

ANGELA MAROZZI MEDINA

EFEITO NUTRICIONAL DE DIFERENTES MUTANTES
DE ENDOSPERMA DE MILHO EM
Drosophila melanogaster E *Drosophila simulans*

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do grau de
Mestre em Biologia.

CAMPINAS-SP

1981

M468e

4288/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP

AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PRE-
ÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: Angela Marozzi Medina

Nº de Identificação: 785031

Endereço para Correspondência: Rua Salustiano Penteado, nº333 apto. 25

Curso: Biologia Vegetal - fone: 32-5062 - bairro: Botafogo.
Área de concentração Genética Vegetal.

Nome do Orientador: William José da Silva

Título da Dissertação ou Tese: Efeito Nutricional De Diferentes Mutan-
tes De Endosperma De Milho em Drosophila melanogaster e Drosophila
simulans.

Data proposta para a Defesa:

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir des-
ta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou
Tese a interessados.

 / /
Data

assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a
partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha
Dissertação ou Tese a interessados.

 / /
Data

Angela M. Medina
assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consul-
te, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o forne-
cimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a in-
teressados.

 / /
Data

assinatura do aluno

De acordo

Angela Marozzi Medina

Efeito nutricional de diferentes mutantes de endosperma de milho em *Drosophila melanogaster* e *Drosophila simulans*.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da Uni
versidade Estadual de Campi-
nas para a obtenção do grau
de Mestre em Biologia.

Orientador: William José da Silva

1981

Aos meus queridos pais,

Herculano e Dixier,

dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. William José da Silva, pela confiança, estímulo e orientação decisivos para a minha formação científica.

Ao Jorge Alberto de Souza, pelo auxílio nas coletas de Drosophila e ao Prof. Crodowaldo Pavan pela valiosa colaboração na fase inicial de identificação das espécies.

Ao Geraldo Alves dos Santos Júnior, pela dedicação com que colaborou no trabalho prático.

Aos Professores Dr. José Roberto P. Parras, Dr. Octávio Henrique de O. Pavan e Dra. Hebe M. L. de Souza pela participação como membros da banca examinadora e pelas críticas e sugestões apresentadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenadoria do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Aos colegas do Departamento de Genética e Evolução e a todos os amigos que, direta ou indiretamente, colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Hermes, companheiro e amigo, pela valiosa ajuda em muitos experimentos e sobretudo pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

INDICE

	<u>pág.</u>
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	4
2.1, Composição química e valor nutricional das <u>se</u> mentes.....	4
2.2. Genes que afetam a síntese de carboidratos do endosperma.....	6
2.3. Genes que afetam a síntese de proteínas do <u>en</u> dosperma.....	8
2.4. Análise do valor nutricional.....	10
3. Objetivo.....	16
4. Material e Métodos.....	17
4.1. Estudo de seleção.....	17
4.1.1. Coleta e identificação de insetos.....	17
4.1.2. Meios de cultura.....	18
4.1.3. Método de seleção.....	20
4.1.4. Progresso de seleção.....	23
4.2. Experimento de contagem de ovos.....	25
4.3. Experimento de preferência.....	26
5. Resultados e Discussão.....	30

5.1. Experimento de seleção.....	30
5.2. Experimento de contagem de ovos.....	46
5.3. Experimento de preferência.....	49
6. Conclusões.....	53
7. Resumo.....	55
8. Summary.....	58
9. Bibliografia.....	61

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

pág.

- Gráfico 1 - Distribuição da emergência de adultos (%)
nas várias gerações de seleção nas popula-
ções Precoces de Drosophila simulans..... 31
- Gráfico 2 - Distribuição da emergência de adultos (%)
nas várias gerações de seleção nas popula-
ções Tardias de Drosophila simulans..... 34
- Tabela 1 - Número de adultos produzidos nas populações
Originais, Precoce e Tardia de Drosophila
simulans, nos meios de cultura completo, nor-
mal, sugary, opaque-2 e sugary opaque-2..... 37
- Tabela 2 - Peso seco (mg) de 250 insetos adultos das po-
pulações Originais, Precoce e Tardia de Dro
sophila simulans nos meios de cultura comple-
to, normal, sugary, opaque-2 e sugary opa-
que-2..... 42
- Tabela 3 - Número médio de ovos de Drosophila melanogas
ter produzido por 20 casais nos meios de
cultura completo, normal, sugary, opaque-2
e sugary opaque-2, durante 7 dias..... 47
- Tabela 4 - Número médio de ovos de Drosophila melanogas

ter nos meios de cultura normal, sugary,
opaque-2 e sugary opaque-2, num período de
24 horas, em duas intensidades luminosas... 51

1. INTRODUÇÃO

O milho, *Zea mays* L., espécie originária do México e América Central, foi o alimento básico das civilizações Asteca e Maya. Acha-se, hoje, amplamente distribuído em todos os continentes, adaptando-se às regiões das mais variadas altitudes e latitudes.

No Brasil, é cultivado em uma área de 12 milhões de hectares, produzindo anualmente cerca de 20 milhões de toneladas de grãos, que correspondem aproximadamente a 12% da produção dos E.E.U.U., primeiro produtor mundial (Boletim Estatístico IBGE, 1979).

O milho é um cereal de grande importância na alimentação animal e humana, constituindo-se numa das principais fontes de calorias e proteínas da dieta humana em muitas regiões da América Latina. Em alguns países da América Central é responsável por 50% da ingestão diária de calorias e proteínas, atingindo um consumo médio de 350g/dia/ pessoa (BRESSANI, 1972). É o terceiro produto mais consumido na alimentação humana, superado apenas pelo arroz e trigo. Destaca-se, entretanto, por ser o cereal que produz a maior quantidade de calorias e proteínas por unidade de área (JOHNSON & LAY, 1974).

