que o aparato

genital das fêmeas apresenta menor variação morfológica quando comparadas às espécies próximas que divergiram há 3 milhões de anos (JAGADEESHAN; SINGH, 2006), evidenciando uma evolução morfológica lenta da genitália feminina em comparação à masculina. Este é um dos motivos que pode explicar a existência de poucos trabalhos abordando a coevolução das genitálias (YASSIN; ORGOGOZO, 2013).

Apesar da falta de estudo da genitália feminina e menor variação em comparação à masculina em diversos táxons, sabe-se que a variação da genitália feminina pode ser espécie-específica. Algumas hipóteses surgiram para explicar esse fenômeno, duas em específico: a primeira diz que a estrutura genital da fêmea se origina a partir de somente uma estrutura, o duto gonadal que é responsável pela postura de ovos (ou prole) fora do corpo, já a genitália masculina evoluiu a partir de uma série de apêndices motores e sensoriais do corpo. A segunda diz que a genitália feminina pode ser menos variável pela força da seleção natural agindo sobre a estrutura porque, diferentemente da genitália masculina, a genitália feminina é alvo da seleção pois também possui a função de oviposição (BROWN et al., 1995; BRENNAN; PRUM, 2015; BRENNAN, 2016).

Em um estudo de nove espécies do subgrupo *Drosophila melanogaster* realizado por Yassin e Orgogozo (2013) foi evidenciado a existência de coevolução de estruturas morfológicas de machos e fêmeas em nível copulatório. Nesse trabalho os autores demonstraram que há coevolução entre estruturas genitais espécie-específicas dos machos e fêmeas que entram em contato durante o momento da cópula, sendo que algumas dessas estruturas morfológicas femininas fornecem proteção às estruturas morfológicas dos machos que possam causar danos a elas. Uma dessas estruturas é conhecida como "*oviscapt pouch*", descrita em *D. simulans* e que consiste em uma depressão da margem postero-dorsal do ovipositor que acredita-se entrar em contato com a parte posterior do epândrio da genitália dos machos durante a cópula. Outras estruturas também foram identificadas em diversas espécies como "*oviscapt furrows*" na margem postero-dorsal do ovipositor e também estruturas semelhantes a "escudos" como escudo vaginal e ventral em algumas espécies. Dessa forma, os autores demonstram que há a coevolução da morfologia da genitália feminina com estruturas genitais masculinas que entram em contato direto durante a momento da cópula (BÄCHILI et al., 2004; YASSIN; ORGOGOZO, 2013).

Alometria

A alometria descreve como as características dos organismos variam de acordo com o tamanho e se refere a escala biológica no geral, seja por traços morfológicos, fisiológicos ou ecológicos. Além disso, elucidada como os traços se relacionam uns com os outros por meio de mecanismos funcionais que geram as relações de escalas entre os traços e como elas se refletem no processo evolutivo (SHINGLETON, 2010). Então, a alometria é essa relação da proporção entre os tamanhos de traços morfológicos e o tamanho corporal, ela descreve como as características de um determinado organismo se relacionam com outras características ou com o tamanho do corpo (SHINGLETON et al., 2007).

Há três níveis reconhecidos de alometria: "dinâmica" (ou ontogenética), que é mudança na escala em um indivíduo durante o desenvolvimento; "estática", mudança na escala entre indivíduos pertencentes à mesma população no mesmo estágio de desenvolvimento; e "evolutiva", ou seja, mudança na escala entre populações e espécies (STERN; EMLÉN, 1999). Tanto a alometria evolutiva quanto a estática surgem porque existe uma covariação no tamanho das partes do corpo entre os indivíduos em um determinado estágio de desenvolvimento. Assim, a variação do tamanho do traço fenotípico e do corpo é consequência da variação em um determinado estágio de desenvolvimento, portanto, tanto a alometria estática quanto evolutiva são consequências de mudanças que ocorrem na alometria dinâmica (SHINGLETON et al., 2007).

Para compreender os mecanismos que regulam a alometria, é necessário entender também os mecanismos de desenvolvimento que permitem a variação no crescimento dos caracteres fenotípicos e do corpo. Para a alometria evolutiva a variação no crescimento pode ser causada por diferenças genéticas entre indivíduos de diferentes espécies; já na alometria estática a variação no tamanho se dá principalmente em diferenças genéticas entre indivíduos, assim como diferenças no ambiente em que eles se desenvolveram (assim como uma interação entre esses dois fatores) (SHINGLETON et al., 2007; PÉLABON et al., 2014).

Em nível genético, o aumento do corpo e de órgãos depende de genes que controlam o metabolismo alimentar, sinalização hormonal, tamanho e/ou divisão celular, e a alometria pode resultar da expressão diferencial de genes de crescimento entre os

órgãos do corpo (VEA; SHINGLETON, 2021). Em estudos realizados com *D. melanogaster* identificaram o fator de transcrição FOXO como um forte componente na estabilidade do tamanho das estruturas genitais masculina em comparação com outras partes do corpo (TANG et al., 2011), mas devido à sua anatomia complexa e o tamanho pequeno das estruturas genitais masculina na maioria das espécies (quase 1/10 do comprimento do corpo), a base genética e do desenvolvimento da genitália masculina em insetos permanece pouco conhecida (VINCENT et al., 2019).

Subgrupo *elliptica* de *Drosophila*: espécies com gigantismo fálico

O grupo *saltans* de *Drosophila* atualmente consiste de 23 espécies incluídas em cinco subgrupos: *cordata*, *elliptica*, *parasaltans*, *saltans* e *sturtevantii*. Esses subgrupos foram subdivididos principalmente com base na pigmentação cuticular e na anatomia da genitália masculina (MAGALHÃES; BJORNBERG, 1957; MAGALHÃES, 1962; MOURÃO; BICUDO, 1967; GUILLÍN; RAFAEL, 2017; MADI-RAVAZZI et al., 2021). Os subgrupos e suas espécies diferem amplamente em sua distribuição geográfica e abundância ecológica. A distribuição geográfica das espécies do grupo *saltans* abrange toda a região do México ao Estado do Rio Grande do Sul no Brasil, incluindo as ilhas caribenhas. Os subgrupos *parasaltans* e *cordata* são encontrados na região Neotropical e algumas espécies dos subgrupos *elliptica*, *sturtevantii* e *saltans* são encontradas nas regiões Neotropical e Neoártica (MAGALHÃES, 1962; MOURÃO; BICUDO, 1967; GUILLÍN; RAFAEL, 2017).

Os primeiros estudos realizados com o grupo *saltans* datam de 1962 por Throckmorton e Magalhães. Os autores avaliaram o acúmulo de pteridina no corpo das espécies do grupo. Outros estudos foram realizados buscando entender o grau de isolamento reprodutivo e o polimorfismo das inversões cromossômicas nos diferentes subgrupos (BICUDO, 1973a; BICUDO, 1973b); assim como estudos moleculares envolvendo genes nucleares e mitocondriais (O'GRADY et al, 1998; RODRIGUEZ-TRELLES et al., 1999). As relações filogenéticas entre os subgrupos foram propostas a partir de caracteres morfológicos obtidos de dados da literatura (YASSIN, 2009) e também pela avaliação de características da genitália masculina avaliada por microscopia eletrônica de varredura (SOUZA et al., 2014).

Estudos mais recentes do nosso grupo de pesquisa enfatizaram uma estruturação moderada em populações de *D. sturtevanti*, utilizando marcadores microssatélites espécie-específicos (TRAVA et al., 2021); e a formação de três grandes grupos populacionais com esta espécie (norte, central e sul) em outro estudo a partir de análises moleculares com marcadores mitocondriais (ZORZATO et al, 2022), evidenciando diferenciação genética entre estas populações. Uma nova espécie, *D. lerhmanae*, foi descrita por nosso grupo de pesquisa utilizando metodologias integrativas de análises (morfometria dos edeagos e asas, genes mitocondriais, microscopia eletrônica de varredura, padrão de pigmentação das fêmeas e isolamento reprodutivo) (MADIRAVAZZI et al, 2021). Em outro artigo publicado também por nosso grupo de pesquisa, o qual descreve as diferenças das estruturas morfológicas da terminália masculina de 16 espécies do grupo *saltans*, inclusive das três espécies do subgrupo *elliptica* a serem analisadas no presente estudo, *D. emarginata*, *D. neosaltans* e *D. neoelliptica*, indicam a rápida evolução das estruturas fálicas (edeagos), além de ilustrar o quão grande são os edeagos das espécies *D. emarginata* e *D. neoelliptica* em relação às outras espécies do grupo (ROMAN et al., 2021).

A presença de edeagos grandes é uma característica morfológica peculiar que evoluiu no subgrupo *elliptica* do grupo *saltans*, eles possuem aproximadamente 1/2 do comprimento do corpo do macho, o que não é um padrão observado em geral em Drosophilidae e em outros organismos. Em uma pesquisa realizada a partir de dados da literatura, observou-se que nas espécies da família Drosophilidae existe uma proporcionalidade entre o tamanho do corpo e o edeago, entretanto, as espécies do subgrupo *elliptica* do grupo *saltans* não apresentam este padrão (DAVID; MADIRAVAZZI; YASSIN, 2022, comunicação pessoal).

O subgrupo *elliptica*, objeto do presente estudo, é composto por 4 espécies: *D. elliptica*, *D. emarginata*, *D. neosaltans* e *D. neoelliptica*. Este subgrupo foi pouco abordado em estudos anteriores, talvez pela dificuldade de coletar suas espécies e pela difícil manutenção em laboratório. O único artigo que avaliou as relações reprodutivas neste subgrupo é o de Bicudo (1978), que utilizou duas linhagens geográficas de *D. emarginata* (México e Costa Rica) verificando a existência de isolamento incipiente entre elas. A inexistência de estudos neste subgrupo e a característica notável do gigantismo fállico de suas espécies nos motivou a delinear o presente trabalho.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar traços da história de vida, as barreiras reprodutivas e a alometria dos órgãos reprodutores de machos e fêmeas das espécies do subgrupo *elliptica* de *Drosophila* que possuem a característica de gigantismo fálico.

Objetivos específicos

- Mensurar parâmetros da história de vida (tempo de corte e de cópula, fertilidade, fecundidade, tempo de desenvolvimento e longevidade) de três espécies do subgrupo *elliptica* (*D. emarginata*; *D. neosaltans* - Aguaí e Ouro Preto; *D. neoelliptica*);
- Identificar a associação entre os parâmetros da história de vida das espécies;
- Analisar as barreiras reprodutivas entre as espécies por meio de intercruzamentos;
- Avaliar por meio da morfometria a relação da alometria corporal (tamanho do tórax e asa) e tamanho do edeago e do ovipositor;
- Investigar a existência de coevolução dos órgãos reprodutores em relação ao tamanho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parâmetros reprodutivos da história de vida

As linhagens das espécies do subgrupo *elliptica* que foram utilizadas nesse estudo, e suas procedências geográficas, estão na descritas Tabela 1. A história de vida para cada espécie foi avaliada por meio dos seguintes componentes: tempo de corte e cópula (observação dos casais), fertilidade (número de ovos); fecundidade (número de imagos); tempo de desenvolvimento (ovo-imago); longevidade (número médio de dias de vida dos parentais). Todas as espécies foram mantidas em meio de cultura padrão de *Drosophila* (banana e *Sacharomyces cerevisiae*) e em câmaras de temperatura constante $22^{\circ}\text{C} \pm 1$, com ciclo de dia e noite controladas automaticamente, 12h com a luz ligada e 12h com a luz desligada.

Tabela 1 – Linhagens e procedência geográfica das espécies do subgrupo *elliptica* de *Drosophila*.

Espécies	Linhagens	Procedência geográfica	Coordenadas
<i>D. emarginata</i>	TIR	Costa Rica, Tirimbina	10°25'01.5" S, 84°07'04.7" O
<i>D. neosaltans</i>	OP	Ouro Preto, Minas Gerais	20°37'64" S, 43°55'72" O
	SC	Aguai, Santa Catarina	28°36'52.8"S, 49°33'27" O
<i>D. neoelliptica</i>	CAN	Serra da Cantareira, São Paulo	23°27'15.1" S, 46°38'9.3" O

Fonte: Elaborado pelo autor

Tempo corte e de cópula: cinco casais com oito dias de idade, em média, foram colocados em tubos contendo meio de cultura padrão, com dez réplicas para cada espécie e linhagem analisada. Para todos os cruzamentos foram realizadas observações visuais por duas horas durante o período da manhã (10 às 12h) e o tempo do início e término da corte e da cópula foram computados. O início e término da corte foi contabilizado no momento em que um macho iniciou os comportamentos da corte em uma fêmea até o momento do início da cópula, caso esse macho desistisse da fêmea durante esse período e fosse cortejar outra, uma nova contagem era realizada. O tempo de cópula foi mensurado desde o momento da união dos casais até o término com a separação física dos mesmos. Esse experimento foi realizado até que aproximadamente 10 cópulas para cada espécie e linhagem fossem obtidas. Esses casais (parentais) também foram utilizados para avaliar a longevidade das espécies.

Fertilidade: Os casais utilizados no experimento de tempo de corte e de cópula foram transferidos para novos tubos com meio de cultura e o número de ovos foi contado diariamente durante sete dias com o auxílio de um microscópio estereoscópio (lupa). Em caso de morte de algum macho ou fêmea parental durante o período de observação de sete dias, estes foram repostos com fêmeas e machos virgens da mesma idade que foram separados juntos aos parentais utilizados no experimento.

Fecundidade: Este parâmetro reprodutivo foi avaliado em continuidade com os mesmos casais, por meio da contagem do número de machos e fêmeas obtido em cada cruzamento, até dez dias após o início do nascimento. Após o início do nascimento, a contagem dos imagos foi realizada diariamente.

Tempo de desenvolvimento: Foi avaliado pelo número médio de dias entre a oviposição até a emergência dos imagos dos mesmos casais iniciais do experimento 3.1.1.

Longevidade: Após a última transferência dos parentais para novos tubos, os casais foram mantidos em tubos com meio de cultura e transferidos para tubos novos a cada cinco dias até a sua morte. A análise e contagem foram efetuadas diariamente e computadas por sexo.

3.2 Experimentos do isolamento reprodutivo (IR)

Para esse estudo, foram realizados inter cruzamentos em ambas as direções entre as três espécies e linhagens do subgrupo *elliptica* (Tabela 1). Foram utilizados cinco casais com 8 dias de idade em média, com três réplicas para cada tipo de cruzamento, os quais foram colocados em tubos contendo meio de cultura padrão de banana e mantidos em câmaras de temperatura constante $22^{\circ}\text{C}\pm 1$. Foram realizadas transferências desses casais para tubos novos a cada 3 dias durante 2 semanas. Foi registrada a presença de ovos, larvas, pupas e número de imagos dos inter cruzamentos.

3.3 Preparação das lâminas dos edeagos e ovipositores para as análises por microscopia óptica

Para a preparação das lâminas dos edeagos e ovipositores foi utilizada a técnica de Kaneshiro (1969), com modificações (TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006). Com o auxílio de um estereomicroscópio e de estiletos, os dois terços distais do abdômen das moscas (machos e fêmeas) foram extraídos e colocados em um tubo de microcentrífuga contendo solução de KOH 10%. Estes tubos com KOH foram aquecidos durante 15 minutos (em banho-maria) e depois o material foi lavado com água. Por fim, o material foi levado para outro microtubo contendo uma gota de Eugenol, permanecendo durante 24h ou mais. Após este período, com o auxílio de um estereomicroscópio e estiletos, os edeagos dos machos foram separados e montados em lâminas contendo uma gota de Permout mais a lamínula. As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico.

Para preparação das lâminas dos ovipositores das fêmeas foi necessário o uso de uma solução de gelatina com glicerina. Pequenos pedaços dessa gelatina glicerinada foram colocados em lâminas e aquecidos até atingir o estado líquido e possibilitar a inserção da peça. Em seguida, os ovipositores foram colocados lateralmente sob a lâmina e, uma vez que a gelatina se solidificou, uma lamínula foi colocada sob a mesma. As lâminas foram analisadas e fotografadas em estereomicroscópio, para análise posterior. Para uma maior nitidez e resolução das imagens obtidas foi utilizado o programa Helicon 3D Viewer.

3.4 Análises morfométricas do tórax, asa, edeago e ovipositor

Para esta análise, para cada espécie e linhagem foram utilizados 10 machos e 10 fêmeas de 8 dias de idade. De cada fêmea e macho foram tomadas medidas do tórax (Figura 1A), da asa (Figura 1B), do edeago (figura 1C,D) e do ovipositor (Figura 1E). Para a medida das asas foram feitas lâminas das mesmas, após terem sido destacadas das moscas, utilizando uma gota de solução de álcool 70% mais glicerina e lamínula. A medida do comprimento da asa foi feita conforme ilustrado na figura 1B, elas foram avaliadas a partir da articulação asa-tórax até a ponta da asa. O comprimento do edeago foi estimado pela linha traçada a partir de sua conexão intermediária com o falapódema até o ponto médio do ápice do edeago (Figura 1C) e a Figura 2 mostra o edeago de cada espécie.

Para a medida das estruturas morfológicas foi utilizado as imagens fotografadas em microscópio estereoscópio e em seguida medidas no programa Image J (ABRÀMOFF et al., 2004).

3.5 Casais em cópula

Para a análise mecânica da cópula das espécies foram avaliados casais com 8 dias de idade em média para cada espécie. Nesse experimento 5 casais foram colocados em tubos contendo meio de cultura padrão e observados até que ocorresse a cópula. Os casais em cópula foram colocados no freezer a -20°C por 30 minutos. Os casais em cópula, mortos por congelamento, foram retirados do freezer e submetidos a preparação de KOH descrita anteriormente (item 3.3). Após esse procedimento os casais foram colocados em uma gota de glicerina e fotografados por estereomicroscópio Leica modelo M205C (2019/09215-6).

3.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram efetuadas pelo programa Graphpad Prism 8.0. A contagem total dos parâmetros relacionados aos intracruzamentos, intercruzamentos e também das medidas morfométricas foram mensuradas e em seguida foram obtidos o número médio, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) dos conjuntos amostrais (as diferentes espécies e suas linhagens). Foram realizados testes de normalidade para verificar se os dados obtidos nos experimentos eram paramétricos ou não, sendo eles: Anderson-Darling, D'Agostino & Pearson, Kolgomorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Para os conjuntos de dados que passaram no teste de normalidade foi aplicado o teste ANOVA One Way para comparação entre grupos, e para os conjuntos de dados que não passaram nesses testes foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Caso detectado variância significativa no conjunto de dados, foi feita uma análise de comparação entre eles para verificar se havia diferença estatística significativa (Tukey para os paramétricos, e Dunn para não paramétricos) entre grupos.

