

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA NUTRIÇÃO DE *DROSOPHILA WILLISTONI* STURT

CELSO PAULO JAEGER

(Secção de Zoologia — Instituto de Ciências Naturais da Universidade do Rio Grande do Sul — Pôrto Alegre, e Dept. Fisiologia Geral e Animal, Universidade de São Paulo)

I

INTRODUÇÃO

Muitas vêzes, nos estudos da nutrição de organismos é desejável, e mesmo necessária, a determinação de um meio de cultura quimicamente definido de modo a permitir o desenvolvimento do organismo escolhido em boas condições. Sempre que possível o meio de nutrição deve ser asséptico, providência esta que elimina a análise e síntese que realizam microorganismos concorrentes, proporcionando assim apreciável redução dos fatores variáveis, o que é de importância para melhor avaliação dos resultados.

Estudos deste tipo em animais pluricelulares são relativamente raros na literatura, se considerarmos o grande número de trabalhos realizados com micro-organismos.

Nas pesquisas de fisiologia comparada, principalmente, é de interesse conhecer a influência decisiva no crescimento, na reprodução, enfim na biologia de certos animais bastante utilizados em diversas pesquisas. Dêstes animais, sobressaem-se pela intensidade de investigação já realizada, as môscas do gênero *Drosophila*, o díptero de eleição para os estudos de genética, como bem é conhecido. Culturas deste inseto fazem-se no mundo inteiro, e pareceu-me de importância verificar a influência que nelas possam exercer certos e determinados fatores, principalmente os aminoácidos e vitaminas.

Assim, dispus-me a trabalhar êste tema que me pareceu relevante, como contribuição para o melhor conhecimento da biologia das *Drosophila*.

No presente trabalho tive em mira principalmente o seguinte:

a) determinar um meio de cultura quimicamente definido no qual *D. willistoni* pudesse desenvolver-se normalmente, isto é, que permitisse pupação de tôdas ou quase tôdas larvas até atingirem inclusive o estado adulto;

b) experimentar em tal meio de cultura, linhagens de *D. willistoni* oriundas de populações naturais e transformadas em homozigotas para determinado cromosoma, o que possibilitava verificar diferenças bioquímicas em linhagens geneticamente diversas.

Como se sabe, no estudo da genética de populações, a espécie *D. willistoni* é uma das *Drosophilas* mais empregadas no Brasil, e daí ser uma das espécies brasileiras mais bem conhecidas geneticamente (Pavan et al. 1951, Cordeiro 1952, 1954), Pavan et al. 1954.

Populações de *D. willistoni* costumam apresentar grandes quantidades de mutações recessivas, letais, semi-letais, de esterilidade, morfológicas, etc. Evidentemente, muitas outras mutações devem ter passado despercebidas ao investigador se não utiliza métodos especiais para conhecê-las. Com êste propósito foi o método da análise espectrofotométrica dos pigmentos do olho de *Drosophila* empregado por Nolte e outros (1952, 54). Por sua vez, Hadorn (1953) preferiu a análise cromatográfica para estudo dos mutantes em linhagens homozigotas aparentemente normais. Recentemente Tondo e Cordeiro (1956), utilizando eletroforese, descreveram "mutantes eletroforéticos". Coube, porém, a Hinton (1951) determinar as mutações metabólicas que afetam necessidades nutricionais nestes Dipteros.

Com a finalidade de proporcionar aos geneticistas mais um método aplicável ao estudo das variações genéticas metabólicas em *D. willistoni* foi êste trabalho realizado por sugestão do Dr. Antônio R. Cordeiro, sob a orientação do Dr. Taylor Hinton no Departamento de Zoologia da Universidade da Califórnia e do Dr. Paulo Sawaya do Departamento de Fisiologia Geral e Animal da Universidade de São Paulo, durante o estágio na Universidade de Los Angeles, gra-

ças a uma bolsa de estudos patrocinada pela Fundação Rockefeller. Aos Professôres citados que se tornaram credores de minha gratidão adiciono o nome de minha espôsa, Lic. Euterpe Cauduro Jaeger, auxiliar imprescindível na realização dêste trabalho.