Recentemente tem-se dado ênfase especial a programas de genética e melhoramento envolvendo características que determinam o valor nutritivo da semente. Muitos mutantes de endosperma têm sido estudados destacando-se o opa

que-2 (02), *floury-2* (fl-2), *opaque-7* (07) e *brittle-2* (bt2) que elevam o teor de lisina e triptofano no grão. Os genes *sugary* (su), *shrunk-2* (sh2), *brittle-2* (bt), *brittle - 2* (bt2) alteram o metabolismo de carboidratos, produzindo se mentes com composição variada de polissacarídeos.

A determinação do valor nutricional desses mu tantes tem sido baseada em análises químicas e testes de nu trição com animais monogástricos, principalmente roedores, su ños e aves. Esses experimentos exigem condições bastante es peciais para sua execução, tais como, instalações adequadas e pessoal especializado na criação e manejo dos animais. A lém desses fatores, há ainda a se considerar o alto custo dos animais testes. A quantidade de alimentos nesses experi mentos é frequentemente da ordem de meia a uma tonelada, uma vez que a resposta dos animais somente é definida após vá rias semanas de estudo. Essas exigências limitam o emprego dessa metodologia em estudos, envolvendo avaliações rápidas do valor de mutantes do endosperma em pesquisas de genética.

Outro aspecto crítico é a falta de controle da variabilidade genética do animal. A tentativa de uniformi zação de populações de animais testadores para proporcionar uma avaliação mais adequada do valor nutritivo dos alimentos fica muito dificultada em consequência da baixa prolificida de que surge do aumento da endogamia. Finalmente, deve-se sa lientar que o ganho de peso dos animais e a eficiência do a proveitamento das proteínas (PER) são as principais caracte rísticas utilizadas para se avaliar o valor nutritivo do ali

mento.

Essas dificuldades estimularam o desenvolvimento do presente trabalho, que estuda respostas de Drosophila simulans e Drosophila melanogaster a dietas de vários mutantes de endosperma de milho. A escolha deve-se ao fato desse inseto ser facilmente criado em dieta com farinha de milho e, obviamente, pelos conhecimentos acumulados dessa espécie na área de genética. Outra vantagem do emprego de Drosophila seria a possibilidade de diversas variáveis serem consideradas nos estudos de nutrição, tais como o peso de larvas e adultos, número de indivíduos e a distribuição e emergência de adultos numa geração, taxa de oviposição, características de larvas, etc.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Composição química e valor nutricional das sementes.

O milho comum, ou tipo normal, contém todas as principais categorias de nutrientes, ou sejam carboidratos, ácidos graxos, proteínas, vitaminas e sais minerais (EARLE et alii, 1946; SHUKLA, 1975). O valor nutricional do milho pode ser estimado em função da composição química do grão. Essa característica, obviamente, varia em função do estágio de maturação da semente, das condições climáticas e do solo, da qualidade e quantidade de fertilizantes aplicados à cultura e, finalmente do genótipo da semente (BREISSANI & CONDE, 1961; INGLET, 1970). Em média, uma semente de milho contém 83,0% de carboidratos, 4,9% de óleo e 10,6% de proteínas. Esses componentes, porém, não se distribuem de maneira uniforme na semente. O endosperma, que representa 82% do grão, armazena a maior parte dos carboidratos e proteínas da semente, apresentando uma média de 89,0% de carboidratos, 9,5% de proteínas e 0,8% de óleo. O germe que corresponde a 11% da semente apresenta-se com 35,0% de óleo, 18,8% de proteínas e 19,0% de carboidratos (NILSSON et alii, 1968; WEBER, 1978).

A composição dos carboidratos varia consideravelmente durante o desenvolvimento (EARLEY, 1952). No milho seco, o principal carboidrato encontrado na semente é o amido que corresponde a 70% do peso da semente. Apresenta alta

digestibilidade, devido às proporções de suas frações, 27% de amilose e 73% de amilopectina (BATES et alii, 1943). No estágio leitoso, são encontrados ainda, sacarose, açúcares redutores e polissacarídeos solúveis em água (WSP). Entretanto, na semente seca a concentração desses elementos é inferior a 5%.

O óleo é considerado de alta qualidade nutritiva, pois, apresenta 59% de ácido linoleico, 27% de oleico, 12% de palmítico, 2% de esteárico e 0,8% de ácido linolênico, além de β caroteno (BEADLE et alii, 1965; NILSSON et alii, 1968). É ainda importante veículo de nutrientes lipossolúveis, como algumas vitaminas. Sendo o milho um alimento utilizado principalmente como fonte calórica, o conteúdo de óleo aumenta consideravelmente o seu valor energético, uma vez que o óleo possui 2,2 vezes mais calorias por unidade de peso do que o amido (WEBER, 1978).

As proteínas do milho, de acordo com sua solubilidade, são classificadas em: albuminas (solúveis em água) globulinas (solúveis em solução salina), prolaminas (solúveis em etanol 70-80%), glutelinas (solúveis em soluções diluídas de NaOH 0,5M). As prolaminas do milho recebem a denominação de zeína, devido ao nome da espécie *Zea mays* L. Essa classificação, baseada na solubilidade das proteínas, foi estabelecida por OSBORNE e colaboradores (CHITTHENDEN & OSBORNE 1891; OSBORNE & MENDEL, 1914). A zeína e glutelinas são específicas dos cereais e as principais proteínas de reserva que ocorrem no endosperma. Durante o desenvolvimento da semente

de milho, bem como de outros cereais, as proteínas de reser
va são sintetizadas no endosperma e armazenadas em grânulos
bem definidos, envoltos por uma membrana, denominados corpús
culos proteicos (DUVICK, 1961; CHRISTIANSON et alii, 1969;
BURR & BURR, 1975). A análise química desses corpúsculos re
velou que 95% de sua proteína é constituída de zeína (RIGHET
TI et alii, 1977). As frações menores de albuminas e globulin
as encontram-se solubilizadas no citoplasma das células do
endosperma.