Ainda no programa Graphpad Prism 8.0, foi realizada uma análise de correlação entre todos os parâmetros reprodutivos (tempo de corte, tempo de cópula, fertilidade,

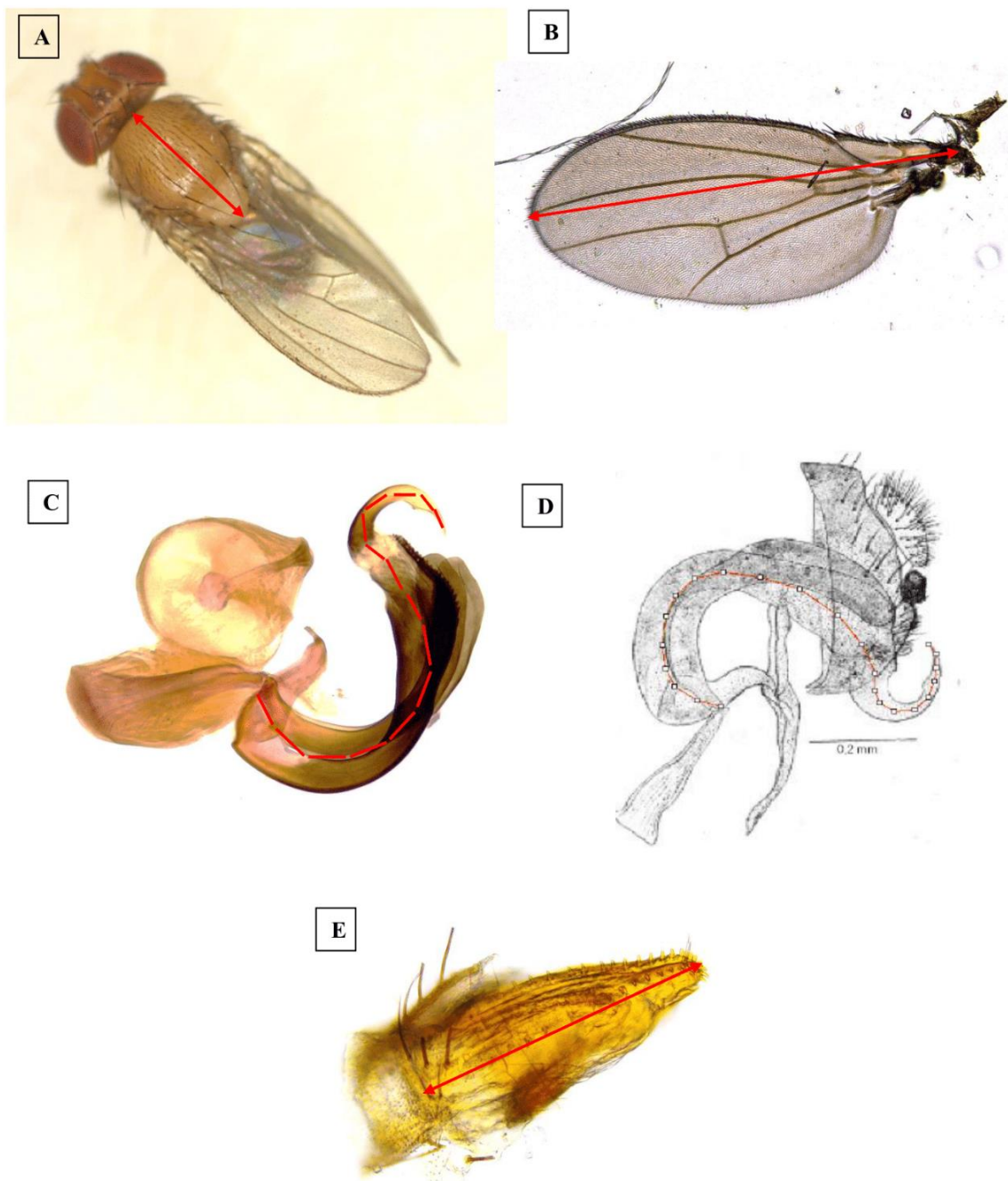
fecundidade, tempo de desenvolvimento e longevidade) e entre o comprimento do edeago e todos esses parâmetros.

Para a obtenção das curvas de sobrevivência dos intracruzamentos, foi elaborada tabela no próprio Graphpad Prism 8.0 no qual foi indicado cada dia em que houve morte de algum indivíduo (machos e fêmeas separadamente) até que todas as mortes parentais fossem contabilizadas. Além disso, foi obtido o número médio de sobrevivência dos machos e das fêmeas e em seguida esse conjunto de dados foi submetido ao teste Mantel-Cox para verificar se houve diferença significativa na sobrevivência entre ambos os sexos.

Os gráficos de alometria estática foram feitos no programa estatístico R e para obtenção dos mesmos foram utilizados os valores brutos das estruturas morfológicas descritas anteriormente - asa, tórax, edeago e ovipositor (10 machos e 10 fêmeas para cada espécie/linhagem).

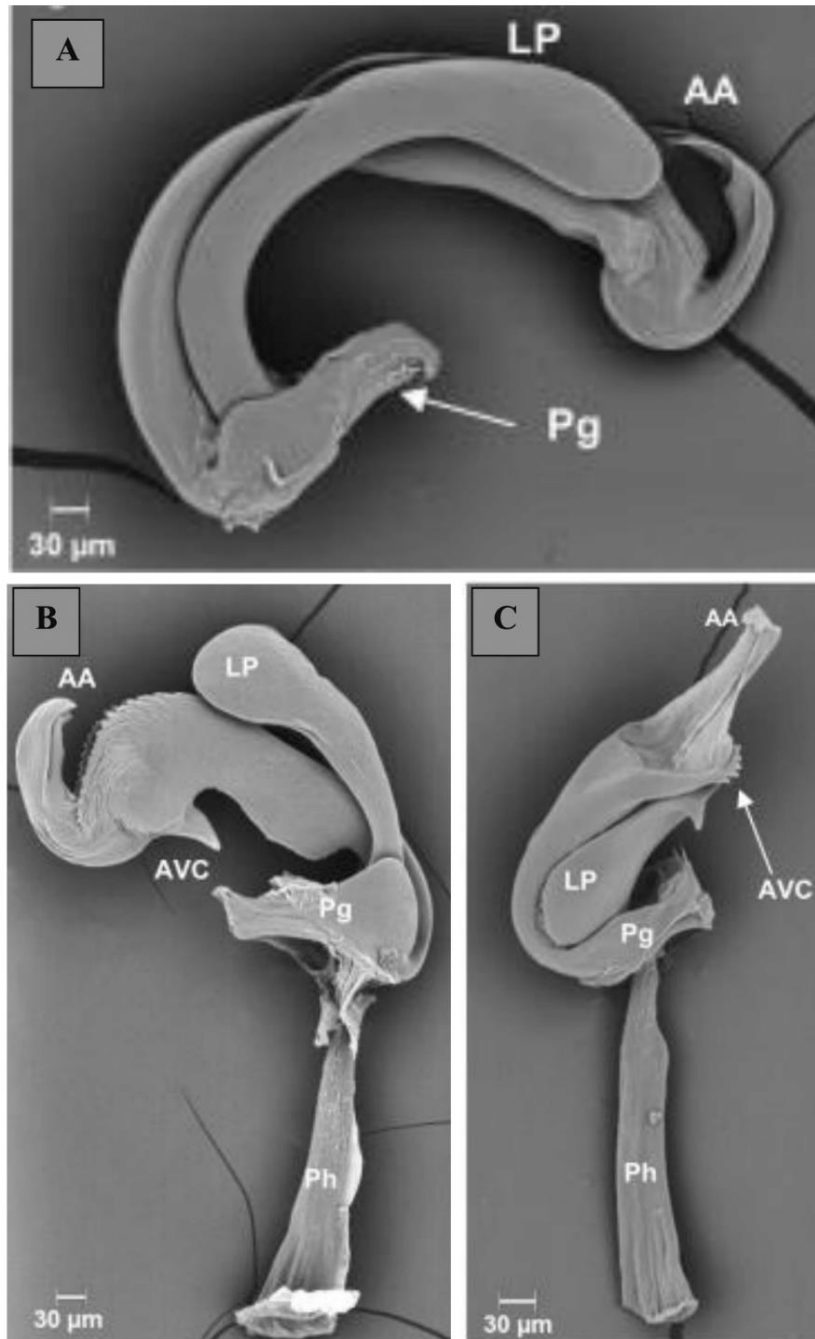
Para os traços morfométricos obtidos (comprimento do tórax, asa, ovipositor e edeago) foi realizada Análise de Componentes Principais (PCA) e uma análise de regressão linear do comprimento do tórax com os demais caracteres morfológicos transformados em log, com auxílio do programa PAST.

Figura 1 – Medições corporais realizadas nas espécies do subgrupo *elliptica*. As setas indicam as áreas mensuradas. A. Tórax; B. Asa; C. Edeago; D. Ilustração do edeago de *D. emarginata* (F = falapódema); E. Ovipositor.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura dos edeagos das espécies do subgrupo *elliptica*. A = *D. neosaltans*; B = *D. emarginata*; C = *D. neoelliptica*. AA = ápice do edeago; AVC = crista ventral do edeago; LP = pós-gonito lateral; Pg = pré-gonito; Ph = falapódema.



Fonte: ROMAN; MADI-RAVAZZI, 2021

4 RESULTADOS

4.1 História de vida

A avaliação dos componentes de história de vida foi realizada em três das quatro espécies incluídas no subgrupo *elliptica*, sendo elas: *D. emarginata* (Costa Rica - Tirimbina); *D. neoelliptica* (Serra da Cantareira, São Paulo) e duas linhagens de *D. neosaltans* (uma proveniente de Ouro Preto, Minas Gerais e a outra de Aguaí, Santa Catarina) (Tabela 1).

Corte e Cópula

O menor tempo médio da corte observado foi em *D. neosaltans* (Ouro Preto) com média aproximada de 18,1 minutos, e o maior tempo médio (20,6 minutos) foi em *D. neoelliptica*. As espécies *D. emarginata* e *D. neosaltans* (Aguaí) obtiveram o mesmo tempo da corte, cerca de 20 minutos. Pela análise de Kruskal-Wallis não foi observado diferença significativa no tempo de corte entre as espécies (Tabela 2).

Como já mencionado, o tempo de cópula foi observado visualmente desde seu início até o final e está expresso na Tabela 2. Nessas análises verificou-se que *D. neosaltans* (Aguaí) obteve a maior média (32,3 minutos), seguida de *D. neosaltans* (Ouro Preto) (30,2 minutos), *D. neoelliptica* (21,9 minutos) e *D. emarginata* (20 minutos). A partir da análise de variância entre os grupos (ANOVA One Way), foram observadas diferenças significativas do tempo da cópula entre todas as linhagens, exceto entre *D. neosaltans* (Ouro Preto e Aguaí) e também entre *D. neoelliptica* e *D. emarginata*. Aqui verificamos também uma alta variabilidade nos coeficientes de variação (CV) do tempo das cópulas entre as espécies.

Tabela 2 – Média e desvio padrão do tempo da corte e cópula nas espécies do subgrupo *elliptica* de *Drosophila*. Coeficiente de variação (CV) dos componentes de história de vida expresso em parênteses. EM= *D. emarginata*; NEO= *D. neoelliptica*; NEOS(A) = *D. neosaltans* (Aguai); NEOS(OP) = *D. neosaltans* (Ouro Preto).

Linhagens/ Parâmetros	EM	NEO	NEOS(A)	NEOS(OP)	F	p
Tempo de Corte	20 ± 9,6 (48%)	20,6 ± 3,1 (15%)	20 ± 14,8 (73%)	18,1 ± 12 (67%)	-	ns
Tempo de Cópula	20 ± 3,8 (19%)	21,9 ± 5,1 (23,7%)	32,3 ± 11 (34%)	30,2 ± 2,4 (8,2%)	9,280	****

Fonte: Elaborado pelo autor

Fertilidade e Fecundidade

A fertilidade média variou de 71,9 a 127 ovos entre as espécies estudadas. A maior fertilidade foi vista para as linhagens de *D. neosaltans*, 127 (Ouro Preto) e a menor em *D. neoelliptica* (71,9) (Tabela 3, Tabela Suplementar 2-9). A fertilidade média por casal pode ser vista na Tabela 4, destaca-se os maiores números médios para ambas as linhagens de *D. neosaltans* (21,74) (para a linhagem de Aguai e 26,08 para a de Ouro Preto) enquanto *D. emarginata* e *D. neoelliptica* obtiveram os menores valores, sendo aproximadamente 14 ovos.

A partir da comparação entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) seguido pelo teste de Dunn foi possível observar diferença significativa entre a linhagem de *D. neosaltans* (Ouro Preto) com *D. neoelliptica* e *D. emarginata* com valor $p < 0,05$. Não foi observado diferença significativa entre as outras linhagens (Figura 5).

No acompanhamento realizado durante o período de sete dias, da postura de ovos pelas fêmeas das espécies, verificou-se um comportamento diferencial entre as mesmas. O maior número da postura de ovos ocorreu nos três primeiros dias, decaindo gradativamente no tempo até o quinto dia, nota-se uma leve tendência a um aumento da postura de ovos no sétimo dia (Figura 3). Em *D. emarginata*, há uma diminuição da postura de ovos a partir do terceiro dia; em *D. neoelliptica* a postura de ovos se mantém constante a partir do segundo dia; já em *D. neosaltans* (A) observa-se uma grande

variação enquanto em *D. neosaltans* (OP) há um decréscimo da postura de ovos após o segundo dia e um leve aumento nos últimos dias de observação.

Na análise da fecundidade as linhagens de *D. neosaltans* foram as que obtiveram a maior média de descendentes 68 (Aguai) e 61,4 (Ouro Preto), enquanto *D. neoelliptica* obteve o menor número médio de descendentes (14,8) (Tabela 3). Houveram diferenças significativas entre todas as linhagens com exceção de *D. neosaltans* (Ouro Preto e Aguai) e entre *D. emarginata* e *D. neoelliptica*. A fecundidade média por casal pode ser vista na Tabela 4, observa-se que ambas as linhagens de *D. neosaltans* obtiveram a maior quantidade de imagos.

Tabela 3 – Média e desvio padrão da fertilidade e fecundidade total nas espécies do subgrupo *elliptica*. Coeficiente de variação dos componentes de história de vida expresso em parênteses (%). EM= *D. emarginata*, NEO= *D. neoelliptica*; NEOS(A) = *D. neosaltans* (Aguai); NEOS(OP) = *D. neosaltans* (Ouro Preto).

Linhagens/ Parâmetros	EM	NEO	NEOS(A)	NEOS(OP)	Valor de p	p
Fertilidade	73,9 ± 44 (60,5%)	71,9 ± 31 (43,5%)	106 ± 28 (26,7%)	127 ± 40 (31,6%)	0,0060	**
Fecundidade	21,3 ± 27 (128,5%)	14,8 ± 14,3 (97,1%)	68 ± 24,1 (35,6%)	61,4 ± 27,7 (45,2%)	0,0001	***

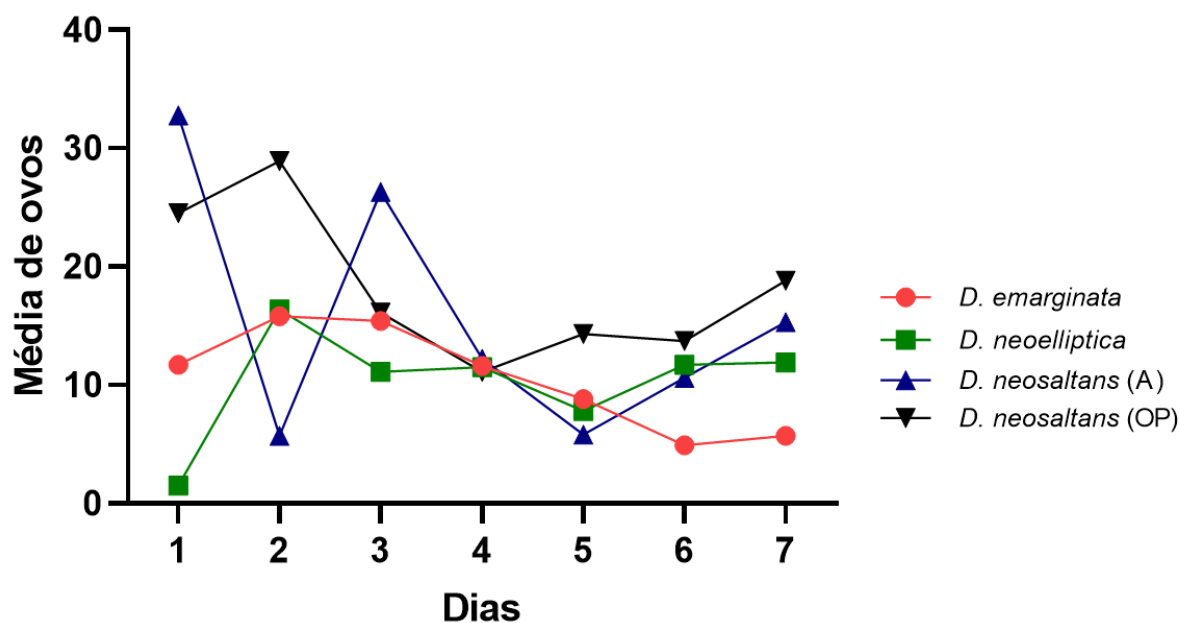
Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 4 – Fertilidade e fecundidade média das espécies do subgrupo *elliptica*, por casal. EM= *D. emarginata*, NEO= *D. neoelliptica*; NEOS(A) = *D. neosaltans* (Aguai); NEOS(OP) = *D. neosaltans* (Ouro Preto).