II

MATERIAL E MÉTODOS

Estoques balanceados de linhagens de *D. willistoni* tornadas homozigotas para o II cromosoma pelo método empregado por Pavan et al. (1951) seguindo o clássico método CLB, e originárias de mûscas coletadas de populações naturais em El Destino, República Argentina, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Antônio R. Cordeiro para a realização dêste trabalho.

Coletaram-se os ovos por técnica especial, utilizando um prato raso de vidro provido de uma base de agar-agar a 4%, que era coberta por uma mistura de fermento com Terra de Fuller formando uma camada de um a dois milímetros de espessura sôbre a base de agar. Sôbre o prato assim preparado eram emborcados durante algumas horas garrafas de 1/4 de litro contendo as fêmeas adultas. A camada de fermento e Terra de Fuller assim utilizada era raspada com uma pequena espátula e colocada em cestinhos de tela medindo 1 x 1 x 0,5 cm com malha menor que o diâmetro transversal do ovo de *D. willistoni*. A lavagem dos ovos era feita segurando com uma pinça dois cestinhos de cada vez e aplicando fino jato de água distilada que retirava tôda a mistura de fermento e Terra de Fuller, bem como os detritos visíveis, liberando assim os ovos. A esterilização dos ovos era feita de acôrdo com a técnica de Hinton (1955). Os cestinhos contendo os ovos eram lavados várias vêzes em água distilada corrente, e após lavados também várias vêzes em álcool 70°. Depois, colocados durante 45 minutos em placas esterilizadas cobertas com tampa de vidro e novo álcool 70°. A seguir, os cestinhos eram transferidos individualmente para placas de Petri pequenas, devidamente esterilizadas, contendo uma base de agar a 2%. Estas eram guardadas na estufa a 25°C durante à noite, para a eclosão dos ovos. Êste tratamento mostrou-se eficaz e não injuriava os ovos. Na manhã seguinte, utili-

zando precauções bacteriológicas comuns, as larvas eclodidas eram transferidas para os tubos de ensaio contendo o meio sintético utilizando-se uma alça de platina achatada na ponta. Vinte larvas eram inoculadas por tubo e não mais do que por duas manipulações retiradas da mesma placa de Petri. Como as larvas aderiam facilmente à ponta da alça de platina, uma placa de Petri fornecia larvas para dois tubos. Os tubos eram mantidos na estufa a 25°C sendo as larvas e pupas contadas diariamente até a eclosão dos adultos. Os tubos eram então testados, quanto à contaminação, adicionando-se caldo nutritivo e incubando-os por 48 horas na estufa a 37°C. Em seguida placas de Petri estéreis contendo agar nutritivo eram inoculadas com conteúdo dos tubos e incubadas. De todo tubo que apresentasse contaminação não se considerou nos resultados. As contaminações eram infreqüentes e nunca atingiram mais do que 5% dos tubos.

TABELA I

Meio de cultura quimicamente definido para D. willistoni

	mg/ml		ug/ml
L-Arginina	0,559	Biotina	0,02
L-Cisteína	0,480	Pantotenato de Ca	16,0
L-ác. Glutâmico	4,418	Colina	75,0
Glicina	1,745	ác. Fólico	3,0
L-Histidina	0,484	Piridoxina	2,5
L-Isoleucina	1,260	Riboflavina	10,0
L-Leucina	2,345	Tiamina	2,0
L-Lisina	1,337	Niacinamida	12,0
DL-Metionina	0,339		
L-Fenilalanina	1,008		mg/ml
DL-Treonina	0,756		
L-Triptofano	1,745	KH ₂ PO ₄	1,83
L-Valina	1,355		
		NaH ₂ PO ₄	1,89
Frutose	7,5		
Colesterol	0,3	NaHCO ₃	1,4
ác. Ribonucleico	4,0	Agar	20,0