A fração de prolamina corresponde a 50% de
proteína total do milho. É uma proteína considerada de baixa
qualidade nutritiva para animais monogástricos, pois, apres
enta deficiência em dois aminoácidos essenciais, lisina e
triptofano, e baixa digestibilidade (OSBORNE & MENDEL, 1914;
BAUDET et alii, 1966; MOSSE et alii, 1966). Essa fração, ent
retanto, possui altos teores de ácido glutâmico, prolina,
leucina e alanina (LANDRY & MOUREAUX, 1970; SODEK & WILSON,
1971; GIANAZZA et alii, 1977).

As outras frações, albuminas e globulinas,
são ricas em lisina, porém, correspondem apenas a 5% das
proteínas do endosperma (MOUREAUX et alii, 1966; PAULIS &
WALL, 1969; SODEK & WILSON, 1971).

2.2. Genes que afetam a síntese de carboidratos do endosperma.

Um grande número de mutações gênicas modifi

cam a composição dos carboidratos do endosperma, alterando as proporções relativas dos diversos açúcares e das frações do amido (CREECH, 1968; TSAI et alii, 1970; SHANNON & CREECH, 1973).

Os gene mutante *waxy* (wx), localizado no cromossoma 9, o *sugary-2* (su-2), no cromossoma 6, *dull* (du) no cromossoma 10, e o *amylose-extender* (ae), no cromossoma 5, alteram a proporção relativa de amilose e amilopectina. Enquanto o grão de amido do milho normal contém, em média 75% de amilopectina e 25% de amilose, o mutante wx possui apenas amilopectina (SPRAGUE et alii, 1943). Entretanto, a quantidade total de amido no endosperma wx é a mesma do endosperma normal (HOLDER et alii, 1974).

O gene *sugary-2* (su-2) aumenta a amilose para níveis entre 38-40% (KRAMER & WHISTLER, 1949; DVONCH et alii, 1951). De forma semelhante, o gene *dull* (du) eleva o teor de amilose para 30-35% (CAMERON, 1947; DVONCH et alii, 1951). O gene *amylose-extender* (ae) eleva o teor de amilose para mais de 60% (VINEYARD & BEAR, 1952; KRAMER et alii, 1958). No entanto, no endosperma ae a quantidade total de amido é reduzida de 10-20% (KRAMER et alii, 1958; CREECH & MC ARDLE, 1966; HOLDER et alii, 1974).

O gene *sugary* (su), localizado no cromossoma 4, o *shrunk* (sh), no cromossoma 9, o *shrunk-2* (sh-2) no cromossoma 3, o *shrunk-4* (sh-4), no cromossoma 5, e *brittle* (bt), no cromossoma 5, reduzem a síntese de amido e acumulam maiores quantidade de sacarose no endosperma do que o tipo

lho normal (SGARBIERI et alii, 1977).

2.3. Genes que afetam a síntese de proteínas do endosperma.

Estudos de fracionamento de proteínas têm demonstrado que o valor nutricional das proteínas do milho acha-se diretamente associado com a diminuição da quantidade de zeína no endosperma, e consequente aumento das outras frações proteicas (NELSON et alii, 1965; MISRA et alii, 1972; TSAI & DALBY, 1974). Entretanto, o baixo teor nutricional das proteínas do milho comum deixou de ser uma limitação com o conhecimento, após 1963, da composição de aminoácidos do mutante *opaque-2*. Vários mutantes, que elevam os teores de lisina e triptofano no endosperma, foram em seguida identificados (MERTZ et alii, 1964; NELSON et alii, 1965). Além do *opa*que-2 (02) localizado no cromossoma 7, foram encontrados os mutantes *opaque-7* (07), no cromossoma 10 e *floury-2* (fl.2), no cromossoma 5 e *brittle-2* (bt), no cromossoma 4. Esses mutantes já eram conhecidos como mutantes de carboidratos mas foram então identificados também como mutantes de alto valor proteico. De modo geral, são conhecidos como mutantes de alta lisina e apresentam modificação no aspecto do grão, que adquire textura farinácea, opaca, leve ou fortemente enrugado (JIMENEZ, 1968; MISRA et alii, 1972; DALBY & TSAI, 1975).

O tipo *opaque-2* é o que tem recebido maior atenção dos pesquisadores, quer do ponto de vista genético,

bioquímico ou nutricional. Quando presente, praticamente duplica o nível de lisina no endosperma (MERTZ et alii, 1964). Este aumento se deve a uma redução na fração de zeína e a um aumento das demais frações, principalmente glutelina. Com essa alteração, a relação zeína/glutelina calculada para o endosperma normal é praticamente invertida no mutante (JIMENES 1966; MOSSÉ, 1966; MOSSÉ et alii, 1966; MURPHY & DALBY, 1971). SODEK & WILSON (1970) demonstraram ainda que no endosperma normal em desenvolvimento a lisina é catabolizada, enquanto no endosperma 02 esta conversão é bem menor, parecendo ser esse o mecanismo de controle do nível de lisina na semente (BRANDT, 1975; SILVA & ARRUDA, 1979).

Esses estudos mostram que o gene *opaque-2* não promove a síntese de novas proteínas, mas produz alterações relativas das diferentes frações proteicas do endosperma de milho, modificando os perfis de aminoácidos desse tecido. Essas modificações dão às sementes características nutricionais bastante superiores ao milho normal.

O mutante *floury-2*, cujo efeito foi descoberto um ano após a do *opaque-2*, revela também melhor qualidade proteica que o tipo comum, porém com aumento de lisina inferior ao do *opaque-2* (NELSON et alii, 1965; HARPSTEAD, 1970). O *floury-3* e o *opaque-6* (MA & NELSON, 1975) são outros mutantes que produzem alterações semelhantes.

Em alguns mutantes onde ocorre uma severa redução de amido, foi observada uma drástica redução no conteúdo de zeína, mostrando como consequência, níveis de lisina bas

tante superiores aos do tipo normal. São eles, o sh2, o sh4, o bt e o bt2 (MISRA et alii, 1972; DALBY & TSAI, 1975; TSAI & DALBY, 1974). A combinação desses mutantes com o *opaque-2* mostrou-se ainda mais efetiva, elevando os níveis de lisina acima do *opaque-2* (MISRA et alii, 1975; BARBOSA & GLOVER, 1978).