Linhagens/Parâmetros	EM	NEO	NEOS(A)	NEOS(OP)
Fertilidade	14,78	14,5	21,74	26,08
Fecundidade	4,82	7,45	13,62	12,58

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3 – Fertilidade média das espécies do subgrupo *elliptica* observada durante 7 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tempo de desenvolvimento

O tempo de desenvolvimento médio obtido esteve entre 19 e 21 dias, com diferenças significativas somente entre *D. neoelliptica* e *D. neosaltans* (Aguai) (Tabela 5)

Tabela 5 – Média e desvio padrão do tempo de desenvolvimento nas espécies do subgrupo *elliptica*. Coeficiente de variação dos componentes de história de vida expresso em parênteses. EM= *D. emarginata*, NEO= *D. neoelliptica*; NEOS(A) = *D. neosaltans* (Aguai); NEOS(OP) = *D. neosaltans* (Ouro Preto).

Linhas/Parâmetro	EM	NEO	NEOS(A)	NEOS(OP)	Valor de p	p
Tempo de Desenvolvimento	19,3 ± 0,97 (5%)	21 ± 1 (4,8%)	19,1 ± 1,1 (5,98%)	19,4 ± 1,4 (7,3%)	0,047	*

Fonte: Elaborado pelo autor

Longevidade

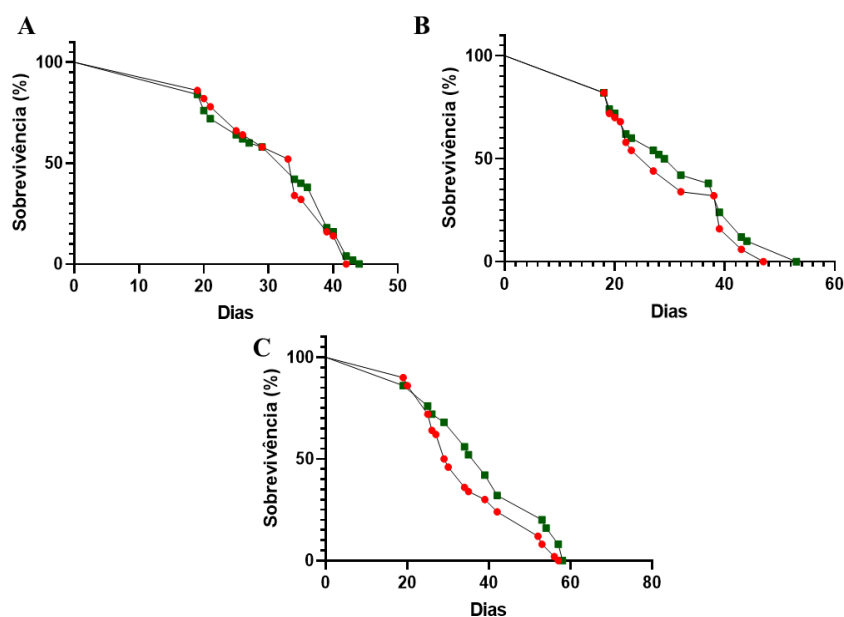
A mediana da longevidade das espécies do subgrupo *elliptica* ficou entre 29,5 e 34 dias para as fêmeas e 34 e 39 dias para os machos. Pelo teste de Mantel-Cox observa-se diferença significativa na longevidade entre fêmeas e machos em *D. neoelliptica* ($p < 0,05$). Observa-se também que as fêmeas apresentaram uma longevidade menor que a dos machos em *D. neoelliptica* e *D. neosaltans* (Aguai) (Tabela 6). A Figura 4 ilustra a curva de sobrevivência para as espécies.

Tabela 6 – Mediana da longevidade (dias) nas espécies do subgrupo *elliptica*. NEO= *D. neoelliptica*; NEOS(A) = *D. neosaltans* (Aguai); NEOS(OP) = *D. neosaltans* (Ouro Preto). * $p < 0,05$; ns = não significativo.

Linhagens/Parâmetro	NEO	NEOS(A)	NEOS(OP)
Fêmeas	29,5	27	34
Machos	39	30,5	34
Teste Mantel-Cox	*	ns	ns

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4 – Longevidade de fêmeas (curva com esferas vermelhas) e machos (curva com quadrados verdes) espécies do subgrupo *elliptica*. A. *D. neosaltans* (OP). B. *D. neosaltans* (Aguai). C. *D. neoelliptica*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Avaliação da associação entre os parâmetros da história de vida

Pela análise de correlação, algumas associações foram observadas entre os diferentes parâmetros avaliados como o número médio de ovos e a fecundidade observado para todas as espécies, exceto para *D. neosaltans* (Ouro Preto). Para *D. emarginata*, foi observado correlação entre o tempo de corte com o tempo de desenvolvimento e fecundidade (Tabela 7).

Tabela 7 – Correlação entre os componentes da história de vida no subgrupo *elliptica*. FERT = fertilidade; FEC = fecundidade; TD = tempo de desenvolvimento; COR = tempo médio da corte; COP = tempo médio da cópula

	História de vida	FERT	FEC	TD	COR	COP
<i>D. emarginata</i>	FERT		*			
	FEC	*			*	
	TD				*	
	COR		*	*		
	COP					
<i>D. neoelliptica</i>	FERT		*			
	FEC	*				
	TD					
	COR					
	COP					
<i>D. neosaltans</i> (Aguai)	FERT		*			
	FEC	*				
	TD					
	COR					
	COP					
<i>D. neosaltans</i> (Ouro Preto)	FERT					
	FEC					
	TD					
	COR					
	COP					

Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Relações reprodutivas das espécies do subgrupo *elliptica*

Em duas horas de observação após os casais terem sido colocados nos tubos com meio de cultura, não foi evidenciado qualquer sinal de comportamento de corte ou cópula em todos os inter cruzamentos realizados. Apesar de não termos observado neste período a existência de cópula nos diferentes inter cruzamentos, como observamos para os intracruzamentos (cruzamentos entre mesma espécie), houve a postura de ovos para todos esses inter cruzamentos (Tabela Suplementar 10-15).

Os maiores números médios de ovos/óvulos foram observados nos intracruzamentos entre as diferentes linhagens geográficas de *D. neosaltans* (65,73 e 36,26), sendo esses os únicos cruzamentos que resultaram em descendentes. A Tabela 8 mostra todos os inter cruzamentos realizados e a partir dela observa-se uma baixa fertilidade em todos eles, exceto no inter cruzamento com fêmea *D. neoelliptica* e macho de *D. neosaltans* (Ouro Preto) que obteve um valor aproximado de 33 óvulos no período de tempo observado. As menores médias foram observadas nos inter cruzamentos envolvendo fêmea *D. emarginata* e macho *D. neosaltans* (Ouro Preto e Aguai) (2,06 e 3,08, respectivamente), assim como fêmea *D. neoelliptica* e macho *D. neosaltans* (Aguai) (2,93).

Tabela 8 – Fertilidade e fecundidade média dos inter cruzamentos entre as espécies do subgrupo *elliptica*. F = fêmea; M = macho; OP = Ouro Preto; A= Aguai.

Intercruzamentos		Fertilidade	Fecundidade
F	M		
<i>D. emarginata</i>	<i>D. neoelliptica</i>	13,8	0
<i>D. neoelliptica</i>	<i>D. emarginata</i>	6,53	0
<i>D. emarginata</i>	<i>D. neosaltans</i> (OP)	2,06	0
<i>D. neosaltans</i> (OP)	<i>D. emarginata</i>	16,13	0
<i>D. emarginata</i>	<i>D. neosaltans</i> (A)	3,8	0
<i>D. neosaltans</i> (A)	<i>D. emarginata</i>	13	0
<i>D. neosaltans</i> (OP)	<i>D. neoelliptica</i>	20,3	0
<i>D. neoelliptica</i>	<i>D. neosaltans</i> (OP)	33,53	0
<i>D. neosaltans</i> (A)	<i>D. neoelliptica</i>	5,4	0
<i>D. neoelliptica</i>	<i>D. neosaltans</i> (A)	2,93	0
<i>D. neosaltans</i> (OP)	<i>D. neosaltans</i> (A)	65,73	11,46
<i>D. neosaltans</i> (A)	<i>D. neosaltans</i> (OP)	36,26	21,46

Fonte: Elaborado pelo autor

Como não foram obtidos descendentes em nenhum dos inter cruzamentos, as espermatecas das fêmeas utilizadas nesses inter cruzamentos foram avaliadas pela análise

de lâminas ao microscópio, para verificar a existência ou não de espermatozóides. A observação desses casais foi feita a cada três dias durante duas semanas. Somente após a última observação que as fêmeas foram dissecadas para a verificação da presença ou não de espermatozóides e não foi observado espermatozóides em nenhuma espermateca.

Como há indicações que fêmeas virgens de algumas espécies do grupo *saltans* podem colocar óvulos, por exemplo do subgrupo *sturtevanti*, foi realizado um experimento com as espécies analisadas no presente estudo para avaliar esse comportamento. Assim, fêmeas virgens de *D. emarginata*, *D. neoelliptica* e *D. neosaltans* foram colocadas em tubos contendo meio de cultura padrão durante 10 dias. Esses tubos foram observados em estereomicroscópio e o resultado confirmou a presença de óvulos, ou seja, as fêmeas virgens das espécies analisadas do grupo *elliptica* apresentam o comportamento de postura de óvulos.

4.3 Mensuração do tamanho do edeago e do ovipositor em relação ao tamanho do tórax, asa e corpo por meio da morfometria

Machos

Os valores das medidas do comprimento do tórax (CT), asa (CA), edeago (CE), e os parâmetros dos indivíduos do subgrupo *elliptica* encontram-se na Tabela 9 (machos) e Tabela 10 (fêmeas).

Pela análise de variância (One Way Anova) seguido do teste de Tukey (para dados paramétricos) não foi observada diferença significativa para variação no comprimento do tórax (CT) nos machos das espécies estudadas, entretanto, foi observado diferença significativa no tamanho do edeago (AL) ($p < 0,0001$) para todas as espécies, exceto entre as linhagens de *D. neosaltans*. Pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, observou-se também diferença significativa do comprimento das asas (CA) (entre *D. neoelliptica* e ambas as linhagens de *D. neosaltans*) ($p < 0,05$)

A ordem de comprimento para os edeagos foi *D. emarginata* (1,144mm), *D. neoelliptica* (0,807mm) e *D. neosaltans* (aproximadamente 0,5 mm). O edeago de *D. emarginata* apresentou o maior coeficiente de variação (CV) e *D. neosaltans* os menores (Tabela 9).

Tabela 9 – Média, desvio padrão, coeficiente de variação (entre parênteses, em %) e teste de variância obtidos para os dados morfométricos dos machos das espécies do subgrupo *elliptica*. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ns: não significativo. Comprimento das estruturas representado em milímetros (mm).

Subgrupo <i>elliptica</i>	Tórax (CT)	Asa (CA)	Edeago (CE)
<i>D. emarginata</i>	1,04±0,048 (4,6%)	2,03±0,077 (3,8%)	1,144±0,083 (7,2%)
<i>D. neoelliptica</i>	1,04±0,067 (6,4%)	2,1±0,088 (4,2%)	0,807±0,053 (6,6%)
<i>D. neosaltans</i> (A)	1,02±0,039 (3,9%)	1,92±0,073 (3,8%)	0,510±0,024 (4,8%)
<i>D. neosaltans</i> (OP)	1,01±0,056 (5,6%)	1,96±0,103 (5,22%)	0,496±0,019 (3,9%)
F/Valor de p	1,060	0,0012	348,7
p	ns	**	****

Fonte: Elaborado pelo autor

Fêmeas

Os dados morfométricos obtidos a partir das características morfológicas das fêmeas das espécies do subgrupo *elliptica* podem ser observados na Tabela 10. O comprimento do tórax foi significativamente diferente entre *D. emarginata* e *D. neosaltans* - Aguaí ($p < 0,05$), e o do ovipositor entre *D. neosaltans* - Ouro Preto com *D. emarginata* ($p < 0,01$), e com *D. neoelliptica* ($p < 0,05$). Pela análise de variância (One Way Anova) seguido de Tukey (para dados paramétricos) não foi observado diferença estatística significativa para variação no comprimento das asas das fêmeas.

As linhagens de *D. neosaltans* foram as que tiveram os menores valores médios para as estruturas avaliadas, como o comprimento do tórax, asa e ovipositor. *D. emarginata* foi a que apresentou o maior comprimento de tórax observado, enquanto o tamanho médio observado da asa foi semelhante em *D. emarginata* e *D. neoelliptica*. Em relação aos coeficientes de variação (CVs) os mais altos valores foram observados para o tórax (3,2% a 8,4%) e os menores para a estrutura do ovipositor (2 a 4,8%).

Tabela 10 – Média, desvio padrão, coeficiente de variação (entre parênteses, em %) e teste de variância obtidos para os dados morfométricos das fêmeas das espécies do subgrupo *elliptica* de *Drosophila*. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns: não significativo. Comprimento das estruturas representado em milímetros (mm).

Subgrupo <i>elliptica</i>	Tórax (CT)	Asa (CA)	Ovipositor (CO)
<i>D. emarginata</i>	1,11±0,068 (6,17%)	2,35±0,10 (4,3%)	0,34±0,014 (4,3%)
<i>D. neoelliptica</i>	1,09±0,091 (8,4%)	2,35±0,122 (5,2%)	0,34±0,01 (2%)
<i>D. neosaltans</i> (A)	1,01±0,032 (3,2%)	2,32±0,167 (7,2%)	0,33±0,015 (4,8%)
<i>D. neosaltans</i> (OP)	1,07±0,064 (6,1%)	2,33±0,11 (5,1%)	0,32±0,012 (4%)
F	4,224	0,1193	4,836
p	*	ns	**

Fonte: Elaborado pelo autor

4.4 Alometria estática das espécies do subgrupo *elliptica*.

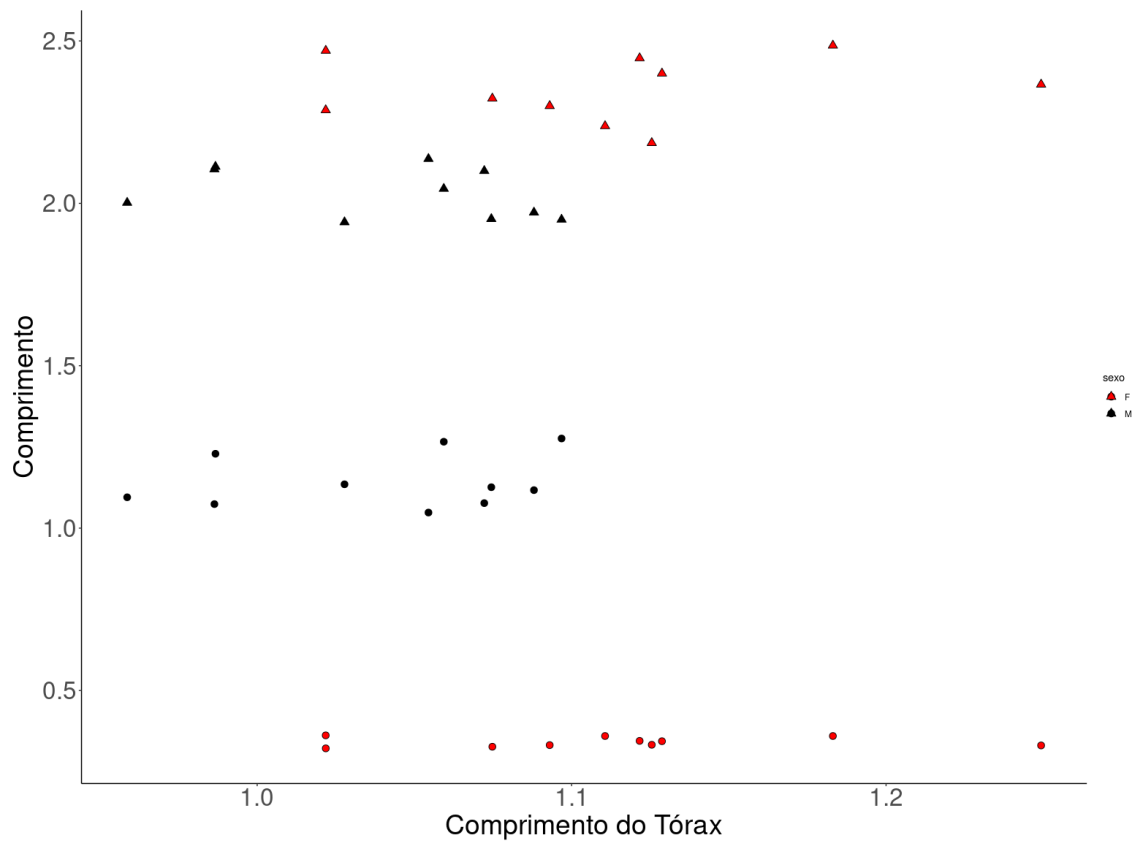
As figuras 5 a 8 mostram a representação gráfica entre a relação do comprimento do edeago, ovipositor e asas em relação ao tamanho corporal. Em vermelho estão representadas as fêmeas e em azul os machos. Os triângulos representam o comprimento das asas e círculos representam o tamanho do edeago/ovipositor.

Visualmente não se observa uma variação do comprimento do ovipositor em relação ao tamanho do tórax, mesmo as fêmeas que são maiores possuem tamanhos de ovipositores com valores bem próximos àqueles das fêmeas menores. Diferentemente do que é visto no ovipositor, foi possível observar uma variação no tamanho do edeago em relação ao tamanho do corpo que é mais evidente nas espécies que possuem os maiores comprimentos (*D. emarginata* e *D. neoelliptica*) (Figuras 5 e 6). Além disso não é visto um decréscimo no comprimento desse órgão conforme há o aumento do corpo.