O meio sintético era preparado segundo o método descrito por Hinton *et al.* (1951). Depois de planejada a experiência, colocavam-se 20 mg de agar em pó em cada tubo de ensaio utilizando-se um dosador automático. Adicionava-se em seguida o colesterol diluído em

eter ao agar em cada tubo. Os aminoácidos e açúcar (sacarose ou frutose) foram pesados em quantidades necessárias para 100 ml finais de meio e depois de misturados em moinho de bolas, dissolvidas em 50 ml de água destilada eram neutralizados com NaOH 0,1 N. A esta mistura adicionavam-se de soluções estoques, conforme o plano da experiência, ácido nucleico, fosfatos, cloretos, sulfatos (exceto FeSO_4 que era preparado na ocasião), carbonatos e as vitaminas (exceto ácido fólico que era diluído em álcool a 20%). A seguir juntavam-se FeSO_4 e ácido fólico. Como cada tubo continha 4 ml de meio de cultura e 6 tubos idênticos eram feitos em cada experiência, necessitávamos para uma experiência somente 24 ml de meio de cultura. Assim os 100 ml de meio eram divididos em 4 partes de 25 ml cada uma, possibilitando a realização de 4 experiências concomitantes. Depois de divididos os 100 ml em partes iguais eram então adicionadas as substâncias que representavam as variáveis experimentais. Os meios de cultura finais eram então novamente neutralizados e em seguida pipetados nos tubos de ensaio. Estes depois de arrolhados com algodão não absorvente eram autoclavados durante 15 minutos a 15 libras de pressão e inclinados para solidificação.

A viabilidade foi medida considerando-se a porcentagem do número original de larvas e o número das que puparam, o tempo médio em dias da inoculação até a pupa e a porcentagem de pupas que produziram adultos. Outros fatores como o tempo gasto na pupa não foram considerados pois independem do meio de cultura (Hinton et al., 1951).

III

PARTE EXPERIMENTAL

Com o propósito de estabelecer o meio de cultura quimicamente definido, de modo a permitir um bom desenvolvimento normal de *D. willistoni*, inicialmente vários experimentos de controle foram realizados e alguns mantidos paralelamente aos meios experimentais durante todo o trabalho. Para provar a eficácia dos meios experimentais utilizaram-se moscas provenientes de fêmeas coletadas na natureza assim como as obtidas pelo intercruzamento de duas linhagens

diferentes dos estoques mencionados na página 3, indivíduos agora portadores de dois II cromosomas existentes em animais capturados no ambiente natural (Cordeiro et al., 1958).

Várias fórmulas básicas que deram bons resultados para *D. melanogaster* (Hinton et al., 1951) foram provadas para *D. willistoni*, apresentando tôdas elas pouco desenvolvimento e longo tempo para pupação em relação ao controle.

TABELA II

Experimentos controle — 25°C

Linhagem número	N.º orig. de larvas	Meio d/cultura	% pupas ^ε	Tempo médio em dias p/pupação	% adultos
220/6	120	Farinha de milho	75,0	9,1	95,5
141	120	" " "	53,3	7,4	90,6
8	120	" " "	55,0	6,8	93,9
7	120	" " "	76,0	6,6	86,9
22G	120	" " "	86,6	7,0	94,2
38	112	Fermento morto Meio para <i>D. melanogaster</i>	68,8	9,6	69,1
220/6	91	Hinton, 18 AA	43,9	17,8	75,0
220/6	116	Hinton, 13 AA	56,0	17,1	83,1
8/220	149	" " "	14,8	14,9	90,9
141/220	124	" " "	19,4	14,3	100,0 *)
141/7	148	" " "	16,9	13,0	100,0 *)
7/8	148	" " "	22,3	14,4	100,0 *)
Selvagem **	115	Sang, caseína	11,6	7,1	22,2
Selvagem	120	" "	10,0	11,3	25,0
Selvagem	131	Difco, K 115 225	33,0	17,8	77,4

*) Êstes dados não são significativos, indicam apenas que tôdas as pupas eclodiram.

**) Linhagens originadas de fêmeas coletadas na natureza e não analisadas geneticamente.

A tabela I sumaria os dados obtidos com êstes meios assim como os experimentos testemunhos com animais homo e heterozigotas. O meio de cultura com caseína Sang, (1956) para *D. melanogaster* foi também experimentado em *D. willistoni*, segundo a fórmula de Sang, assim como substituindo-se a caseína pela mistura de 13 ami-

noácidos que contém os 10 essenciais para *Drosophila* e mais Cisteína, Glicina e ác. Glutâmico que possuem efeito desintoxicante.