Duplos mutantes envolvendo o gene *opaque - 2*, produzindo altos teores de lisina, estimularam SILVA et alii (1978) a desenvolver uma variedade sintética de milho, homo zigota para ambos os genes *sugary* e *opaque-2*. Essa varieda de, denominada Nutrimais, contém cerca de 6 vezes mais açúcares totais que o milho normal. Apresenta uma redução de 50% no teor de amido, com diminuição de 38% na quantidade de amilose na semente. Essa variedade, bem adaptada às nossas condições, apresenta também características proteicas bastante superiores às do milho normal, e ainda com vantagens sobre os tipos *sugary* e *opaque-2*, pois, além de produzir altos teores de lisina, triptofano e açúcares solúveis, revela duas vezes mais lipídeos que o milho comum, o que a torna de grande valor nutricional (SGARBIERI et alii, 1977; SILVA et alii, 1978).

2.4. Análise do valor nutricional.

A variabilidade genética existente na compo sição do endosperma de milho tem sido analisada principalmente por métodos químicos. Através desses processos vêm sendo

estudados os efeitos dos diversos genes que condicionam modificações na composição de carboidratos e proteínas do cereal. Esses efeitos, entretanto, nem sempre acham-se perfeitamente correlacionados com os resultados das análises de nutrição animal.

Animais superiores, notadamente os monogástricos, são frequentemente utilizados em testes de nutrição para avaliação do valor nutritivo de mutantes de endosperma de milho. Em ratos, por exemplo, têm sido observados significativos aumentos no ganho de peso de animais alimentados com farinha do endosperma *opaque-2* em comparação com o milho normal (MERTZ et alii, 1965; BRESSANI et alii, 1969; SGARBIERI et alii, 1977). Resultados semelhantes foram relatados por vários autores que estudaram a alimentação de suínos (CROMWELL et alii, 1967a; CROMWELL et alii, 1969; DREWS et alii, 1969; MARROQUIM et alii, 1973). O emprego de ratos e suínos em experimentos comparativos de nutrição, envolvendo mutantes de alta lisina, como o *opaque-2*, e suas combinações em duplos mutantes tem sido estudado por ROSA (1976). Ele verificou que as respostas às várias dietas de duplo mutantes foram, de modo geral, bastante semelhantes e consideravelmente superiores ao milho comum. Estudos efetuados com aves também mostraram a superioridade do *opaque-2* em relação do milho normal (CROMWELL et alii, 1967b; DREWS et alii, 1969; ADAMS & ROGLER, 1970).

Insetos têm sido utilizados em testes de nutrição na avaliação da qualidade nutritiva de vegetais, pois

apresentam certas semelhanças com animais vertebrados em relação aos principais requisitos alimentares. Assim, sabe-se, em relação à nutrição proteica, que os insetos requerem os mesmos 10 aminoácidos essenciais que os organismos superiores monogástricos, embora as exigências quantitativas variem de acordo com a espécie (SANG, 1954; SANG, 1956; DAVIS, 1972). Idéias semelhantes já foram exploradas anteriormente por vários autores. LECLERQ e DE BAST (1965) sugeriram o uso de larvas de Tenebrio molitor como animal teste para avaliação nutricional de proteínas de alimentos. HOUSE e GRAHAM (1967), embora estivessem interessados em estudar a susceptibilidade de alguns produtos alimentícios ao Tribolium confusum, mostraram que esse coleóptero responde diferentemente ao ser submetido a 20 substratos distintos. Verificaram que T. confusum desenvolveu melhor em alguns substratos, em função da qualidade nutritiva do produto. Dois anos mais tarde, foi observado que T. confusum respondia diferentemente quando alimentado com variedades distintas de cevada (LOSCHIAVO et alii, 1969).

Desde que BEADLE & TATUM (1941) demonstraram pela primeira vez a existência de tipos auxotróficos em *Neurospora*, esses mutantes têm desempenhado papel importante em investigações biológicas. Em estudos nutricionais e bioquímicos para determinação de ação gênica de genes envolvidos em determinadas vias metabólicas, mutantes de bactérias e fungos vêm sendo utilizados intensivamente com grande sucesso. Em insetos também alguns trabalhos nessa linha já

foram realizados. Em Musca domestica, em Tribolium confusum e em Drosophila melanogaster foram isolados mutantes auxotróficos, incapazes de sintetizar determinados nutrientes, tais como, purinas e pirimidinas, como mostraram VYSE & SANG (1971). SANG (1972), pesquisando mutantes auxotróficos em D. melanogaster, sugeriu a possibilidade de mutantes dessa espécie serem usados em pesquisas de nutrição. Isto realmente foi posto em prática com certo sucesso por FALK & NASH (1972).

Os insetos utilizados na análise do valor nutricional de certos produtos são geralmente pragas das espécies vegetais em questão. A grande possibilidade de se encontrarem interações adaptativas entre o hospedeiro e pragas poderia interferir diretamente na eficiência da resposta do inseto ao alimento. A utilização de dieta artificial para análise da resposta nutricional do inseto seria uma alternativa para evitar o problema mencionado.

Os primeiros trabalhos realizados em nosso laboratório, envolvendo criação de Drosophila em dietas de farinhas de diferentes mutantes de endosperma de milho, forneceram indicações concretas sobre a viabilidade do novo método. Foi demonstrado que meios de cultura de diferentes mutantes de endosperma de milho, com modificações nas frações proteicas e carboidratos, determinam o número e o peso de insetos do tipo *selvagem* e do mutante *ebony* de D. melanogaster (DE CARO et alii, 1976). Em seguida, vários ciclos de seleção de D. melanogaster foram efetuados com o objetivo de au

mentar a capacidade dos insetos de diferenciar mutantes de endosperma de milho (SILVA et alii, 1977). Num trabalho posterior, constatou-se que o comprimento de larvas de D. melanogaster é um eficiente indicador do valor nutritivo de mutantes de endosperma do milho (MEDINA et alii, 1979).