Os resultados da análise de regressão linear do comprimento do tórax em relação aos outros órgãos (edeago, ovipositor e asas) mostrou significância somente na relação

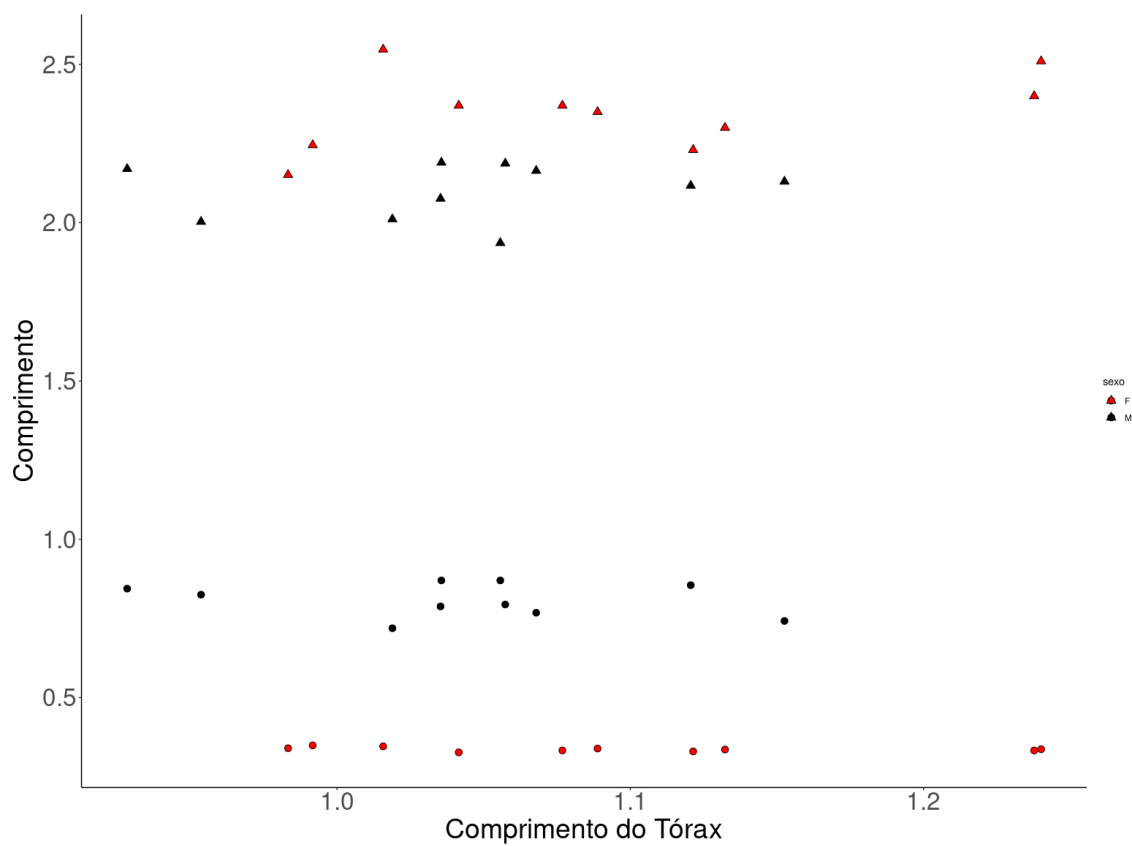
do comprimento do tórax em relação à asa nas fêmeas de *D. neosaltans* (Aguai) (representado em **negrito**) indicando que há um crescimento desse órgão conforme há o crescimento corporal, $p = 0,01$. Entretanto, não foi observado nenhuma outra correlação alométrica significativa tanto nos machos quanto nas fêmeas (Tabelas 11 e 12).

Figura 5 – Gráfico de alometria estática do comprimento do ovipositor, edeago e asas em relação ao comprimento do tórax em *Drosophila emarginata*.



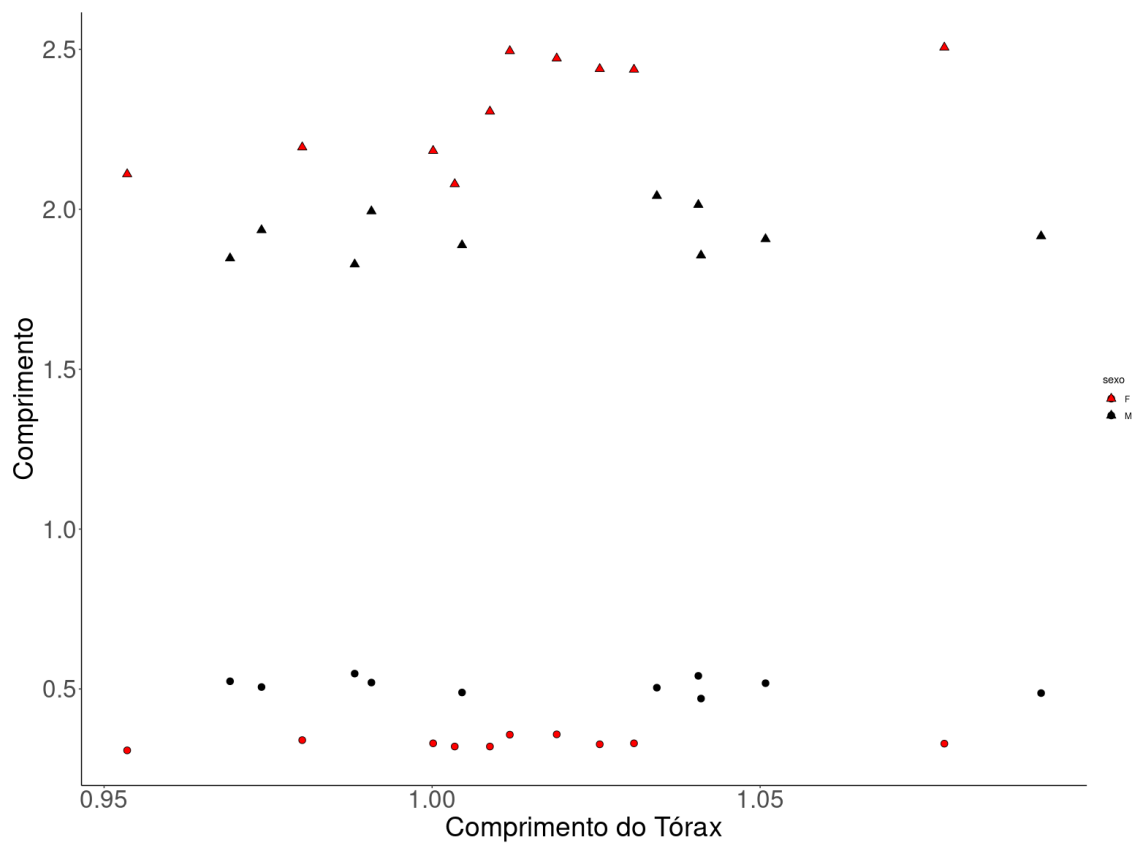
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6 – Gráfico de alometria estática do comprimento do ovipositor, edeago e asas em relação ao comprimento do tórax em *Drosophila neoe elliptica*.



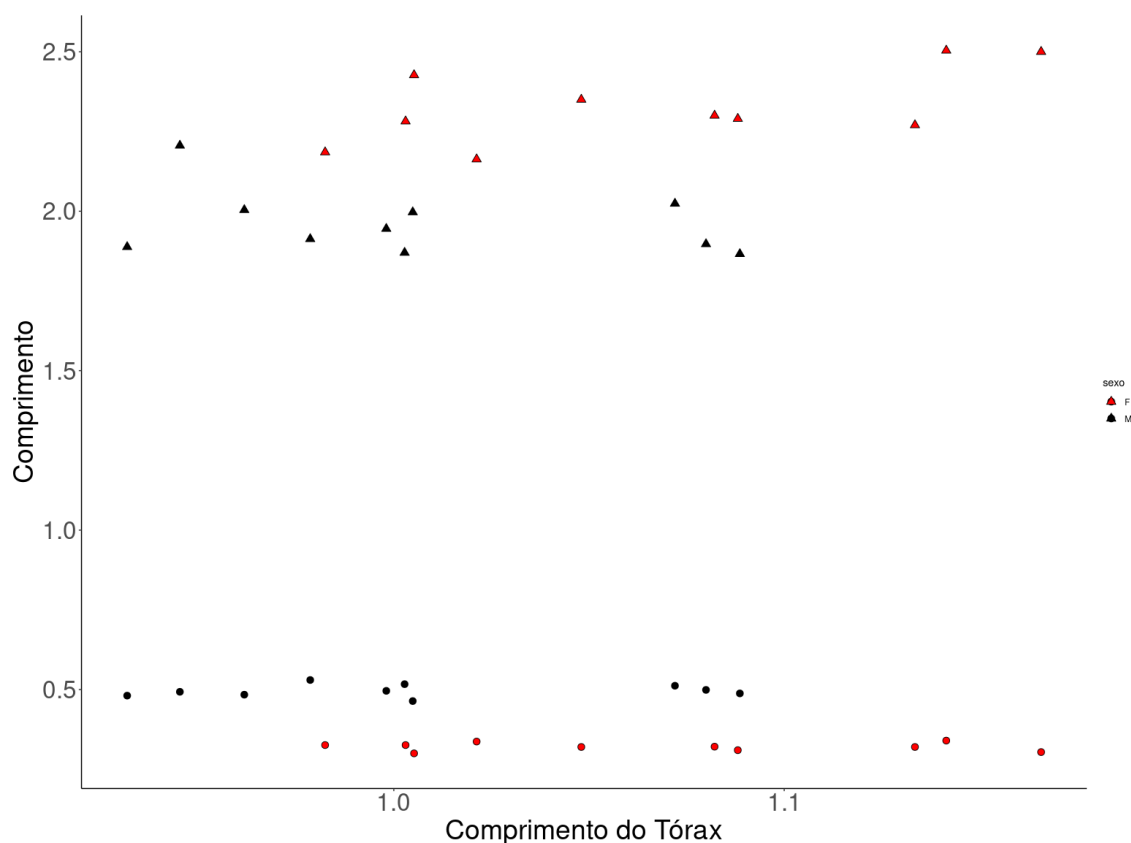
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 7 – Gráfico de alometria estática do comprimento do ovipositor, edeago e asas em relação ao comprimento do tórax em *Drosophila neosaltans* (Aguai).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 8 – Gráfico de alometria estática do comprimento do ovipositor, edeago e asas em relação ao comprimento do tórax em *D. neosaltans* (Ouro Preto).



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 11 – Análise de regressão dos caracteres morfológicos em relação ao tamanho corporal (machos).

Espécie/linhagem	Variável	Slope	r	p	R ²
<i>D. emarginata</i>	Edeago	0,31674	0,20878	0,56269	0,04359
<i>D. emarginata</i>	Asa	-0,26431	-0,32668	0,3569	0,1067
<i>D. neoelliptica</i>	Edeago	-0,25159	-0,24341	0,49798	0,05925
<i>D. neoelliptica</i>	Asa	0,090642	0,13795	0,70391	0,01903
<i>D. neosaltans</i> (A)	Edeago	-0,49004	-0,3941	0,25979	0,1553
<i>D. neosaltans</i> (A)	Asa	0,2324	0,23659	0,51048	0,05597
<i>D. neosaltans</i> (OP)	Edeago	0,11133	0,16045	0,65791	0,02575
<i>D. neosaltans</i> (OP)	Asa	-0,31505	-0,34284	0,33215	0,1175

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 12 – Análise de regressão dos caracteres morfológicos em relação ao tamanho corporal (fêmeas).

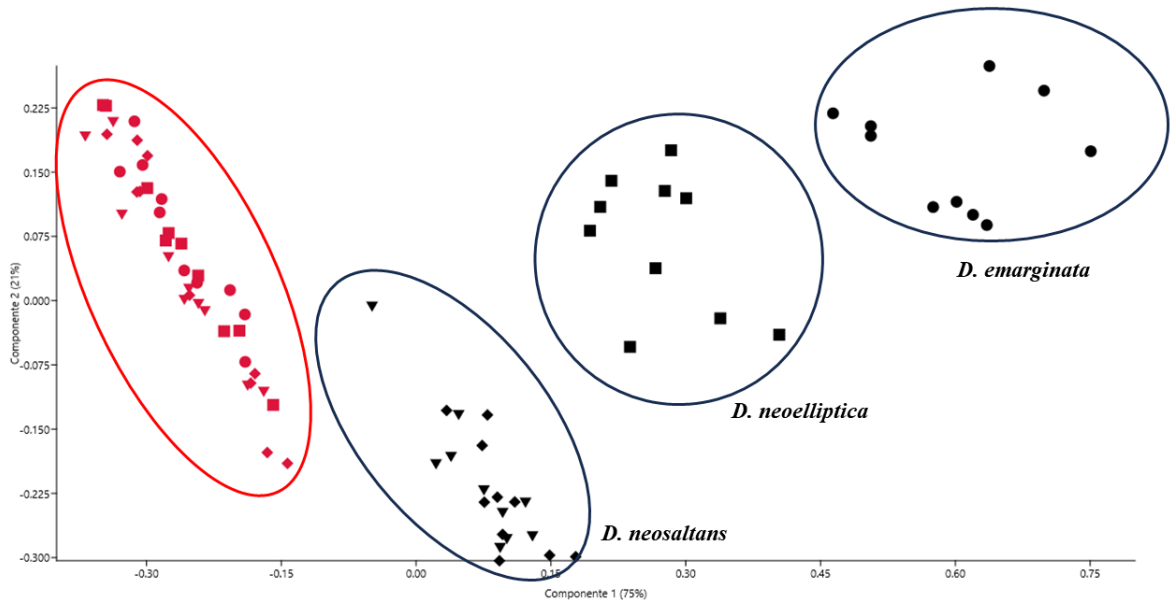
Espécies/linhagens	Variável	Slope	r	p	R ²
<i>D. emarginata</i>	Ovipositor	0,043436	0,061312	0,86638	0,003759
<i>D. emarginata</i>	Asa	0,088455	0,1254	0,72997	0,01572
<i>D. neoelliptica</i>	Ovipositor	-0,11003	-0,4512	0,19058	0,2036
<i>D. neoelliptica</i>	Asa	0,26088	0,41446	0,23371	0,1718
<i>D. neosaltans</i> (A)	Ovipositor	0,40848	0,27736	0,43783	0,07693
<i>D. neosaltans</i> (A)	Asa	1,71	0,75336	0,011873	0,5676
<i>D. neosaltans</i> (OP)	Ovipositor	-0,06423	-0,09582	0,79231	0,009182
<i>D. neosaltans</i> (OP)	Asa	0,49082	0,58769	0,073996	0,3454

Fonte: Elaborado pelo autor

A Análise de Componentes Principais (PCA) agrupou machos e fêmeas de acordo com suas características morfológicas (tórax, asa, edeago e ovipositor). Na Figura 9 em vermelho estão representadas as fêmeas e em preto os machos. Círculo = *D. emarginata*; quadrado = *D. neoelliptica*; losango = *D. neosaltans* (Aguaf); seta com cabeça para baixo = *D. neosaltans* (Ouro Preto).

A Figura 9 demonstra quatro agrupamentos distintos, e observa-se que o Componente 1 explica 75% da variação enquanto o Componente 2 explica 21% da variação presente nas amostras. De acordo com a análise obtida, a asa é a característica que mais variou entre as fêmeas e propiciou a formação de um único agrupamento entre as espécies, sendo que o comprimento do ovipositor não foi a variável mais explicativa para a formação dos grupos. Já nos machos, houve a formação de três grupos distintos que agruparam separadamente as três espécies, sendo que o comprimento do edeago foi a característica que melhor explicou a variação das espécies do subgrupo *elliptica*. Com isso, pode-se inferir que o comprimento do edeago é muito mais variável que o ovipositor nessas espécies.

Figura 9 – Análise de Componentes Principais das características morfológicas (asa, tórax, edeago e ovipositor) de machos e fêmeas do subgrupo *elliptica*.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.5 Observação dos casais em cópula

Esse experimento foi realizado com o intuito de avaliar por microscopia óptica os aspectos da intromissão dos edeagos gigantes no trato genital feminino, a fim de entender se o mesmo era completamente introgridido ou apenas parte dele. Tendo em vista que não foi observado nas fêmeas das espécies analisadas diferenças em relação ao tamanho dos ovipositores proporcionalmente ao tamanho dos edeagos.

A análise das cópulas (Figuras 10 a 12) das três espécies pela metodologia utilizada mostra que o edeago inteiro é introgridido no trato genital feminino. Em *D. emarginata* que possui o maior edeago, ele se curva e parece que há uma expansão do último tergito das fêmeas (próximo ao ovipositor) nessa espécie o que não ocorre com as outras com edeagos menores (*D. neoelliptica* e *D. neosaltans*).

Figura 10 – Casais em cópula de *D. emarginata*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 11 – Casais em cópula de *D. neoelliptica*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 12 – Casais em cópula de *D. neosaltans*.



Fonte: Elaborado pelo autor

5 DISCUSSÃO

5.1 Componentes da história de vida das espécies do subgrupo *elliptica* e suas relações reprodutivas.

Os traços da história de vida são os principais componentes fenotípicos que determinam o valor adaptativo das populações. A inexistência de um estudo aprofundado das espécies no subgrupo *elliptica* de sua história de vida é a base para entendermos alguns aspectos desse grupo que possui uma característica incomum dentro da família Drosophilidae, o gigantismo fálico.

Os comportamentos de corte de *Drosophila* fazem parte do processo de reconhecimento entre pares e são investigados para compreender os mecanismos de comunicação envolvendo sinais sensoriais espécie e sexo-específico (GREENSPAN; FERVEUR, 2000; HALL, 2002). A nossa hipótese em princípio seria que devido aos tamanhos gigantes dos edeagos das espécies do subgrupo *elliptica* e também da diferença de tamanho dessa estrutura pudesse de alguma forma interferir em algum fator relacionado a diferenças no tempo ou padrão da corte, provavelmente a partir da receptividade ou aceitação das fêmeas (GREENSPAN; FERVEUR, 2000), o que não foi o caso. O menor tempo médio da corte foi observado em *D. neosaltans* (Ouro Preto, 18 minutos) que possui menor edeago que outras espécies analisadas em que o tempo foi maior (em média 20 minutos). As espécies do subgrupo *elliptica* apresentaram tempo médio de corte similares, sendo muito próximo ao que foi observado em populações brasileiras de *D. sturtevanti* (19 minutos), que pertence ao grupo *saltans*, o mesmo das espécies avaliadas no presente estudo (CARARETO; MOURÃO, 1992).

A relação entre o tempo de cópula e o comprimento do edeago nessas espécies não foi significativa, entretanto, a vista dos dados observa-se que o maior tempo médio de cópula foi obtido em *D. neosaltans*, a qual possui o menor tamanho de edeago enquanto os menores tempo médio de cópula foram obtidos em *D. emarginata* e *D. neoelliptica* que possuem os maiores edeagos. Em outros insetos que possuem o gigantismo fálico, como por exemplo besouros do gênero *Ohomopterus*, foi visto que o comprimento do edeago é negativamente correlacionado com a duração da cópula, sugerindo que quanto maior o tamanho do edeago, menor tende a ser o tempo de cópula (TAKAMI; SOTA, 2007).