Por cortesia do Dr. Taylor Hinton e dos Laboratórios Difco foi também possível provar o meio experimental K115 225 que possui a mesma composição do usado por Hinton (1951). Estes meios não produziram bons resultados conforme sumaria a Tabela II.

Em face da ineficácia dos meios de cultura existentes no tocante a permitir o desenvolvimento de *D. willistoni* passamos a pesquisar novas fórmulas. Evidentemente, toda modificação introduzida que desse bons resultados era logo incorporada no experimento seguinte. Durante o trabalho realizamos 222 experimentos com 76 meios diferentes quimicamente definidos (exceção feita dos poucos com caseína e outros com resíduos de fermento). Todas experiências foram repetidas no mínimo uma vez. O número de larvas por experiência foi sempre ao redor de 120 (menor em casos de contaminação) o mesmo ocorrendo nas repetições.

a) *Necessidades de aminoácidos.*

Experimentamos o emprêgo de um número variável de aminoácidos de modo a iniciar com os 10 essenciais para *Drosophila* (Hinton et al., 1951) e depois aduzir outros em várias combinações dos não essenciais de tal modo a conseguir misturas de 10, 11, 13, 18 e 19 aminoácidos. Como outra variável experimental, a quantidade de certos aminoácidos foi alterada especialmente dos de efeito desintoxicante, como o ácido glutâmico, a cisteína e a glicina. Uma resposta a doses foi feita para fenilalanina e triptofano. A combinação de aminoácidos que melhores resultados ofereceu foi a de Hinton (1956) contendo 13 aminoácidos nas proporções apresentadas na tabela I.

b) *Necessidades de carboidratos.*

Hasset (1948) revisou os trabalhos sobre necessidades de carboidratos em insetos e demonstrou os diferentes valores de uma série de açúcares na nutrição de *Drosophila* adultas. Demonstrou a seguinte ordem de utilização dos açúcares: frutose > maltose > sacarose > glicose > galactose > xilose > lactose. Sang (1956), por sua vez, provou que a frutose é mais conveniente para a *Drosophila*.

Frutose na proporção de 7,5 mg/ml do meio deu melhores resultados com *D. willistoni* do que com sacarose.

c) *Necessidades lipoidicas.*

Lecitina, ergosterol e colesterol foram experimentados individualmente em várias concentrações. Lecitina não é essencial para *Drosophila* (Hinton, 1952, Sang, 1956). Também aqui verifiquei que esta substância não melhora as qualidades do meio quando a é adicionada. Ergosterol utilizado a 0,3 mg/ml não deu melhores resultados que o colesterol, pois na ausência deste as larvas não crescem. A quantidade de colesterol que proporciona melhores resultados é de 0,3 mg/ml.

d) *Necessidades de ácido nucleico.*

Schultz et al. (1946) e Vilee & Bissel (1948) demonstraram não residir o fator crescimento representado pelo ácido ribonucleico no desenvolvimento de *Drosophila* no próprio RNA total, mas sim nas bases purínicas e pirimidínicas que o compõem.

Drosophila tem uma capacidade limitada de sintetizar o ácido nucleico de que necessita, e pode fazê-lo se forem fornecidas as bases purínicas e pirimidínicas. Um mutante que perdeu esta capacidade, não se desenvolve sem adição de adenina (Hinton, 1952). A proporção de RNA e a de seus componentes foram experimentados na dieta. Melhor desenvolvimento obtivemos com 4 mg/ml de RNA. Todas as outras combinações de bases purínicas e pirimidínicas produziram menor efeito. Segundo Sang (1956) uma ótima quantidade de ácido ribonucleico na dieta é suficiente para um bom desenvolvimento.

e) *Necessidades de vitaminas.*

Todas vitaminas incluídas na tabela III mostraram ser essenciais ao desenvolvimento de *D. willistoni*. Inositol e ácido paraminobenzóico que Hinton (1951) comprovou não serem fator de crescimento para *D. melanogaster*, também não o são para *D. willistoni*. B₁₂ que parece aumentar o número de pupas em *D. melanogaster* não tem efeito algum quando retirada da dieta de *D. willistoni*.

f) *Necessidades de sais minerais.*

Sang (1956) demonstrou que as necessidades de sais minerais não podem ser exatamente definidas em meios sintéticos devido à contaminação do agar e outros constituintes com vários metais. As experiências que efetuamos mostram que *D. willistoni* se desenvolve melhor na ausência de Mg, sendo o K, P e Na essenciais.