O gênero Drosophila contém mais de 700 espécies e é bem representado nas diferentes regiões zoogeográficas do mundo (PATTERSON & STONE, 1952). Trabalhos de genética e ecologia do gênero têm mostrado que similaridades notáveis existem entre várias espécies que coexistem na natureza.

Assim D. melanogaster e D. simulans são diferenciadas pela resposta das duas espécies às variações ambientais que permitem a coexistência de ambas.

D. melanogaster apresenta maior número de indivíduos a 25°C, enquanto D. simulans é superior à temperatura de 15°C (MOORE, 1952). Por outro lado, D. melanogaster é mais bem sucedida quando o alimento é fresco. Quando o alimento torna-se velho e seco, D. simulans torna-se mais abundante. Flutuações no ambiente podem favorecer alternadamente essas duas espécies. Temperatura e taxa de renovação do alimento permitem, pois, que estas duas espécies coexistam de maneira contínua, através de oscilações das duas populações (MILLER, 1964). Entretanto, em regiões onde flutuações de temperatura são pequenas, D. simulans supera, em número, D. melanogaster (PARSONS, 1975). Este fato está bem correlacionado com a maior sensibilidade de D. simulans a extremos de

temperatura (MACKENZIE & PARSONS, 1974). Não seria, portanto, de se estranhar um maior número de D. simulans nas regiões sub-tropicais, como a nossa. Em 1830, MEIGEN descreveu a espécie melanogaster. A grande semelhança entre as espécies D. melanogaster e D. simulans levou muitos estudiosos no assunto a considerá-las como sendo uma única espécie até 1919, quando STURTEVANT descreveu D. simulans. As similaridades morfológicas, comportamentais e ecológicas refletem muito bem suas afinidades genéticas (STURTEVANT, 1919, 1920, 1929). As fêmeas das duas espécies não são distinguíveis por sua morfologia externa, mas as características da genitália masculina permitem uma fácil identificação das espécies.

Em função das semelhanças entre D. melanogaster e D. simulans e da facilidade da coleta de D. simulans, parte desse estudo foi efetuado com a última espécie.

3. OBJETIVO

O presente trabalho é uma tentativa no sentido de se encontrarem novas alternativas para estudo de nutrição animal, envolvendo principalmente aspectos da variabilidade genética da resposta de Drosophila melanogaster e Drosophila simulans à variabilidade genética de mutantes de endosperma de milho que conferem melhor qualidade nutritiva ao produto. A grande quantidade de conhecimentos científicos acumulados em Zea mays e Drosophila sp poderia compor um sistema bastante adequado para o estudo de interações entre essas espécies, baseado na resposta do valor nutritivo do alimento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Estudo de seleção

Várias atividades relacionadas com aspectos de coleta de Drosophila, com seleção de insetos em diferentes dietas de mutantes de endosperma de milho e avaliação do progresso genético foram executadas para a realização desse estudo.

4.1.1. Coleta e identificação de insetos

Todo programa de seleção exige, obviamente, que a população a ser submetida à seleção revele variabilidade genética suficiente para que se possam promover alterações na frequência gênica de genes que condicionam as características em apreço. Por esta razão foram evitadas populações de laboratório nesse trabalho. Foram realizadas diversas coletas de Drosophila. Em maio de 1978 foi feita a primeira, em um pomar de bananeiras na chácara Chapadão, nos arredores de Campinas. Isolaram-se 150 fêmeas que, pelo aspecto morfológico externo, poderiam ser tanto D. melanogaster como D. simulans. Para a diferenciação das espécies as fêmeas foram colocadas em pequenos frascos individuais para oviposição e verificação de seus descendentes machos, uma vez que a observação da morfologia das suas genitálias permite a separação das duas espécies. Constatou-se que todas as

fêmeas isoladas eram da espécie D. simulans.

Como em anos anteriores, coletas de D. melanogaster realizadas no mesmo local, na mesma época de dezembro-janeiro, tiveram grande êxito, decidiu-se aguardar a época mais oportuna para amostrar essa espécie. Em janeiro de 1979, no mesmo local, foi então realizada outra coleta, próximo a um pomar de mangueiras. Isolaram-se 138 fêmeas que foram analisadas em frascos individuais. A identificação posterior de seus descendentes machos revelou que apenas um inseto era D. melanogaster, o restante era D. simulans.

Como o nosso interesse primário se restringia à espécie D. melanogaster, insistiu-se em novas coletas em outras regiões. Com o auxílio do Prof. C. Pavan, do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP, várias coletas foram efetuadas nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo de Campinas, em Cordeirópolis e Monte Alegre do Sul. Exatamente como nas amostragens da região de Campinas, todas essas novas amostragens continham apenas D. simulans; decidiu-se então utilizar a espécie D. simulans para a realização dos trabalhos de seleção.

O estudo de postura e o de preferência de oviposição, foram, entretanto, efetuados com populações mais uniformes (de laboratório) de D. melanogaster.

4.1.2. Meios de cultura

Para o estudo da resposta nutricional de Drosophila a alguns mutantes de endosperma de milho, foram produzidas as seguintes dietas:

Meio completo - Constituido de 11% de farinha de milho normal da cultivar Maya XII, 11% de mel, 6% de fermento, 68% de água, 2% de agar, 2% de solução 1:10 de nipagin e álcool (Metil para-hidroxibenzoato), chamada de solução moldex.

Meio normal - Constituido de 13% de farinha de milho normal da cultivar Maya XII, 82% de água, 3% de agar, 3% de moldex.

Meio sugary - Formado dos mesmos constituintes do meio normal, apenas com a substituição da farinha normal pela farinha de semente *sugary* da cultivar Doce Piramex.

Meio opaque-2 - Da mesma forma, esse meio foi preparado com farinha de milho *opaque-2* da cultivar Maya Opaco.

Meio sugary opaque-2 - Analogamente, feito com farinha do duplo mutante da cultivar Nutrimaiz.