A duração da cópula pode ser um importante parâmetro no sucesso reprodutivo das espécies. Nos insetos, essa característica é influenciada pela coevolução sexual antagonística devido a vantagens reprodutivas distintas entre machos e fêmeas (PARKER, 1979; HOLLAND; RICE, 1998; MOORE; PIZZARI, 2005). Uma maior duração da cópula poderia ser vantajoso para os machos visando assegurar a paternidade e impedir ou limitar que a fêmea acasale novamente (MAZZI et al, 2009), entretanto, para as fêmeas uma maior duração da cópula poderia aumentar a sua fecundidade a partir de uma maior transferência de espermatozóides, essa hipótese é conhecida como hipótese de transferência do esperma (EVAROSSON; CANAL, 2006; MAZZI et al., 2009). Tal hipótese é concordante com os resultados obtidos no nosso trabalho pois observa-se que entre as espécies do subgrupo *elliptica*, ambas as linhagens de *D. neosaltans* possuem o maior tempo de cópula (de aproximadamente 30 minutos, sendo 10 minutos a mais em relação às demais) e obtiveram a maior fertilidade e fecundidade encontrada no subgrupo.

Embora os resultados assinalam tempos menores de cópula para as espécies do grupo *elliptica* com maiores edeagos, o que poderia ser vantajoso no sentido de menos injúria para as fêmeas e menos custo energético (DALY, 1978; EBERHARD, 1996; WATSON et al., 1998; SIMMONS, 2001), pode também não ser eficiente para transmitir uma quantidade adequada de espermatozóides (EVAROSSON; CANAL, 2006), visto que foi observado que as espécies que possuem os maiores edeagos também possuem a menor fertilidade e fecundidade.

A fertilidade que obtivemos para as espécies do subgrupo *elliptica* é bem inferior quando comparado a espécies de outros grupos como por exemplo o grupo *melanogaster*, um dos mais estudados. Como por exemplo, em *D. melanogaster* uma fêmea pode depositar 100 ovos por dia (FLATT, 2020) enquanto *D. simulans*, espécie irmã, um número médio de até 230 ovos por dia (TAYLOR et al., 2008). A fertilidade de *D. emarginata* e *D. neoelliptica* é semelhante ao observado em populações brasileiras de *D. prosaltans* (72,20) (CARARETO; MOURÃO, 1991). Entretanto, o número médio de ovos de *D. neosaltans* (106 – Aguai; 127 – Ouro Preto) é superior ao encontrado em *D. prosaltans*.

Na avaliação da fertilidade das fêmeas ao longo do tempo foi verificado que há uma diminuição conforme o tempo passa, relacionado com o aumento da idade dos casais. Essa diminuição pode estar principalmente relacionada a idade das fêmeas como relatado

em diversos estudos (DAVID et al., 1974; ZHAO et al., 2008; KLEPSATEL et al., 2013) sendo que essa diminuição pode estar relacionada à senescência do sistema reprodutivo feminino (MARGOLIS; SPRADLING, 1995; PAN et al., 2007; ZHAO et al., 2008). Gowen e Johnson (1946) demonstraram em *D. melanogaster* que, quanto maior o tempo de vida da fêmea (parental), menor vai ser o número de ovos depositados. Dessa forma, quanto mais nova a fêmea, maior tende a ser a postura de ovos - como foi observado nas espécies do subgrupo *elliptica* deste trabalho, exceto em *D. neoelliptica* cuja produção de ovos teve uma tendência a permanecer constante ao longo dos 7 dias.

Já a fecundidade média das espécies do subgrupo *elliptica* estudadas no presente trabalho são similares ao que foi documentado em outras espécies do grupo *saltans* e variou de 14 a 68. Em um estudo com diferentes linhagens de *D. parasaltans* e *D. subsaltans* foram obtidos em média 50 a 156 imagos para a primeira espécie e 62 imagos para a segunda (BICUDO; PRIOLI, 1978). Bicudo (1979) avaliando a fertilidade de sete espécies do subgrupo *saltans* obteve os seguintes números médios de descendentes: *D. saltans* (30,9), *D. lusaltans* (66,1), *D. prosaltans* (45,3), *D. nigrosaltans* (22,2), *D. septentriosaltans* (47,9), *D. austrosaltans* (48,37) e *D. pseudosaltans* (55,4). Para a espécie *D. sturtevantii*, procedente de três localidades diferentes, foi obtido o número médio de imagos que variou entre 52 e 60. Em outro estudo com *D. prosaltans* a média de emergência de imagos variou entre 31 e 68 dependendo da procedência geográfica (CARARETO; MOURÃO, 1991). A média de imagos em *D. neosaltans* (ambas as linhagens) foi próxima a observada em *D. pseudosaltans* enquanto as de *D. emarginata* e *D. neoelliptica* se aproximam de *D. lusaltans*. Entretanto, observa-se diferença inversamente proporcional entre as espécies que possuem maior o comprimento do edeago e a fecundidade no subgrupo *elliptica*.

Além disso, a postura de ovos e a taxa de eclosão de imagos nas espécies do subgrupo *elliptica* apresentou padrões diferentes do observado em outras espécies de *Drosophila*. Como por exemplo, em *D. melanogaster*, a proporção de ovos que eclodem larvas e estas tornam-se imagos (fecundidade) é de aproximadamente 90% (DAVID et al., 1974; 1975; KLEPSATEL et al., 2013), enquanto para as espécies analisadas as taxas variaram a valores bem abaixo, sendo que as linhagens de *D. neosaltans* foram aquelas que apresentaram a maior taxa de eclosão (fecundidade) com 69% (Aguai) e 49% (Ouro Preto) enquanto *D. emarginata* e *D. neoelliptica* apresentaram as menores (26% e 20%, respectivamente).

A metodologia empregada na realização dos intracruzamentos pode ter interferido na baixa fertilidade e fecundidade observada, o grupo *saltans* possui uma característica peculiar e comportamental de suas larvas. As larvas são capazes de “saltar”, ou seja, a larva agarra sua extremidade posterior com os ganchos da boca e se estica. Esses ganchos se soltam repentinamente, a larva se endireita com considerável força e, como resultado, é lançada vários centímetros no ar (STURTEVANT, 1942). Na natureza, as larvas saltam em substratos que fornecem apoio e assim elas empupam. Alguns laboratórios utilizam metodologia diferente para a manutenção das linhagens desse grupo, fazendo com que as larvas empupam em areia (vermiculite), o que não é o caso do nosso laboratório.

O tempo de desenvolvimento dos organismos do gênero *Drosophila* é bastante variável, podendo haver variação considerável no desenvolvimento entre ovo-imago. O subgrupo *elliptica* apresentou um tempo maior de desenvolvimento (19 a 21 dias) em relação a outros grupos (8 a 16 dias em *D. melanogaster*, por exemplo) (FLATT, 2019) mas próximo ao que é observado dentro do grupo *saltans* (entre 18,2 e 23 dias) (CARARETO; MOURÃO, 1992; MARKOW; O’GRADY, 2006). Essa diferença em relação a outros grupos de drosofilídeos também foi encontrado no parâmetro de sobrevivência. A longevidade para o subgrupo *elliptica* foi relativamente menor quando comparado a outras espécies cosmopolitas amplamente distribuídas e também de região neotropical, como *D. prosaltans* (ARMSTRONG, 1976; CARARETO; MOURÃO, 1991; TAYLOR, 2018). As fêmeas de modo geral foram menos longevas e esse padrão já foi observado em outros trabalhos, em *D. melanogaster* as fêmeas geralmente sobrevivem de 5 a 10 dias a menos que os machos (FLATT, 2020).

Para verificar se os componentes de história de vida relacionam-se entre si de alguma forma, foi realizada uma análise de correlação para uma compreensão melhor dos mesmos. A fertilidade e fecundidade são os únicos componentes que estão correlacionados positivamente em todas as linhagens, exceto em *D. neosaltans* (Ouro Preto) – $p < 0,05$ e isso é esperado pois quanto maior a quantidade de ovos, maior pode ser a quantidade de descendentes daquele cruzamento. Contudo, correlações genéticas são descrições estatísticas e de acordo com alguns autores, muitos experimentos podem encontrar padrões de correlações que não são informativas sobre suas causas (HOULE, 1991; PARTRIDGE; BARTON, 1993; GROMKO, 1995; HUGHES; LEIPS, 2017) e isso pode ter acontecido na correlação significativa entre o tempo de corte e o tempo de desenvolvimento e fecundidade encontrado em *D. emarginata* ($p < 0,05$).

Ainda que as correlações sejam bastante variáveis na literatura, alguns padrões, que não foram encontrados no subgrupo *elliptica* a partir dos dados obtidos no trabalho, podem ser observados em drosofilídeos como por exemplo correlações positivas entre tempo de desenvolvimento, tamanho corporal no momento da eclosão e fecundidade; correlação negativa entre longevidade e fecundidade em idades iniciais; *trade-off* entre fecundidade em idades iniciais e mais antigas; correlação positiva entre longevidade e fecundidade e correlação entre o tempo de desenvolvimento e tamanho (ALPATOV, 1929; ROBERTSON, 1957ab; ROSE; CHARLESWORTH, 1981ab; LUCKINBILL et al., 1984; ROSE, 1984, 1991; MOUSSEAU; ROFF, 1987; TANAKA; YAMAZAKI, 1990; ROFF, 1993; STEARNS, 1992; ZWAAN et al., 1995ab; LEFRANC; BUNDGAARD, 2000; STEARNS et al., 2000; ACKERMANN et al., 2001; HARSHMAN, 2003; PRASAD; JOSHI, 2003; SCHMIDT et al, 2005ab; BERGLAND et al., 2008; SCHMIDT; PAABY; SCHMIDT, 2009; FLATT, 2011; FABIAN et al., 2015).

Além de entender sobre a história de vida do subgrupo *elliptica*, é interessante também compreender melhor as relações reprodutivas entre os organismos desse subgrupo pois elas foram pouco descritas na literatura. O grupo *saltans* possui cinco subgrupos e o isolamento reprodutivo é completo entre espécies de diferentes subgrupos. Entretanto, o isolamento reprodutivo pode variar entre espécies quando observamos o mesmo subgrupo. Dessa forma, para verificar o isolamento reprodutivo entre as espécies do subgrupo *elliptica* foram realizados intercruzamentos entre *D. emarginata*, *D. neoelliptica* e *D. neosaltans* (ambas linhagens).

Não foi observado nenhuma interação entre os casais dos intercruzamentos, ou seja, nenhum indício de comportamento de corte ou mesmo nenhuma cópula foi observado nos intercruzamentos entre as diferentes espécies no tempo de duas horas de observação. Além disso, apesar de terem sido observados ovos nesses intercruzamentos (fertilidade), não podemos afirmar que se tratavam de ovos fertilizados, tendo em vista a característica observada para esse grupo de que as fêmeas virgens ovipositam seus óvulos não fecundados. Assim, pode ser que a observação de ovos (fertilidade) dos intercruzamentos se tratasse de óvulos, mas pelo experimento realizado não há como sabermos isso. Por outro lado, a observação visual dos intercruzamentos foi realizada por um período limitado, dessa forma, as fêmeas podem ter copulado durante algum período que não estavam sendo observadas. As espermatecas das fêmeas foram avaliadas no

sentido de indicação da cópula, mas não foi observado nenhum indício de espermatozoides. Entretanto, essa observação foi realizada em um período (de aproximadamente 23 dias da idade das fêmeas) em que os espermatozoides se presentes poderiam já ter sido utilizados, durante a cópula. Mesmo que se tratasse ovos fertilizados esses não chegaram a se desenvolver, e isso é sugestivo de isolamento reprodutivo pré-zigótico para as espécies do grupo *elliptica* avaliadas no presente estudo.

Esse tipo de isolamento foi observado para outros subgrupos do grupo *saltans* como por exemplo em um trabalho comparativo entre três espécies do subgrupo *sturtevanti*: *D. magalhaesi*, *D. sturtevanti* e *D. milleri* realizado por Bicudo (1979) a qual demonstrou que o isolamento entre essas espécies pode ocorrer provavelmente devido a alterações do comportamento no padrão de corte, assim como os de Carareto e Mourão (1994) que demonstrou a existência de isolamento reprodutivo etológico entre linhagens de *D. sturtevanti* provindas do Brasil, Colômbia, Costa Rica e México.

5.2 Alometria estática do subgrupo *elliptica* e coevolução entre edeago e ovipositor.

O estudo dos traços morfométricos e das relações entre eles (alometria) é importante porque a variação de traços morfológicos, fisiológicos ou até da história de vida pode estar relacionado com a variação do tamanho dos organismos. (CALDER, 1984; SCHMIDT-NIELSEN, 1984; BROWN; WEST, 2000). O tamanho corporal pode ser medido pelo tamanho do corpo, tórax, da asa, peso, ou de outras características fenotípicas (LEFRANC; BUNDGAARD, 2000) e ele influencia em diversos aspectos do organismo como produtividade, longevidade, sucesso no acasalamento, entre outros (ROBERTSON, 1957; TANTAWY; VETYKHIV, 1960; GROMKO et al., 1991; MENEZES et al., 2013).

A partir da observação do comprimento das estruturas morfológicas analisadas, observa-se que a espécie *D. emarginata* possui o maior edeago do subgrupo com aproximadamente 1,14 mm, seguido de *D. neoelliptica* com 0,8 mm e *D. neosaltans* com aproximadamente 0,5 mm. O edeago de *D. emarginata* também apresentou o maior coeficiente de variação das espécies estudadas, enquanto os de *D. neosaltans* os menores. O coeficiente de variação reflete a variabilidade fenotípica dos traços morfológicos estudados e os altos valores de CV dos edeagos podem indicar que a seleção sexual está

atuando na evolução desse traço morfológico tão distinto no subgrupo *elliptica* (ARNQVIST, 1997), principalmente nas espécies que possuem os maiores comprimentos desse órgão (e que também possuem os maiores CVs) - *D. emarginata* e *D. neoelliptica*.

A variação da maioria dos traços morfológicos tende a acompanhar a variação do tamanho do corpo (SHINGLETON et al., 2007; DREYER; SHINGLETON, 2011). Em relação às genitálias, Eberhard e colaboradores (1998) estudaram 20 espécies de insetos e aranhas e elucidaram que quando a seleção natural está atuando ela favorece os tamanhos intermediários. Entretanto, em alguns insetos, como por exemplo em *D. melanogaster*, o tamanho observado da genitália tende a diminuir consideravelmente conforme há o aumento corporal (geralmente descrito pelo comprimento do tórax) (SHINGLETON et al., 2007) exibindo alometria negativa (EBERHARD, 2008) diferentemente do que é observado nas espécies do subgrupo *elliptica* visto que não foi observado correlação significativa entre o comprimento corporal e do edeago.

A alometria estática se dá no nível populacional, mas, para entender o crescimento dos órgãos, é necessário analisar o desenvolvimento individual (MIRTH et al., 2016). Dreyer e Shingleton (2011) sugerem dois mecanismos pelo qual há a regulação do crescimento dos órgãos, o primeiro deles envolve mecanismos sistêmicos (hormônios) e o segundo por mecanismos autônomos que afetam os órgãos individualmente (expressão de determinados genes). Os autores hipotetizaram que o órgão genital reduziu sua resposta ao primeiro mecanismo mas não ao segundo, por isso o crescimento da genital (em especial, a masculina) é diferente das demais estruturas morfológicas.

Sabe-se que os hormônios podem afetar o crescimento dos órgãos de maneiras diferentes, dependendo da resposta hormonal - enquanto por exemplo o tamanho das asas escala proporcionalmente ao tamanho do corpo (ou seja, quanto maior o corpo maior o comprimento da asa) devido a sua resposta da regulação hormonal, a genitália em *D. melanogaster* e em outros insetos comporta-se de maneira contrária (quanto maior o corpo, menor o comprimento) (MIRTH et al., 2016). Apesar do edeago do subgrupo *elliptica* não apresentar esse comportamento pois não foi observado uma diminuição considerável do tamanho conforme há o aumento do tórax nas análises de regressão, observou-se que as asas das fêmeas de *D. neosaltans* (Aguai) aumentou significativamente em relação ao tamanho corporal, concordante com o que foi descrito na literatura.

A evolução do comprimento e da forma de alguns caracteres fenotípicos que sofrem ação da seleção sexual chamam bastante atenção pelo fato de selecionar algumas características de tamanhos exagerados, como vimos no subgrupo *elliptica*. Geralmente essas características são características sexuais secundárias (BONDURIANSKY, 2007), entretanto, podemos observar no presente trabalho que a genitália masculina das espécies do subgrupo *elliptica* também se comportam dessa maneira, principalmente em *D. emarginata* cuja proporção é de aproximadamente 1/2 tamanho do edeago em relação ao corpo. Em uma estimativa preliminar de 84 espécies de drosofilídeos os índices do tamanho do corpo (por exemplo, comprimento do corpo, comprimento da asa, edeago, etc) foram obtidos e correlacionados. Esses resultados revelaram que as espécies do subgrupo *elliptica* se desviam significativamente do padrão alométrico geral encontrado na família Drosophilidae (PREDIGER et al, 2023, artigo a ser submetido), quando analisado a relação tamanho do corpo/edeago.

Diferentemente da genitália masculina, a genitália feminina é frequentemente descrita como menos divergente em relação à masculina pela sua morfologia ser conservada por um longo período de tempo (JAGADEESHAN; SINGH, 2006). Essa baixa variação do comprimento do ovipositor é refletida na Análise de Componentes Principais (PCA) no qual o eixo principal que explica a maior variação está relacionado ao comprimento da genitália e houve um único agrupamento das fêmeas das três espécies do subgrupo *elliptica*, diferentemente dos machos que foram agrupados separadamente refletindo o quão variável pode ser o órgão copulador masculino. Jagadeeshan e Singh (2006) relatam por exemplo em um estudo comparativo de espécies dentro do gênero *Drosophila* que o ovipositor permaneceu idêntico mesmo entre espécies que divergiram há 40 a 60 milhões de anos atrás - um período de tempo bem elevado. No subgrupo *elliptica* o edeago varia entre 0,5mm-1,14mm enquanto ovipositor possui uma variação de apenas 0,32mm-0,34mm, somado ao resultado obtido na PCA, esse achados encontrados por esses autores são concordantes com o que foi obtido nesse estudo.