IV

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com o meio sintético para *D. willistoni* tanto para linhagens homo e heterozigotas como para selvagens estão sumariados na tabela III. A análise destes dados revela que o meio fornecido foi o melhor conseguido dentro das limitações impostas pelas condições assépticas exigidas por este tipo de experiência. Evidentemente, não se pode comparar este crescimento asséptico com o que a mosca encontra na natureza, mas por outro lado pode êle ser confrontado com os experimentos de contrôle (Tabela II) nos quais se deu aos ovos o mesmo tratamento asséptico, utilizando-se meio padrão de farinha de milho (Burdick, 1954) ou fermento inativo. Os resultados mostram que o melhor meio obtido permitiu a pupação de 70,9 a 99,8% das larvas inoculadas, no período de 9,3 a 13 dias, resultado aqui considerado bom se comparado com os 6,6 a 9,9 dias de pupação de 69,1 a 96,8% requeridos por larvas inoculadas em meio de farinha de milho. Para a maior parte das finalidades às quais servirá este meio sintético esta diferença é de pouca monta.

"Mutações metabólicas"

O exame dos resultados obtidos criando homozigotos em meio de cultura quimicamente definido para *D. willistoni* (tabela III) revela que estas linhagens do ponto de vista de sua viabilidade, morfologia, etc., classificadas como *normais* em meio de cultura comum, apresentam aqui viabilidades diferentes, isto é, mostram diferentes capacidades de aproveitar as substâncias presentes no meio para realizar totalmente suas sínteses orgânicas.

Estas linhagens são distribuídas numa seqüência contínua de valores de viabilidade, o que indica a grande diversidade de efeitos produzidos pela homozigose do II cromosoma.

TABELA III

Resultados obtidos com meio quimicamente definido para D. willistoni contendo 13 aminoácidos indicados na Tabela I — 25°C

Linhagem número	N.º orig. de larvas	% de pupas	Tempo médio em dias p/ pupação	% de adultos
Selvagem *)	120	60,0	9,6	88,8
”	120	70,8	9,3	70,9
”	160	68,7	9,6	69,0
”	180	60,0	9,5	88,9
”	180	61,6	13,0	78,3
Homozigotos				
141	117	33,3	13,7	74,3
8	104	5,8	16,0	66,7
8	110	7,3	14,8	75,0
7	124	26,6	14,2	75,7
220	123	22,7	13,7	78,6
38	119	50,8	18,6	66,7
15	120	45,8	23,4	67,3
212	119	5,0	22,7	100,0**)

*) Êste dado indica apenas que tôdas as pupas desenvolveram adultos.

***) Linhagens originadas de fêmeas coletadas na natureza e não analisadas genéticamente.

As linhagens homozigotas D8 e D212, principalmente, poderiam ser consideradas portadoras de “mutações metabólicas” devido à sua decidida incapacidade de se desenvolverem no meio sintético. Disso decorre a existência de uma provável herança de diferenças bioquímicas oriundas de deficiências nutricionais em consequência da consição de homozigose.

Embora numerosos experimentos tenham sido realizados, os resultados conseguidos não foram de êxito durante o trabalho de modo a permitir identificar necessidades nutricionais específicas de tais linhagens. Nestes experimentos além de variar individualmente a concentração de diferentes substâncias incluídas na dieta da tabela I fo-

ram ainda adicionados em outras experiências as substâncias que aparecem abaixo com as quantidades usadas. Isto na tentativa de identificar alguma mutação metabólica.

	mg/ml
Resíduo de fermento C,	2,0
Resíduo de fermento C,	2,0
Piridoxamina	0,003
Piridoxal	0,003
Glutatião	0,4
Betaina	1,7
Ác. cisteico	0,5
Citrulina	18,0
Homocistina	0,4
Homoscrina	1,26
Sarcosina	1,7
Quinurenina	1,7

Até agora o que se conseguiu foi a acentuada incapacidade de estas *Drosophilas* se desenvolverem em meio de cultura quimicamente definido.