Nos meios *normal*, *sugary*, *opaque-2* e *sugary opaque-2* a farinha de milho correspondeu a 100% dos nutrientes do meio, enquanto que no *meio completo* a farinha de milho correspondeu apenas a 40% dos nutrientes do meio.

Os meios foram preparados dissolvendo-se inicialmente o agar sob aquecimento e acrescentando-se em seguida a farinha de milho já dissolvida em água. Após 15 minutos adicionava-se a solução de nipagin. O meio era então colocado nos frascos em estado pastoso, ainda quente.

Para o preparo do *meio completo* juntava-se

inicialmente o mel ao agar. O fermento, por sua vez, era dissolvido e acrescentando à farinha de milho normal. Além disso, em cada frasco, após o esfriamento e consequente endurecimento do meio era colocada uma pequena quantidade de fermento em pó.

4.1.3. Método de seleção

Partiu-se de uma população base constituída de 204 fêmeas, já fecundadas, coletadas em três localidades diferentes: Monte Alegre, Cordeirópolis e Chácara Chapadão, em Campinas. Seus descendentes foram colocados em *meio com*pleto para aumentar o estoque de moscas que seria em seguida submetido à seleção. Como o valor nutritivo da semente de milho normal e do duplo mutante *sugary opaque-2* são bastante distintos (SGARBIERI et alii, 1977), efetuou-se a seleção de insetos em farinha desses dois tipos bem contrastantes. Aliás, foram esses dois meios que, em testes anteriores, revelaram as maiores diferenças para o número e peso de adultos de D. melanogaster (DE CARO et alii, 1976).

A fim de se criarem novas diferenças na frequência gênica da população original de D. simulans efetuou-se, tanto no *meio normal* como no *sugary opaque-2*, a seleção para moscas que emergiram das pupas no 1º e 2º dias e moscas que emergiram do 6º dia em diante. Os insetos que emergiram mais cedo formaram uma população designada Precoce, enquanto

os insetos que surgiram mais tarde constituíram uma população denominada Tardia.

O estoque inicial de moscas em *meio completo* foi dividido inicialmente em duas partes. Uma para ser submetida à seleção no *meio normal* e a outra para o programa de seleção no *meio sugary opaque-2*. Essas populações constituíram as gerações F_0 em cada meio. Dentro de cada meio os descendentes do 1º e 2º dias formaram a geração F_1 Precoce e os descendentes do 6º dia em diante constituíram a geração F_1 Tardia. Da geração F_1 Precoce os descendentes do 1º e 2º dias de eclosão de adultos foram retirados para formar a geração F_2 . Do mesmo modo, os descendentes do 1º e 2º dias da F_2 formaram a F_3 e assim sucessivamente até a geração F_6 . Para a síntese da população Tardia, os descendentes do 6º dia em diante da geração F_1 foram retirados para formar a geração F_2 e desta, do mesmo modo, os descendentes do 6º dia em diante para constituir a geração F_3 e assim sucessivamente até a F_6 . Tanto na seleção Precoce como na Tardia, nos dois meios, tomaram-se aproximadamente 600 insetos para constituírem a geração seguinte. Após a geração paternal, todos os casais amostrados para produzir a geração seguinte eram retirados de seus frascos, com 24 horas, e colocados em novos frascos, com o mesmo tipo de meio, por três dias. Esse passo, denominado repique intermediário, foi feito visando a obtenção de fêmeas com 4 dias de idade com capacidade de oviposição, em 24 horas, de um número suficientemente grande de ovos pa

ra formar a geração seguinte. Após esse período os casais eram deixados nos respectivos meios de seleção por um período de apenas 24 horas para ovipositarem e constituírem a geração seguinte. Isso foi necessário para que se tivesse um controle da postura de ovos e assim poder atribuir as diferenças de tempo de emergência de adultos às diferenças no período de desenvolvimento das larvas.

Logo na 1^a geração, no meio com milho normal, o número obtido de indivíduos foi extremamente baixo, não havendo possibilidade de se formar a geração F_2 . É possível que o reduzido número de ovos colocados num período de 24 horas nos frascos de seleção contendo milho normal tenha sido em função da própria composição do meio. Outra explicação para a diminuta população F_2 em *meio normal* seria a redução da viabilidade dos ovos em decorrência da deficiente alimentação das fêmeas. Pois, tanto o número de ovos como a viabilidade dos mesmos podem ser diminuídos quando as fêmeas se alimentam de dietas inadequadas (ROBERTSON & SANG, 1944). Essa dificuldade impediu que fosse realizado o programa de seleção previsto para o *meio normal*. No *meio sugary opaque-2* o número de ovos foi sempre suficientemente grande para a obtenção da geração seguinte.

Na 4^a geração, entretanto, houve uma queda da oviposição o que exigiu o relaxamento da seleção por duas gerações para se restaurar a fertilidade de ambas as populações Precoce e Tardia.

Para cada geração foram utilizados 11 frascos de 1/4 de litro, contendo o meio de cultura com farinha de milho *sugary opaque-2*. O número total de indivíduos colocados nos 11 frascos variou em função da distribuição da emergência dos adultos da geração anterior. Todavia, procurou-se colocar nos frascos um número entre 500 a 600 adultos. Essa distribuição foi aproximada, uma vez que os insetos não foram anestesiados para contagem, pois esse tratamento poderia afetar a postura nos frascos de seleção.

Os frascos eram examinados diariamente para marcação de datas do aparecimento das primeiras pupas e de adultos, visando a contagem diária de adultos em cada geração. Com esses valores, tomados em porcentagem, foram traçadas as curvas de distribuição dos adultos em todas as gerações para os dois tipos de moscas.

Ao final do programa de seleção foram obtidas as populações de moscas *Precoce* e *Tardia*, as quais foram submetidas a 6 gerações de seleção no meio *sugary opaque-2*. Durante todo o período de seleção manteve-se a população Original de *D. simulans*, sem seleção, através de repiques sucessivos em meio completo, para utilizá-la como controle na fase seguinte, de análise do ganho de seleção.