Pela análise dos casais em cópula observamos a introgressão completa dos edeagos no trato genital feminino para todas as espécies avaliadas, mesmo para *D. emarginata*, a espécie com maior edeago e que apresenta uma estrutura mais complexa do que as outras duas espécies. A observação pela microscopia óptica nos pe A observação mais evidente que pudemos realizar é da curvatura do edeago de *D. emarginata* no trato feminino, essa acomodação pode ser adaptativa no sentido de

causar menos injúrias às fêmeas. Isso precisa ser avaliado de forma mais específica. Além disso, parece haver uma expansão do último tergito da fêmea ou do ovipositor dessa espécie, isso também pode ser um outro fator que favoreceu a adaptação nessa espécie, tendo em vista que o ovipositor nessa espécie tem tamanho semelhante aos das outras espécies desse subgrupo com tamanho menor de edeago, ou seja, não houve uma coevolução de tamanhos dos órgãos reprodutores no subgrupo *elliptica*.

O tamanho exagerado do edeago é visto pela primeira vez em Drosophilidae, entretanto, ela já foi observada outros táxons e outros insetos como os besouros do gênero *Carabus*, descritos anteriormente (OKUZAKI; SOTA, 2014; NOMURA et al., 2021; TERADA et al., 2023). As fêmeas desses organismos possuem uma estrutura denominada apêndice vaginal no qual o edeago é inserido por completo nesse apêndice durante a cópula, assegurando a inseminação. De acordo com alguns autores, essas partes genitais coevoluíram e com isso permitiu o aumento exagerado do edeago nessas espécies (SASABE et al., 2010). Entretanto, nas nossas análises não foi possível fazer algum tipo de observação das estruturas relacionadas ou envolvidas na cópula. Novas análises e utilização da microscopia eletrônica de varredura dos casais em cópula, bem como a ampliação do número de amostras deverão ser realizadas para uma avaliação mais robusta desses resultados.

6 CONCLUSÕES

As espécies do subgrupo *elliptica* avaliadas no presente estudo possuem isolamento reprodutivo pré-zigótico entre si. As espécies com os maiores edeagos obtiveram diferenças nos parâmetros do valor adaptativo avaliados, sugerindo uma possível relação dos processos genéticos envolvidos no gigantismo fálico com os resultados obtidos. O subgrupo *elliptica* não se assemelha do padrão alométrico do edeago encontrado em Drosophilidae, sendo que o edeago foi a estrutura morfológica que obteve uma grande variação, ao contrário do ovipositor, sugerindo que a seleção sexual pode ter tido influência na evolução na morfologia distinta dessa estrutura fálica e culminado com a alongação dessa estrutura. Não foi observado a coevolução do tamanho dos órgãos reprodutores nas espécies analisadas.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M.; BIJSLMA, R.; JAMES, A. C.; PARTRIDGE, L.; ZWAAN, B. J.; STEARNS, S. C. Effects of assay conditions in life history experiments with *Drosophila melanogaster*. **Journal of Evolutionary Biology**. 2001.
- ALPATOV, W. W. Growth and variation of the larvae of *Drosophila melanogaster*. **J. Exp. Zool.** 1929.
- AMATO, A.; KOOISTRA, W. H. C.; GHIRON, J. H. L.; MANN, D. G.; SCHOLD, T. P.; MONTRESSOR, M. Reproductive Isolation among Sympatric Cryptic Species in Marine Diatoms. **Protist**. 2007.
- ARMSTRONG, E. The effects of temperature on the longevity of adult *Drosophila willistoni* infected with *Nosema kinji*. **Entomophaga**. 1976.
- ARNQVIST, G. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. **Biological Journal of the Linnean Society**. 1997.
- ARNQVIST, G. Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. **Nature**. 1998.
- ARNQVIST, G.; NILSSON, T. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. **Animal Behaviour**. 2000.
- ARNQVIST, G.; ROWE, L. Correlated evolution of male and female morphologies in water striders. **Evolution**. 2002.
- ARNQVIST, G.; THORNHILL, R. Evolution of animal genitalia: patterns of phenotypic and genotypic variation and condition dependence of genital and non-genital morphology in water strider. **Genetics Research**. 1998.
- AZEVEDO, R. B R.; VERNON, F.; PARTRIDGE, L. Life-history consequences of egg size in *drosophila melanogaster*. **The American Naturalist**. 1997.
- BACHLI, G.; VILELA, C. R.; ESCHER, S. A.; SAURA, A. The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. **CAB Direct**. 2004.
- BARBASH, D. A.; ASHBURNER, M. A novel system of fertility rescue in *Drosophila* hybrids reveals a link between hybrid lethality and female sterility. **Genetics**. 2003.
- BARBASH, D. A.; AWADALLA, P.; TARONE, A. M. Functional divergence caused by ancient positive selection of a *Drosophila* hybrid incompatibility locus. **PLoS Biol.** 2004.
- BARBASH, D. A.; ROOTE, J.; ASHBURNER, M. The *Drosophila melanogaster* hybrid male rescue gene causes inviability in male and female species hybrids. **Genetics**. 2000.

- BERGLAND, A. O.; GENISSEL, A.; NUZHIDIN, S. V.; TATAR, M. Quantitative trait loci affecting phenotypic plasticity and the allometric relationship of ovariole number and thorax length in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**. 2008.
- BICUDO, H. E. M. C. Reproductive Isolation in *Drosophila prosaltans* (*saltans* group). **Brazilian Journal of Genetics**. 1978.
- BICUDO, H. E. M. C. Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. IV. The *surtevantii* subgroup. **Revista Brasileira de Genetica**. 1979.
- BICUDO, H. M. C. Chromosomal polymorphism in the *saltans* group of *Drosophila* I. The *saltans* subgroup. **Genetica**. 1973.
- BICUDO, H. M. C. Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. I. The *saltans* subgroup. **Genetica**. 1973.
- BICUDO, H. M. C. Reproductive Isolation in the *saltans* group of *Drosophila*. III. Intraspecific study in *D. emarginata*. **Naturalia**. 1978.
- BIRKHEAD, T. R. Cryptic female choice: criteria for establishing female sperm choice. **Evolution**. 1998.
- BONDURIANSKY, R. Sexual selection and allometry: a critical reappraisal of the evidence and ideas. **Evolution**. 2007.
- BRENNAN, P. L. R. Studying genital coevolution to understand intromittent organ morphology. **Integrative and comparative biology**. 2016.
- BRENNAN, P. L. R.; PRUM, R. O. Mechanisms and evidence of genital coevolution: the roles of natural selection, mate choice, and sexual conflict. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 2015.
- BRENNAN, P. L. R.; PRUM, R. P.; MCCRAKEN, K. G. Coevolution of male and female genital morphology in waterfowl. **Plos One**. 2007.
- BROWN, J. H.; WEST, G. B. Scaling in Biology. **Oxford University Press**. 2000.
- BROWN, R. G. B. Courtship behavior in the *Drosophila obscura* group. 1. *D. pseudoobscura*. **Behaviour**. 1964.
- BROWN, R. G. B. Courtship behaviour in the *Drosophila obscura* group. Part II. Comparative studies. **Behaviour**. 1966.
- BUENAVENTURA, E.; PAPE, T. Phylogeny, evolution and male terminalia functionality of *Sarcophaginae* (Diptera: Sarcophagidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**. 2018.
- CALDER, W. A. Size, Function and Life History. **Harvard University Press**. 1984.

- CARARETO, C. M. A. Incipient ethological isolation among strains of *Drosophila sturtevanti*. **Naturalia**. 1994.
- CARARETO, C. M. A.; MOURÃO, C. A. Darwinian fitness in *Drosophila*. I. Fitness componenets of *Drosophila prosaltans*. **Revista Brasileira de Genética**. 1991.
- CARARETO, C. M. A.; MOURÃO, C. A. Darwinian fitness in *Drosophila*. II. Quantification of total fitness in *Drosophila prosaltans*. **Revista Brasileira de Genética**. 1991.
- CARARETO, C. M. A.; MOURÃO, C. A. Darwinian fitness in *Drosophila*. III. Fitness components of *Drosophila sturtevanti*. **Revista Brasileira de Genética**. 1992.
- CAYETANO, L.; MAKLAKOV, A. A.; BROOKS, R. C.; BONDURIANSKY, R. Evolution of male and female genitalia following release from sexual selection. **Evolution**. 2011.
- CHAPMAN, T.; ARNQVIST, G.; BANGHAM, J.; ROWE, L. Sexual Conflit. **Trends in Ecology and Evolution**. 2003.
- CHARLESWORTH, B. Causes of natural variation in fitness: Evidence from studies of *Drosophila* populations. **PNAs**. 2015.
- CHARLESWORTH, B. Evolution in age-structured populations. **Cambridge Studies in Mathematical Biology**. 1994.
- CHARLESWORTH, B. Fitness and Selection. **eLS (Encyclopedia of Life Sciences)**. 2013.
- CHARLESWORTH, B. The cost of sex in relation to mating system. **Journal of Theoretical Biology**. 1980.
- COLE, L. C. The population consequences of life history phenomena. **The Quarterly review of biology**. 1954.
- COYNE, J. A.; ORR, H. A. Patterns of speciation in *Drosophila* Revisited. **Evolution**. 1997.
- COYNE, J. A.; ORR, H. A. Patterns of speciation in *Drosophila*. **Evolution**. 1989.
- COYNE, J. A.; ORR, H. A. Speciation. **Sunderland, MA. Sinauer Associates**. 2004.
- DALY, M. The cost of mating. **The American Naturalist**. 1978.
- DAVID, J. R.; BIÉMONT, C.; FOUILLET, P. Sur la forme des courbes de ponte de *Drosophila melanogaster* et leur adjustment á des modeles mathematiques. **Arch. Zool. Exp. Gen**. 1974.
- DAVID, J. R.; COHET, Y.; FOUILLETT, P. The variability between individuals as a measure of senescence: a study of the number of eggs laid and the percentage of

- hatched eggs in the case of *Drosophila melanogaster*. **Experimental Gerontology**. 1975.
- DOBZHANSKY, T. Experiments on sexual isolation in *Drosophila*: III. Geographic strains of *Drosophila sturtevanti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 1944.
- DOBZHANSKY, T. Experiments on Sexual Isolation in *Drosophila*: X. Reproductive Isolation Between *Drosophila Pseudoobscura* and *Drosophila Persimilis* Under Natural and Under Laboratory Conditions. **PNAs**. 1957.
- DOBZHANSKY, T. Genetic nature of species differences. **The American Naturalist**. 1937.
- DODD, D. M. B. Reproductive isolation as a consequence of adaptive divergence in *Drosophila pseudoobscura*. **Evolution**. 1989.
- DREYER, A. P.; SHINGLETON, A. W. The Effect of Genetic and Environmental Variation on Genital Size in Male *Drosophila*: Canalized but Developmentally Unstable. **PloS One**. 2011.
- EBERHARD, W. G. Male–female conflict and genitalia: failure to confirm predictions in insects and spiders. **Biological Reviews**. 2004.
- EBERHARD, W. G.; LEONARD, J. Rapid divergent evolution of genitalia. **The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals**. 2010.
- EBERHARD, W. G. Female control: sexual selection by cryptic female choice. **Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice**. 1996.
- EBERHARD, W. G. Sexual selection and animal genitalia. **Harvard University Press**. 1985.
- EBERHARD, W. G. Why study spider sex: special traits of spiders facilitate studies of sperm competition and cryptic female choice. **The Journal of Arachnology**. 2004.
- EBERHARD, W. G.; HUBER, B. A.; RODRIGUES, R. L. S. BRICENO, R. D.; SALAS, I.; RORIGUEZ, V. One size fits all? Relationships between the size and degree of variation in genitalia and other body parts in twenty species of insects and spiders. **Evolution**. 1998.
- EBERHARD, W. G.; LEONARD, J. Rapid divergent evolution of genitalia. **The evolution of primary sexual characters in animals**. 2010.
- EVANS, J. P.; GASPARINI, C.; HOLWELL, G. L.; RAMMARINE, I. W.; PITCHER, T. E.; PILASTRO, A. Intraspecific evidence from guppies for correlated patterns of male and female genital trait diversification. **Proceedings of the Royal British Society**. 2011.

- EVARDSSON, M.; CANAL, D. The effects of copulation duration in the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. **Behaviour Ecology**. 2006.
- FABIAN, D. K.; FLATT, T. Life history evolution. **Nature Education Knowledge** **wl**. 2012.
- FABIAN, D. K.; LACK, J. B.; MATHUR, V.; SCHLOTTERER, C.; SCHMIDT, P. S. Spatially varying selection shapes life history clines among populations of *Drosophila melanogaster* from subSaharan Africa. **Journal of Evolutionary Biology**. 2015.
- FABIAN, D.; FLATT, T. The evolution of aging. **Nature Education Knowledge**. 2011.
- FINCH, C. E. Longevity, senescence, and the genome. **Chicago, IL: University of Chicago Press**, 1990.
- FLATT, T. Life-History Evolution and the Genetics of *Fitness* Components in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**. 2020.
- FLATT, T. Survival costs of reproduction in *Drosophila*. **Exp. Gerontol**. 2011.
- FLATT, T.; HEYLAND, A. Mechanisms of life history evolution: the genetics and physiology of life history traits and trade-offs. **Oxford Biology**. 2011.
- FLATT, T.; SCHMIDT, P. Integrating evolutionary and molecular genetics of aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2009.
- BARTON, D. B.; LOUIS, E. J. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. **Genetics**. 2006.
- GAVORA, J. S.; PARKER, R. J.; MCMILLAN, I. Mathematical Model of Egg Production. **Poultry Science**. 1971.
- GOWEN, J. W.; JOHNSON, L. E. On the mechanism of heterosis. I. Metabolic capacity of female races of *Drosophila melanogaster* for egg production. **The American Naturalist**. 1946.
- GREENSPAN, R. J.; FERVEUR, J. F. Courtship in *Drosophila*. **Annual Review of Genetic**. 2000.
- GROMKO, M. H. Unpredictability of correlated response to selection: pleiotropy and sampling interact. **Evolution**. 1995.
- GROMKO, M. H.; BRIOT, A.; JENSEN, S. C.; FUKUI, H. H. Selection on copulation duration in *Drosophila melanogaster*: predictability of direct response versus unpredictability of correlated response. **Evolution**. 1991.
- GUILLÍN, E. R.; RAFAEL, V. Cinco especies nuevas del género *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) en la provincia de Napo, Ecuador. **Iheringia Série Zoologia**. 2017.

- HALDANE, J. B. S. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. **Journal of Genetics**. 1922.
- HALL, J. C. Courtship lite: a personal history of reproductive behavioral neurogenetics in *Drosophila*. **Journal of Neurogenetics**. 2002.
- HARSHMAN, L. G. Life span extension of *Drosophila melanogaster*: genetic and population studies. **Population and Development Review**. 2003.
- HOFFMAN, A. A. A laboratory study of male territoriality in the sibling species *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. **Animal Behaviour**. 1987.
- HOFFMAN, A. A. Territorial encounters between *Drosophila* males of different sizes. **Animal Behaviour**. 1987.
- HOFFMAN, A. A.; PARSONS, P. Evolutionary genetics and evolutionary stress. **Oxford University Press**. 1991.
- HOFREITER, M.; RABEDER, G.; JAENICKE-DESPRÉS, V.; WITHALM, G.; NAGEL, D.; PAUNOVIC, M.; JAMBRĚSIĆ, G.; PÄÄBO, S. Evidence for reproductive isolation between cave bear populations. **Current Biology**. 2004.
- HOLLAND, B.; RICE, W. R. Perspective: chase-away sexual selection: antagonistic seduction versus resistance. **Evolution**. 1998.
- HOSAKI-KOBAYASHI, M. K.; BICUDO, H. E. M. Productivity in mass crosses of *Drosophila-sturtevantii* - a comparative-study of laboratory stocks and recently collected flies. **Revista Brasileira de Genética**. 1994.
- HOULE, D. Genetic covariance of fitness correlates: what genetic correlations are made of and why it matters. **Evolution**. 1991.
- HOULE, D.; HUGHES, K. A.; HOFFMASTER, D. K.; IHARA, J.; ASSIMACOPOULOS, S.; CANADA, D.; CHARLESWORTH, B. The effects of spontaneous mutation on quantitative traits. I. Variances and covariances of life history traits. **Genetics**. 1994.
- HUGHES, K. A.; LEIPS, J. Pleiotropy, constraint, and modularity in the evolution of life histories: insights from genomic analyses. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2017.
- HUGHES, S. E.; EVASON, K.; XIONG, C. J.; KPRNFELD, K. Genetic and pharmacological factors that influence reproductive aging in nematodes. **PLoS Genetics**. 2007.
- ILLANGO, K.; LANE, R. P. Coadaptation of male aedeagal filaments and female spermathecal ducts of the old world Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**. 2000.

- JAGADEESHAN, S.; SINGH, R. S. A time-sequence functional analysis of mating Behaviour and genital coupling in *Drosophila*: role of cryptic female choice and male sex-drive in the evolution of male genitalia. **J Evol Biol.** 2006.
- KAMIMURA, Y.; MITSUMUTO, H. Comparative copulation anatomy of the *Drosophila melanogaster* species complex (Diptera: Drosophilidae). **Entomological Science.** 2011.
- KAMIMURA, Y.; MITSUMUTO, H. Lock-and-key structural isolation between sibling *Drosophila* species. **Entomological Science.** 2012.
- KANESHIRO, K. Y. V. A study of the relationships of Hawaiian *Drosophila* species based on external male genitalia. **University of Texas Publication.** 1969.
- KIRKWOOD, T. B. L. Evolution of ageing. **Nature.** 1977.
- KIRKWOOD, T. B. L.; KAPAHI, P.; SHANLEY, D. P. Evolution, stress, and longevity. **Journal of Anatomy.** 2000.
- KLEPSATEL, P.; GÁLIKOVÁ, M.; DE MAIO, N.; RICCI, S.; SCHOTTERER, C.; FLATT, T. Reproductive and post-reproductive life history of wild-caught *Drosophila melanogaster* under laboratory conditions. **Journal of Evolutionary Biology.** 2013.
- KNIGHT, G. R.; ROBERTSON, A. Fitness as a measurable character in *Drosophila*. **Genetics.** 1957.
- KNOWLES, L. L.; MARKOW, T. Sexually antagonistic coevolution of a postmating-prezygotic reproductive character in desert *Drosophila*. **PNAS.** 2001.
- KUNTNER, M.; CODDING, J. A.; SHCNEIDER, J. M. Intersexual arms race? Genital coevolution in nephilid spiders (Araneae, Nephilidae). **Evolution.** 2009.
- KYRIACOU, C. P; HALL, J. C. The function of courtship song rhythms in *Drosophila*. **Animal Behaviour.** 1982.
- LANGERHANS, R. B.; ANDERSON, C. M.; HEINEN-KAY, J. L. Causes and consequences of genital evolution. **Integrative and Comparative Biology.** 2016.
- LASBLEIZ, C.; FEVEUR, J. F.; EVERAERTS, C. Courtship behaviour of *Drosophila melanogaster* revisited. **Animal Behaviour.** 2006.
- LATURNEY, M.; MOEHRING, A. J. The genetic basis of female mate preference and species isolation in *Drosophila*. **International journal of evolutionary biology.** 2012.
- LEFRANC, A.; BUNDGAARD, J. The and influence of male and female body size on copulation duration fecundity in *Drosophila melanogaster*. **Hereditas.** 2000.
- LEWONTIN, R. C. The Genetic Basis of Evolutionary Change. **Columbia University Press.** 1974.