V

CONCLUSÕES E SUMÁRIO

1. Teve-se em mira determinar um meio sintético asséptico que possibilite o desenvolvimento de larvas de *D. willistoni*.
2. Descreveu-se uma técnica especial para coletar ovos de *D. willistoni*.
3. No meio sintético asséptico determinado experimentou-se a viabilidade de linhagens de *D. willistoni* homozigotas para o II cromosoma.
4. Linhagens que decididamente não se desenvolveram neste meio foram consideradas como portadoras de "mutações metabólicas".

VI

SUMMARY

1. A chemically defined medium for raising *D. willistoni* in aseptic conditions is formulated.

2. Special technique for collecting *D. willistoni* eggs is described.
3. On the basis of this medium II chromosome homozygous strains of *D. willistoni* were tested for viability.
4. Strains that consistently failed to grow in this medium were described as carriers of "metabolic mutants".

VI

BIBLIOGRAFIA

1. BURDICK, A. B., 1954 — New Medium of reproducible quality at room temperature. *Drosophila Inf. Service*.
2. CORDEIRO, A. A., 1952 — Experiments on the effects in heterozygous condition of second chromosome from natural populations of *Drosophila Willistoni*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 38: 471-478.
3. CORDEIRO, A. R., 1954 — Viabilidade de heterozigotos e a dinâmica das populações naturais de *Drosophila willistoni*. *Bol. Inst. Cienc. Nat.*, 1: 5-54.
4. CORDEIRO, A. R., JAEGER, C. P., JAEGER, E. C. & WOLF, F., 1958 — Effects in homozygous condition of chromosomes from natural populations of "*Drosophila willistoni*". *Rev. Brasil. Biol.*, 18 (3): 283-292.
5. HADORN, E. & MITCHELL, K. H., 1951 — Properties of mutants of *Drosophila melanogaster* and changes during development as revealed by paper chromatography. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 37: 650-655.
6. HASSETT, C. C., 1948 — The utilization of sugars and other substances by *Drosophila*. *Biol. Bull., Woods Hole*, 95: 114-123.
7. HINTON, T., 1956 — Nucleic acid utilization by *Drosophila*. *Physiol. Zool.*, 29 (1): 20-26.
8. HINTON, T., ELLIS, J. & NOYES, D. T., 1951 — An adenine requirement in a strain of *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 37: 293-299.
9. HINTON, T., NOYES, D. T. & ELLIS, J. F., 1951 — Aminoacids and growth factors, in a chemically defined medium for *Drosophila*. *Physiol. Zool.*, 24, 335-353.
10. HINTON, T. & ROBERTS, M. R., 1952 — Apparent Mendelian and non-Medelian nucleic acid requiring "mutants" of *Drosophila*. *Genetics*, 37: 590-591.
11. NOLTE, D. J., 1952 — The eye pigmentary system of *Drosophila*. III. The action of the eye color genes. *J. Gen.*, 51: 142-186.
12. SANG, J. H., 1956 — The quantitative nutritional requirements of *Drosophila melanogaster*. *Journ. Exper. Biol.* 33 (1): 45-72.

13. SCHULTZ, J., St. LAWRENCE, P. & NEWMAYER, D., 1946 — A chemical defined medium for the growth of *Drosophila melanogaster*. *Anat. Rec.* 96, 540.
14. TONDO, C. V. & CORDEIRO, A. R., 1956 — Biophysical Genetics. I Paper electrophoresis separation of the eye pigments and other components of "*Drosophila*". *Rev. Brasil. Biol.*, 16 (4): 519-526.
15. VILLEE, C. A. & BISSEL, H. A., 1948 — Nucleic acid as growth factors in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 172: 59-66.
16. PAVAN, C., CORDEIRO, A. R., DOBZHANSKI, N., DOBZHANSKY, Th., MALOGOLOWKIN, C., SPASSKY, B. & WEDEL, M., 1951 — Concealed genic variability in Brazilian populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, 36: 13-30.
17. PAVAN, C., KNAPP, E., 1954 — The genetic population structure of Brazilian *Drosophila willistoni*. *Evolution*, 8: 303-313.