4.1.4. Progresso de seleção

Para se avaliar o efeito de seleção, reali

zou-se um experimento em delineamento do tipo inteiramente casualizado, com seis repetições, envolvendo o *meio normal*, o *meio sugary*, o *meio opaque-2*, o *meio sugary opaque-2* e o *meio completo*.

Quando a população Precoce alcançou a 6^a geração de seleção, a população Tardia ainda estava na geração F₅. Como o teste foi planejado para analisar as duas populações com 6 gerações de seleção, foi necessário testar as duas populações em épocas diferentes. Foram planejados então, dois experimentos, um comparando a população Precoce com a Original e, outro, com a população Tardia comparada com a Original. Os dois ensaios foram efetuados em épocas diferentes, porém, na mesma câmara, com temperatura entre 25°C e 26°C, umidade relativa em torno de 85% e iluminação contínua durante as 24 horas do dia.

Como as moscas do estoque Original, sem seleção, foram desenvolvidas sempre em *meio completo* fez-se com que ambas as populações, Precoce e Tardia, selecionadas no *meio sugary opaque-2*, fossem mantidas uma geração no *meio completo* para se evitar um possível efeito de adaptação das moscas ao *meio sugary opaque-2*, que poderia confundir os resultados. Desse modo as populações Precoce, Tardia e Original foram comparadas nos diferentes meios de cultura, com insetos provenientes de larvas alimentadas no *meio completo*.

A unidade experimental foi um frasco de 1/4 de litro contendo o *meio normal*, ou o *meio sugary*, ou o *meio*

opaque-2, ou o *meio sugary opaque-2*. O experimento foi constituído de 6 repetições (frascos) para cada meio. Cada frasco recebeu 20 casais de 24 horas de idade retirados no 4º dia de emergência. Esses insetos ficaram em seus respectivos meios até o aparecimento das primeiras pupas. Na emergência, os adultos descendentes foram contados diariamente e guardados em geladeira para posterior avaliação do peso seco. Para a determinação do peso seco as moscas foram colocadas em estufa a 60°C por um período de 48 horas. Para cada meio e população de moscas foram feitas 3 repetições, cada uma contendo 250 insetos.

4.2. Experimento de contagem de ovos

O experimento foi realizado com delinéamento do tipo inteiramente casualizado, com cinco meios de cultura e três repetições. A unidade experimental foi constituída de um frasco de 1/4 de litro, com um dos cinco meios contendo farinhas de milho *normal*, do *sugary*, do *opaque-2*, do *sugary opaque-2* e o *meio completo*. O experimento foi instalado em câmara com condições bem uniformes, como especificadas anteriormente.

Para contagem de ovos nos frascos de 1/4 de litro, os mesmos utilizados nos experimentos de contagem diãria de adultos, os frascos foram cortados a 4 cm da base, e colados com fita crepe para facilitar a contagem sob a lupa.

Os adultos tinham, desse modo, o mesmo espaço físico, a mesma quantidade de alimento e a mesma superfície de meio para oviposição, condições essas bastante semelhantes às encontradas nos experimentos de contagem de adultos. Após a oviposição os adultos eram retirados dos frascos, as duas partes eram então separadas e a base contendo o meio com os ovos era colocada sob a lupa para contagem dos ovos. A contagem foi feita durante 7 dias consecutivos. No início do experimento cada frasco recebeu 20 casais de 24 horas que aí permaneceram por 24 horas. Em seguida, eram repicados para um novo frasco contendo o mesmo tipo de meio, onde ficavam por 24 horas para ovipositarem. Esse mesmo procedimento foi repetido até o 7º dia.

Os meios foram testados em épocas diferentes em função, principalmente, do grande volume de trabalho. Alguns meios, testados várias vezes, em diferentes épocas, - mostraram resultados de oviposição bem semelhantes, indicando a uniformidade das condições experimentais.

Esse fato tornou viável a análise comparativa do efeito dos diferentes meios testados em épocas distintas.

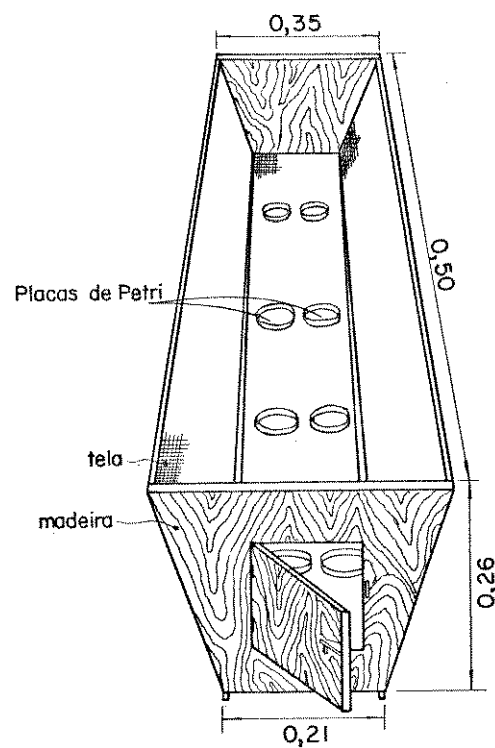
4.3. Experimento de preferência

Para se verificar a possibilidade de oviposição preferencial instalou-se um experimento de múltipla es

colha onde os insetos foram submetidos a várias dietas de milho para ovipositarem. Nesse experimento utilizou-se uma população de D. melanogaster mantida por dezenas de gerações em laboratório, em *meio completo*.