LITI, G.; BARTON, D. B.; LOUIS, E. J. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. **Genetics**. 2006.

LUCKINBILL, L. S.; ARKING, R.; CLARE, M. J.; CIROCCO, W. C.; BUCK, S. A. Selection for delayed senescence in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**. 1984.

LYMAN, R. F.; LYMAN, R. A.; YAMAMOTO, A.; HUANG, W.; HARBISON, S. T.; ZHOU, S.; ANHOLT, R.; MACKAY, T. F. C. Natural genetic variation in a dopamine receptor is associated with variation in female fertility in *Drosophila melanogaster*. **The Royal Society Publishing**. 2023.

MACHADO, L. P. B.; MADI-RAVAZZI, L.; MATEUS, R. P. Mating speed and copulation duration of *Drosophila sturtevantii* in different male densities. **Drosophila Information Service**. 2021.

MADI-RAVAZZI, L.; SEGALA, L. F.; ROMAN, B. E.; ALEVI, K. C. C.; PREDIGER, C.; YASSIN, A. VAN-HUA, A. L.; MILLER, W. J. Integrative taxonomy and a new species description in the *sturtevantii* subgroup of the *Drosophila saltans* group (Diptera: Drosophilidae). **Zootaxa**. 2021.

MAGALHÃES, L. E. VII. Notes on the Taxonomy, Morphology, and Distribution of the Saltans Group of *Drosophila*, with Descriptions of Four New Species. **The University of Texas Publication**. 1962.

MAGALHÃES, L. E.; BJORNBERG, A. J. S. Estudo da genitália masculina de '*Drosophila*' do grupo '*saltans*' (Diptera). **Revista Brasileira de Biologia**. 1957.

MALLET, J. What does *Drosophila* genetics tell us about speciation? **Trends in ecology & Evolution**. 2006.

MARGOLIS, J.; SPRADLING, A. Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. **Development**. 1995.

MARKOW, T. A. Behavioural and sensory basis of courtship success in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 1987.

MARKOW, T. A. Evolution of *Drosophila* mating systems. **Evolutionary Biology**. 1996.

MARKOW, T. A. Parents Without Partners: *Drosophila* as a Model for Understanding the Mechanisms and Evolution of Parthenogenesis. **Genes. Genomes. Genetics**. 2013.

MARKOW, T. A.; HANSON, S. Multivariate analysis of *Drosophila* courtship. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 1981.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. M. Reproductive ecology of *Drosophila*. **Functional Ecology**. 2008.

MAYR, E. Animal species and evolution. **Harvard University Press**. 1963.

- MAYR, E. Isolation as an evolutionary factor. **Proceedings of the American Philosophical Society**. 1959.
- MAYR, E. Speciation phenomena in birds. **Am. Nat.** 1940.
- MAZZI, D.; KESANIEMI, J.; HOIKKALA, A.; KLAPPERT, K. Sexual conflict over the duration of copulation in *Drosophila montana*: why is longer better? **BMC Evolutionary Biology**. 2009.
- MEDAWAR, P. B. An Unsolved Problem of Biology. **London, UK: H. K. Lewis**. 1952.
- MEDAWAR, P. B. Old age and natural death. **Modern Quarterly**. 1946.
- MENEZES, B. F.; VIGODER, F. M.; PEIXOTO, A. A.; VERALDI, J.; BITNER-MATHÉ, B. C. The influence of male wing shape on mating success in *Drosophila*. **Animal Behaviour**. 2013.
- MIRTH, C. K.; FRANKINO, A. W.; SHINGLETON, A. W. Allometry and size control: what can studies of body size regulation teach us about the evolution of morphological scaling relationships? **Science Direct**. 2016.
- MOORE, A. J.; PIZZARI, T. Quantitative genetic models of sexual conflict based on interacting phenotypes. **The American Naturalist**. 2005.
- MOURÃO, C. A.; BICUDO, H. E. M. C. Duas novas espécies de *Drosophila* do grupo "*Saltans*" (Drosophilidae, Diptera). **Papéis avulsos de Zoologia**. 1967.
- MOUSSEAU, T. A.; ROFF, D. A. Natural selection and the heritability of fitness components. **Heredity**. 1987.
- NANDA, P.; SINGH, B. N. Behavioural reproductive isolation and speciation in *Drosophila*. **Journal of biosciences**. 2012.
- NASCIMENTO, A. BICUDO, H. E. M. C. Further study on the esterase patterns of sibling species in the *Drosophila saltans* subgroup (*saltans* group): intraspecific and interspecific variations in the development. **Genetica**. 2006.
- NASCIMENTO, A. P.; BICUDO, H. E. M. C. Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the *saltans* subgroup (*saltans* group). **Genetica**. 2002.
- NOMURA, S.; FUJISAWA, T.; SOTA, T. Role of Sex-Concordant Gene Expression in the Coevolution of Exaggerated Male and Female Genitalia in a Beetle Group. **Mol. Biol. Evol.** 2021.
- NOOR, M. A. F.; GRAMS, K. L.; BERTUCCI, L. A.; ALMENDAREZ, Y.; REILAND, J.; SMITH, K. R. The Genetics of Reproductive Isolation and the Potential for Gene Exchange Between *Drosophila pseudoobscura* and *D. Persimilis* via Backcross Hybrid males. **Evolution**. 2001.

- NOOR, M.A .F.; GRAMS, K.L.; BERTUCCI, L.A.; REILAND, J. Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 12084-12088, 2001.
- NOSIL, P.; SCHLUTER, D. The genes underlying the process of speciation. **Trends in Ecology & Evolution**. 2011.
- NOVOSELTSEV, V. N.; ARKING, R.; CAREY, J. R.; NOVOSELTSEVA, J. A.; YASHIN, A. I. How an individual fecundity pattern looks in *Drosophila* and medflies. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 2004.
- NOVOSELTSEV, V. N.; ARKING, R.; CAREY, J. R.; NOVOSELTSEVA, J. A.; YASHIN, A. I. Individual fecundity and senescence in *Drosophila* and medfly. **J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.** 2005.
- NOVOSELTSEV, V. N.; ARKING, R.; NOVOSELTSEVA, J. A.; YASHIN, A. I. Evolutionary optimality applied to *Drosophila* experiments: hypothesis of constrained reproductive efficiency. **Evolution**. 2002.
- NOVOSELTSEV, V. N.; NOVOSELTSEVA, J. A.; YASHIN, A. I. What does a fly's individual fecundity pattern look like? The dynamics of resource allocation in reproduction and ageing. **Mech. Ageing Dev.** 2003.
- O'GRADY, P. M.; CLARK, J. B.; KIDWELL, M. G. Phylogeny of the *Drosophila saltans* species group based on combined analysis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Biology and Evolution**. 1998.
- OKUZAKI, T.; SOTA, T. How the length of genital parts affects copulation performance in a carabid beetle: implications for correlated genital evolution between the sexes. **Journal of Evolutionary Biology**. 2014.
- ORR, H. A. The genetic basis of reproductive isolation: insights from *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2005.
- ORR, H. A.; PRESGRAVES, D. C. Speciation by postzygotic isolation: forces, genes and molecules. **BioEssays**. 2000.
- PAABY, A. B.; SCHMIDT, P. S. Dissecting the genetics of longevity in *Drosophila melanogaster*. **Fly**. 2009.
- PAN, L.; CHEN, S.; WENG, C.; TANG, H.; ZHANG, N.; XIE, T. Stem cell aging is controlled both intrinsically and extrinsically in the *Drosophila* ovary. **Cell stem cell** . 2007.
- PARKER, G. A. Sexual selection and sexual conflict. **Sexual Selection and Reproductive Competition in Insects**. 1979.
- PARTRIDGE, L.; BARTON, N. H. Evolution of aging: Testing the theory using *Drosophila*. **Genetica**. 1993.

- PARTRIDGE, L.; FOWLER, K. Responses and correlated responses to artificial selection on thorax length in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**. 1993.
- PARTRIDGE, L.; HOFFMAN, A. A.; JONES, J. S. Male size and mating success in *Drosophila melanogaster* and *D. pseudoobscura* under field conditions. **Animal Behaviour**. 1987.
- PARTRIDGE, L.; SIBLY, R. Constraints in the female life-histories. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. 1991.
- PÉLABON, C.; FIRMAT, C.; BOLSTAD, G. H.; VOJE, L. K.; HOULE, D.; CASSARA, J.; ROUZIC, A. L.; HANSEN, T. F. Evolution of morphological allometry. **Annals of The New York Academy of Sciences**. 2014.
- PRASAD, N. G.; JOSHI, A. What have two decades of laboratory life-history evolution studies on *Drosophila melanogaster* taught us? **Journal of Genetics**. 2003.
- PRESGRAVES, D. C. The molecular evolutionary basis of species formation. **Nature Reviews Genetics**. 2010.
- PRESGRAVES, D. C.; BALAGOPALAN, L.; ABMAYR, S. M.; ORR, H. A. Adaptive evolution drives divergence of a hybrid inviability gene between two species of *Drosophila*. **Nature**. 2003.
- PRIOLI, A. J.; BICUDO, H. E. M. C. Reproductive isolation in the *saltans* group of *Drosophila* II. the *parasaltans* subgroup. **Genetica**. 1978.
- REZNICK, D.; TRAVIS, J. The empirical study of adaptation in natural populations. In Adaptation. **Academic Press, San Diego**. 1996.
- RITCHIE, M. G.; HALSEY, E. J.; GLEASON, J. M. *Drosophila* song as a species-specific mating signal and the behavioural importance of Kyriacou & Hall cycles in *D. melanogaster* song. **Animal Behaviour**. 1999.
- ROBERTSON, F. W. Studies in quantitative inheritance X. Genetic variation of ovary size in *Drosophila*. **Journal of Genetics**. 1957.
- ROBERTSON, F. W. Studies of quantitative inheritance. XI. Genetic and environmental correlation between body size and egg production. **Journal of Genetics**. 1957.
- ROBERTSON, F. W. The ecological genetics of growth in *Drosophila*. The genetic correlation between the duration of the larval period and body size in relation to larval diet. **Genetics Research**. 1963.
- ROFF, D. A. Contributions of genomics to life-history theory. **Nat. Rev. Genet.** 2007.
- ROFF, D. A. Life History Evolution. **Sinauer, Sunderland, MA**. 2002.

- ROFF, D. A. The Evolution of Life Histories – Theory and Analysis. **Chapman and Hall, New York**. 1993.
- ROMAN, B. E.; MADI-RAVAZZI, L. Male terminalia morphology of sixteen species of the *Drosophila saltans* group *Sturtevant* (Diptera, Drosophilidae). **Zootaxa**. 2021.
- RONN, J.; KATVALA, M.; ARNQVIST, G. Coevolution between harmful male genitalia and female resistance in seed beetles. **PNAs**. 2007.
- ROSE, M. R. Artificial selection on a fitness-component in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**. 1984.
- ROSE, M. R. Evolutionary Biology of Aging. **Oxford. University Press**. 1991.
- ROSE, M. R. Theories of life history evolution. **American Zoologist**. 1983.
- ROSE, M. R.; BRADLEY, T. J. Evolutionary physiology of the cost of reproduction. **Oikos**. 1998.
- ROSE, M. R.; CHARLESWORTH, B. Genetics of life history in *Drosophila melanogaster*. I. Sib analysis of adult females. **Genetics**. 1981.
- SASABE, M.; TAKAMI, Y.; SOTA, T. QTL for the species-specific male and female genital morphologies in *Ohomopterus* ground beetles. **Molecular Ecology**. 2010.
- SAWAMURA, K.; TOMARU, M. Biology of reproductive isolation in *Drosophila*: toward a better understanding of speciation. **Population Ecology**. 2002.
- SAWAMURA, K.; YAMAMOTO, M. T. Cytogenetical localization of Zygotic hybrid rescue (*Zhr*), a *Drosophila melanogaster* gene that rescues interspecific hybrids from embryonic lethality. **Molecular and General Genetics**. 1993.
- SCHMIDT, P. S.; IPPOLITO, M. M.; EANES, W. Geographic variation in diapause incidence, life-history traits, and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**. 2005.
- SCHMIDT, P. S.; PAABY, A. Reproductive diapause and life-history clines in North American populations of *Drosophila melanogaster*. **Evolution**. 2008.
- SCHMIDT, P. S.; PAABY, A. B.; HESCHEL, M. S. Genetic variance for diapause expression and associated life histories in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**. 2005.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. Scaling: Why is Animal Size So Important? **Cambridge University Press**. 1984.
- SHINGLETON, A. W. The regulation of organ size in *Drosophila*: physiology, plasticity, patterning and physical force. **Organogenesis**. 2010.

- SHINGLETON, A. W.; FRANKINO, A. W.; FLATT, T.; DOUGLAS, F. N.; EMLEN, J. Size and shape: the developmental regulation of static allometry in insects. **BioEssays**. 2007.
- SIMMONS, L. M. Sexual selection and genital evolution. **Austral Entomology**. 2014.
- SIMMONS, L. W.; GARCIA-GONZALES, F. Experimental coevolution of male and female genital morphology. **Nature communications**. 2011.
- SIMMONS, M. J.; CROW, J. F. Mutations affecting fitness in *Drosophila* populations. **Annual Review of Genetics**. 1977.
- SMITH, J. M. The Effects of Temperature and of Egg-Laying on the Longevity of *Drosophila Subobscura*. **Journal of Experimental Biology**. 1958.
- SOTA, T.; KUBOTA, K. Genital lock-and-key as a selective agent against hybridization. **Evolution**. 1998.
- SOTO, I. M.; CARREIRA, V. P.; SOTO, E. M.; MARQUEZ, F.; LIPKO, P.; HASSON, E. Rapid divergent evolution of male genitalia among populations of *Drosophila buzzatii*. **Evolutionary Biology**. 2013.
- STEARNS, S. C. Life history evolution: successes, limitations, and prospects. **Naturwissenschaften**. 2000.
- STEARNS, S. C. Life-history tactics: a review of the ideas. **The Quarterly review of biology**. 1976.
- STEARNS, S. C. The Evolution of Life Histories. **Oxford University Press**. 1992.
- STERN, D. L.; EMLEN, D. J. The developmental basis for allometry in insects. **Development**. 1999.
- TAKAMI, Y.; SOTA, T. Rapid diversification of male genitalia and mating strategies in *Ohomopterus* ground beetles. **European Society for Evolutionary Biology**. 2007.
- TANAKA, T.; YAMAZAKI, T. Fitness and its components in *Drosophila melanogaster*. **The Japanese Journal of Genetics**. 1990.
- TANG, H. Y.; SMITH-CALDAS, M. S. B.; DRISCOLL, M. V. SALHADAR, S.; SHINGLETON, A. W. FOXO Regulates Organ-Specific Phenotypic Plasticity In *Drosophila*. **Plos Genetics**. 2011.
- TANTAWY, A. O.; VETUKHIV, M. O. Effects of size on fecundity, longevity and viability in populations of *Drosophila pseudoobscura*. **The American Naturalist**. 1960.
- TATARNIC, N. J.; CASSIS, G. Sexual coevolution in the traumatically inseminating plant bug genus *Coridromius*. **Journal of Evolutionary Biology**. 2010.

- TAYLOR, M. L.; WIGMORE, C.; HODGSON, D. J.; WEDELL, N.; HOSKEN, D. J. Multiple mating increases female fitness in *Drosophila simulans*. **Animal Behaviour**. 2008.
- TERADA, K.; TAKAHASHI, S.; TAKAMI, Y. Functional, genetic, and structural constraints on the exaggeration and diversification of male genital morphology in *Ohomopterus* ground beetles. **Entomological Science**. 2023.
- TRAVA, B. M.; MATEUS, R. P.; MACHADO, L. P. B.; MADI-RAVAZZI, L. Moderate Population Structure in *Drosophila sturtevantii* from the South American Atlantic Forest Biome. **Zoological Studies**. 2021.
- TU, M. P.; YIN, C. M.; TATAR, M. Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster*. **General and Comparative Endocrinology**. 2005.
- TURISSINI, D. A.; MCGIRR, J. A.; PATEL, S. S.; DAVID, J. R.; MATUTE, D. R. The Rate of Evolution of Postmating-Prezygotic Reproductive Isolation in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**. 2018.
- VEA, I. M.; SHINGLETON, A. W. Network-regulated organ allometry: The developmental regulation of morphological scaling. **Wiley Interdisciplinary Reviews**. 2021.
- VINCENT, B. J.; RICE, G. R.; WONG, G. M.; GLASSFORD, W. J.; DOWNK. I.; SHASTAY, J. L.; CHARLESOBI, K.; NATARAJAN, M.; GOGOM.; ZEITLINGER, J.; REBEIZ, M. An atlas of transcription factors expressed in male pupal terminalia of *Drosophila melanogaster*. **Gene Genome Genetics**. 2019.
- WATSON, P. J.; STALLMAN, R.; ARNQVIST, G. Sexual conflict and the energetic costs of mating and mate choice in water striders. **The American Naturalist**. 1998.
- WILLIAMS, G. C. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. **Evolution**. 1957.
- YASSIN, A. Unresolved questions in genitalia coevolution: bridging taxonomy, speciation, and developmental genetics. **Organisms Diversity & Evolution**. 2016.
- YASSIN, A.; ORGOGOZO, V. Coevolution between Male and Female Genitalia in the *Drosophila melanogaster* Species Subgroup. **PloS One**. 2013.
- ZHAO, R.; XUAN, Y.; LI, X. R, XI. Age-related changes of germline stem cell activity, niche signaling activity and egg production in *Drosophila*. **Aging Cell**. 2008.
- ZORZATO, S. V.; YASSIN, A.; MADI-RAVAZZI, L. Signature of climatic differentiation on mitochondrial DNA of *Drosophila sturtevantii*. **Mitochondrial DNA Part A**. 2022.

ZWAAN, B.; BIJLSMA, R.; HOEKSTRA, R. F. Artificial selection for developmental time in *Drosophila melanogaster* in relation to the evolution of aging: direct and correlated responses. **Evolution**. 1995.

ZWAAN, B.; BIJLSMA, R.; HOEKSTRA, R. F. Direct selection on life span in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**. 1995.

APÊNDICE A – TABELAS SUPLEMENTARES

TS1: Tempo de cópula das espécies do subgrupo *elliptica*. 1/2/3/4/5/6/7/8/9/10= réplicas

INTRACRUZAMENTOS										
Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>EM</i>	-	-	21min	21min	-	12min	17min	23min	18min	-
						21min	23min	26min		
								20min		
<i>NEO</i>	24min	18min	23min 21min	24min	19min	-	-	-	-	-
	19min		15min		23min					
<i>NEOS(A)</i>	28min	-	-	14min	-	-	34min	41min	39min	20min
				44min				42min		20min
						32min				
<i>NEOS(OP)</i>	-	28min	32min	27min	-	33min	30min	32min	29min	28min
			31min	35min		27min				
						29min				

Fonte: Elaborado pelo autor

TS2: Fertilidade em *D. emarginata* (Tirimбина)

Réplicas	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	TOTAL
R1	4	0	2	6	2	2	7	23
R2	21	14	9	12	26	4	13	99
R3	22	8	23	8	14	1	3	79
R4	1	40	18	15	4	10	1	89
R5	0	10	23	10	8	15	17	83
R6	12	13	19	8	4	7	3	66
R7	18	19	30	11	14	3	4	99
R8	37	41	25	41	8	3	7	162
R9	0	0	1	5	5	2	1	14
R10	2	13	4	0	3	2	1	25
TOTAL	117	158	154	116	88	49	57	739

Fonte: Elaborado pelo autor

TS3: Fertilidade em *D. neoelliptica*.

Réplicas	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	TOTAL
R1	2	11	27	5	1	10	10	66
R2	0	5	6	15	7	16	16	65
R3	3	24	4	4	8	16	7	66
R4	1	43	18	18	3	6	29	118
R5	4	55	14	30	19	7	3	132
R6	1	10	10	24	3	8	10	66
R7	0	1	3	7	8	13	1	33
R8	1	3	28	10	8	3	4	57
R9	0	0	0	0	5	29	8	42
R10	3	16	3	2	16	9	31	80
TOTAL	15	168	113	115	78	117	119	725

Fonte: Elaborado pelo autor

TS4: Fertilidade em *D. neosaltans* (Aguai).

Réplicas	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	TOTAL
R1	31	1	44	18	6	13	12	125
R2	22	2	17	33	23	7	25	129
R3	33	19	2	16	1	7	20	98
R4	34	2	37	7	0	8	22	110
R5	37	11	31	4	0	13	21	117
R6	0	4	3	6	1	0	15	29
R7	24	7	46	4	3	19	17	120
R8	21	1	22	20	20	20	9	113
R9	76	4	36	9	1	9	2	137
R10	50	6	25	5	3	10	10	109
TOTAL	328	57	263	122	58	106	153	1087

Fonte: Elaborado pelo autor

TS5: Fertilidade em *D. neosaltans* (Ouro Preto).

Réplicas	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	TOTAL
R1	6	0	19	9	8	13	43	98
R2	43	39	25	21	7	7	12	154
R3	19	21	7	18	28	54	28	175
R4	11	6	26	13	12	31	33	132
R5	24	51	3	14	18	29	39	178
R6	1	19	21	7	11	6	13	78
R7	37	25	30	24	28	1	5	150
R8	43	65	6	10	18	6	15	163

R9	34	17	5	8	8	1	0	73
R10	27	45	13	7	11	0	0	103
TOTAL	245	288	155	131	149	148	188	1304

Fonte: Elaborado pelo autor

TS6: Fecundidade *D. emarginata* (Tirimбина)

Réplicas	1°		2°		3°		4°		5°		6°		7°		TOTAL	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	3
R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R3	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
R4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R5	0	0	4	2	5	3	0	0	1	0	4	4	6	1	20	10
R6	1	5	6	4	9	2	3	2	0	2	1	2	1	1	21	16
R7	6	5	4	3	8	11	3	3	4	2	1	1	1	1	27	26
R8	3	3	10	12	13	10	1	7	4	2	1	1	4	2	36	37
R9	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0
R10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TOTAL	10	13	28	21	35	26	9	12	9	7	7	7	12	6	101	92
	=23		=49		=61		=22		=16		=14		=18		=193	

Fonte: Elaborado pelo autor

TS7: Fecundidade de *D. neoelliptica*.

Réplicas	1°		2°		3°		4°		5°		6°		7°		TOTAL	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
R1	0	0	0	0	3	1	0	2	0	0	2	0	0	0	5	3
R2	0	0	0	0	1	4	3	0	0	1	2	5	0	1	6	11
R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R4	0	0	1	1	3	4	5	3	0	0	1	0	1	0	11	8
R5	0	0	13	6	6	4	9	4	3	4	0	0	1	0	32	18
R6	0	0	1	8	2	2	4	0	2	1	2	3	0	2	11	16
R7	0	0	0	0	2	0	1	2	1	0	0	1	0	0	4	3
R8	0	0	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4
R9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	1	1	3	4
R10	0	0	4	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	4	3
TOTAL	0	0	19	16	20	20	22	12	6	6	9	12	3	4	79	70
	=0		=34		=40		=34		=12		=21		=7		=149	

Fonte: Elaborado pelo autor

TS8: Fecundidade *D. neosaltans* (Aguai)

Réplicas	1°		2°		3°		4°		5°		6°		7°		TOTAL	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
R1	14	16	1	0	20	10	7	2	1	1	3	1	4	5	50	35
R2	8	12	0	1	8	13	16	10	8	6	2	4	15	7	57	53
R3	14	15	6	3	1	1	1	7	0	1	4	2	7	10	33	39
R4	4	2	0	0	14	9	2	3	0	0	1	4	8	6	29	24
R5	21	14	0	0	12	10	0	1	0	0	3	1	7	9	43	35
R6	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	11	1	14	2

R7	0 0	0 0	11 16	3 5	0 2	6 9	10 6	30 38
R8	9 3	0 0	7 9	2 8	9 4	6 6	5 1	38 31
R9	8 13	1 2	20 11	4 4	1 0	3 4	1 1	38 35
R10	6 5	2 3	13 10	1 3	3 0	5 2	1 3	31 26
TOTAL	84 80	10 9	106 119	39 54	22 14	33 33	69 49	363 318
	=164	=19	=225	=93	=36	=63	=118	=681

Fonte: Elaborado pelo autor

TS9: Fecundidade de *D. neosaltans* (Ouro Preto).

Réplicas	1°		2°		3°		4°		5°		6°		7°		TOTAL	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
R1	3	1	0	0	5	5	2	2	3	3	8	4	9	4	30	19
R2	19	11	14	8	8	6	6	3	2	4	6	1	2	2	57	35
R3	2	2	0	1	3	0	10	6	3	5	5	7	4	2	27	23
R4	0	0	1	0	5	6	2	2	0	2	3	2	5	3	16	15
R5	3	11	8	9	1	1	5	6	3	11	14	11	11	20	45	69
R6	1	0	8	3	5	4	0	2	3	2	3	1	2	3	22	15
R7	11	12	5	9	14	10	8	13	6	10	1	0	3	3	48	57
R8	4	7	1	9	3	0	7	2	7	5	2	2	6	3	30	28
R9	8	4	6	5	2	2	1	3	4	1	0	1	0	0	21	16
R10	8	11	11	13	9	2	1	3	2	2	0	0	0	0	31	31
TOTAL	59	52	54	57	55	36	42	41	33	42	42	29	42	30	321	308
	= 111		= 111		= 91		= 83		= 75		= 71		= 72		= 629	

Fonte: Elaborado pelo autor

TS10. Correlação dos componentes da história de vida de *D. emarginata*.

Parâmetros	Fertilidade	Fecundidade	Tempo de Desenvolvimento	Tempo de Corte	Tempo de Cópula
Fertilidade	-	r= 0,6686 *	r= -0,2878	r= -0,4959	r= 0,3865
Fecundidade	r= 0,6686 *	-	r= -0,4231	r= -0,6485 *	r= 0,6053
Tempo de Desenvolvimento	r= -0,1389	r= -0,4231	-	r= 0,7603 *	r= 0,1183
Tempo de Corte	r= -0,4959	r= -0,6485 *	r= 0,7603 *	-	r= -0,2050
Tempo de Cópula	r= 0,3865	r= 0,6053	r= 0,1183	r= -0,2050	-

Fonte: Elaborado pelo autor

TS11. Correlação dos componentes da história de vida de *D. neoelliptica*.

Parâmetros	Fertilidade	Fecundidade	Tempo de Desenvolvimento	Tempo de Corte	Tempo de Cópula
Fertilidade	-	r= 0,7128 *	r= -0,08168	r= 0,01212	r= 0,2445
Fecundidade	r= 0,7128 *	-	r= -0,3502	r= 0,2851	r= 0,1945
Tempo de Desenvolvimento	r= -0,0612	r= -0,3502	-	r= 0,0756	r= 0,5652
Tempo de Corte	r= 0,0121	r= 0,1364	r= 0,0756	-	r= 0,1905
Tempo de Cópula	r= 0,2445	r= 0,1945	r= 0,5652	r= 0,1905	-

Fonte: Elaborado pelo autor

TS12. Correlação dos componentes da história de vida de *D. neosaltans* (Aguai).

Componentes da História de Vida	Fertilidade	Fecundidade	Tempo de Desenvolvimento	Tempo de Corte	Tempo de Cópula
Fertilidade	-	r= 0,8468 *	r= 0,2143	r= 0,2795	r= -0,4846
Fecundidade	r= 0,8468 *	-	r= -0,03116	r= 0,5372	r= -0,5920
Tempo de Desenvolvimento	r= 0,2114	r= -0,03116	-	r= -0,6311	r= -0,1735
Tempo de Corte	r= 0,2795	r= 0,5372	r= -0,6311	-	r= -0,1038
Tempo de Cópula	r= -0,4556	r= -0,5920	r= -0,1735	r= -0,1038	-

Fonte: Elaborado pelo autor

TS13. Correlação dos componentes da história de vida de *D. neosaltans* (Ouro Preto).

Componentes da História de Vida	Fertilidade	Fecundidade	Tempo de Desenvolvimento	Tempo de Corte	Tempo de Cópula
Fertilidade	-	r= 0,4951	r= -0,5708	r= -0,5003	r= 0,4598
Fecundidade	r= 0,4951	-	r= 0,1966	r= -0,2563	r= 0,1718
Tempo de Desenvolvimento	r= -0,4454	r= 0,1966	-	r= -0,0935	r= -0,2962
Tempo de Corte	r= -0,5003	r= -0,2563	r= -0,0935	-	r= -0,0321
Tempo de Cópula	r= 0,5431	r= 0,1718	r= -0,2962	r= -0,0321	-

Fonte: Elaborado pelo autor

TS14: Intercruzamento entre *D. emarginata* e *D. neoelliptica*, número de ovos depositados. Números de 1° a 5°= dias em que houve transferências dos parentais (repiques), a cada três dias totalizando duas semanas.

Intercruzamentos		1°	2°	3°	4°	5°	TOTAL
F	M						
<i>D.neoelliptica</i>	<i>D.emarginata</i> 1	0	10	28	1	8	47
<i>D.neoelliptica</i>	<i>D.emarginata</i> 2	0	15	77	24	12	128
<i>D.neoelliptica</i>	<i>D.emarginata</i> 3	0	1	25	5	1	32
<i>D.emarginata</i>	<i>D.neoelliptica</i> 1	0	0	7	0	0	7
<i>D.emarginata</i>	<i>D.neoelliptica</i> 2	0	0	30	19	14	63
<i>D.emarginata</i>	<i>D.neoelliptica</i> 3	0	0	25	3	0	28
TOTAL		0	26	192	52	35	305

Fonte: Elaborado pelo autor

TS15: Intercruzamento entre *D. emarginata* e *D. neosaltans* (Ouro Preto), número de ovos depositados. Números de 1° a 5°= dias em que houve transferências dos parentais (repiques), a cada três dias totalizando duas semanas.

Intercruzamentos		1°	2°	3°	4°	5°	TOTAL
F	M						
<i>D.emarginata</i>	<i>D. neosaltans</i> 1	0	5	4	8	5	22
<i>D.emarginata</i>	<i>D. neosaltans</i> 2	0	0	1	2	4	7
<i>D.emarginata</i>	<i>D. neosaltans</i> 3	0	0	0	1	1	2
<i>D. neosaltans</i>	<i>D.emarginata</i> 1	0	27	34	10	5	76
<i>D. neosaltans</i>	<i>D.emarginata</i> 2	4	20	17	8	6	55
<i>D. neosaltans</i>	<i>D.emarginata</i> 3	0	41	41	17	12	111
TOTAL		4	93	97	46	33	273

Fonte: Elaborado pelo autor

TS16: Intercruzamento entre *D. emarginata* e *D. neosaltans* (Aguai), número de ovos depositados. Números de 1° a 5°= dias em que houve transferências dos parentais (repiques), a cada três dias totalizando duas semanas.

Intercruzamentos		1°	2°	3°	4°	5°	TOTAL
F	M						
<i>D.emarginata</i>	<i>D. neosaltans</i> (A) 1	0	5	10	4	2	21
<i>D.emarginata</i>	<i>D. neosaltans</i> (A) 2	0	18	0	0	7	25
<i>D.emarginata</i>	<i>D. neosaltans</i> (A) 3	1	6	1	0	3	11
<i>D. neosaltans</i> (A)	<i>D.emarginata</i>	0	9	28	15	10	62
<i>D. neosaltans</i> (A)	<i>D.emarginata</i>	2	20	9	12	1	44
<i>D. neosaltans</i> (A)	<i>D.emarginata</i>	0	19	39	18	13	89
TOTAL		3	77	87	49	36	252

Fonte: Elaborado pelo autor

TS17: Intercruzamento entre *D. neosaltans* (OP) e *D. neoelliptica*, número de ovos depositados. Números de 1° a 5°= dias em que houve transferências dos parentais (repiques), a cada três dias totalizando duas semanas.

Intercruzamentos		1°	2°	3°	4°	5°	TOTAL
F	M						
<i>D. neosaltans</i> (OP)	<i>D. neoelliptica</i> 1	24	20	62	14	1	121
<i>D. neosaltans</i> (OP)	<i>D. neoelliptica</i> 2	7	23	19	0	2	51
<i>D. neosaltans</i> (OP)	<i>D. neoelliptica</i> 3	12	48	45	20	8	133
<i>D. neoelliptica</i>	<i>D. neosaltans</i> (OP) 1	20	29	33	21	49	152
<i>D. neoelliptica</i>	<i>D. neosaltans</i> (OP) 2	1	20	36	23	38	118
<i>D. neoelliptica</i>	<i>D. neosaltans</i> (OP) 3	0	49	72	2	110	233
TOTAL		64	189	267	80	208	808

Fonte: Elaborado pelo autor

TS18: Intracruzamento entre *D. neosaltans* (OP) e *D. neosaltans* (A), número de ovos depositados. Números de 1° a 5°= dias em que houve transferências dos parentais (repiques), a cada três dias totalizando duas semanas.

Intercruzamentos		1°	2°	3°	4°	5°	TOTAL
F	M						
<i>D. neosaltans</i> (OP)	<i>D. neosaltans</i> (A) 1	29	100	86	44	69	328
<i>D. neosaltans</i> (OP)	<i>D. neosaltans</i> (A) 2	11	102	89	71	79	352
<i>D. neosaltans</i> (OP)	<i>D. neosaltans</i> (A) 3	13	78	102	38	75	306
<i>D. neosaltans</i> (A)	<i>D. neosaltans</i> (OP) 1	7	43	90	29	43	212
♀ <i>D. neosaltans</i> (A)	<i>D. neosaltans</i> (OP) 2	12	45	64	20	29	170
<i>D. neosaltans</i> (A)	<i>D. neosaltans</i> (OP) 3	19	44	31	39	29	162
TOTAL		91	412	462	241	324	1530

Fonte: Elaborado pelo autor

TS19: Intracruzamento entre *D. neosaltans* (OP) e *D. neosaltans* (A), número de imagos. Números de 1° a 5°= dias em que houve transferências dos parentais (repiques), a cada três dias totalizando duas semanas.

Intercruzamentos		1°		2°		3°		4°		5°		TOTAL	
F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
(OP)	(A) 1	7	3	2	1	0	0	20	16	5	4	34	24
(OP)	(A) 2	0	0	7	1	0	0	13	20	4	1	24	22
(OP)	(A) 3	0	0	15	10	0	0	13	12	12	6	40	28
(A)	(OP) 1	1	0	19	34	17	8	10	7	19	20	66	69
(A)	(OP) 2	5	7	6	6	7	6	7	7	13	8	38	34
(A)	(OP) 3	17	11	13	5	12	13	12	11	9	12	63	52
TOTAL		30	21	62	57	36	27	75	73	62	51	265	229
		=51		=119		=63		=148		=113		=494	

Fonte: Elaborado pelo autor

TS20: Valores das variáveis morfológicas da Análise de Componentes Principais (PCA) em cada componente.

Variáveis	Componente 1	Componente 2	Componente 3
Genitalia	0.87614	0.48119	-0.028903
Tórax	-0.058312	0.16531	0.98452
Asa	-0.47852	0.86089	-0.17289

Fonte: Elaborado pelo autor