O experimento foi realizado em delineamento do tipo em faixa (GOMES, 1978), com parcelas subdivididas, - com 3 repetições (caixas de populações), sendo a parcela maior as duas faixas laterais da caixa com maior ou menor intensidade de luz, e a menor parcela, os meios de cultura dispostos ao acaso. As caixas de população são armações de madeira revestidas com filô de malha fina, adaptadas para criação de Drosophila (esquema 1). Foram comparados os meios de cultura *normal*, o *sugary*, o *opaque-2* e *sugary opaque-2*, os quais foram colocados em placas de Petri até atingir 1cm de altura. Na base da caixa formaram-se duas fileiras (faixas) de 4 placas distintas. Uma mais próxima da fonte de luz (intensidade luminosa de 780 lux) e outra em local mais sombreado (intensidade luminosa 7,8 lux). As caixas foram colocadas em câmara com temperatura entre 25°C e 26°C e umidade relativa em torno de 85%. Essa estratificação na caixa para se estudar o efeito da intensidade de luz se fez necessária porque em ensaios anteriores, onde os 4 meios eram distribuídos de modo inteiramente casualizado em relação a luz, registram-se altos coeficientes de variação. Observando-se a oviposição das moscas num ensaio preliminar verificou-se que, de modo geral, as placas voltadas para o lado da luz atraíam mais os insetos para oviposição do que as localizadas no la

CAIXA DE POPULAÇÃO



Esquema 1 - Caixa de população de insetos, utilizada no Experimento de Preferência.

do sombreado da caixa. Finalmente, para se evitar um possí-
vel efeito da cor do meio (de levemente amarelado ao amare-
lo) na escolha para oviposição, as caixas foram revestidas
com papel celofane amarelo que visivelmente uniformizava a
coloração dos meios.

Nesse experimento os adultos de 24 horas,
provenientes de um estoque de D. melanogaster, foram inicial-
mente transferidos para novos frascos onde permaneceram por
dois dias. Os adultos eram então anestesiados, com éter, pa-
ra separação e contagem de machos e fêmeas. Em seguida 100
casais de três dias de idade eram colocados em cada caixa de
população, para oviposição durante 24 horas. Após esse perío-
do, os insetos eram retirados das caixas e as placas conten-
do os diferentes meios de cultura eram observadas em lupa pa-
ra contagem de ovos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

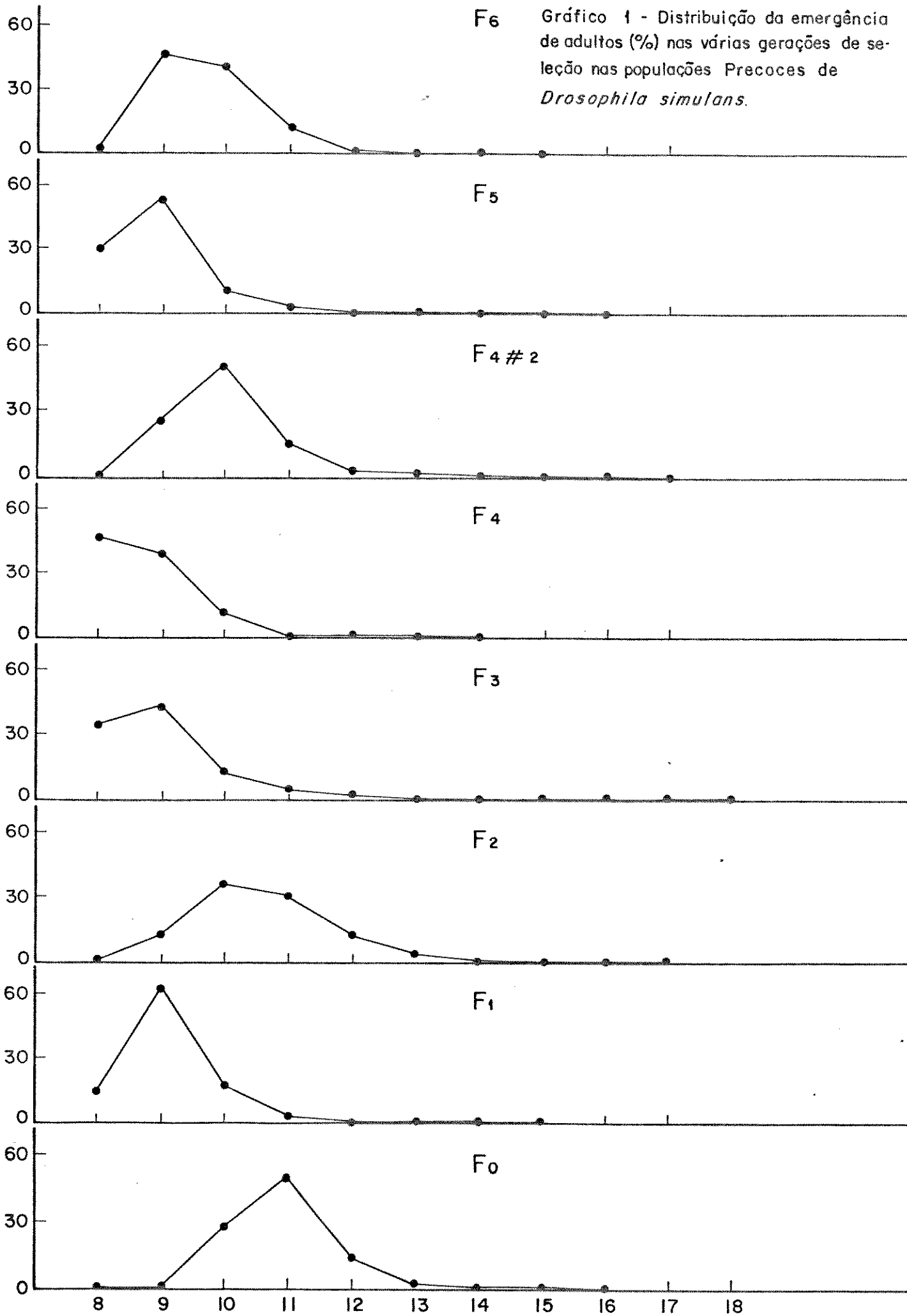
5.1. Experimento de seleção

Os gráficos 1 e 2 mostram a distribuição dos adultos emergidos na população Original (F_0) de D. simulans e nas gerações de seleção (F_1 a F_6), na população Precoce e na Tardia, respectivamente. A análise dessas distribuições revela o comportamento da emergência dos adultos durante o processo de seleção.

A distribuição de adultos na seleção para Precoce (gráfico 1) mostra um deslocamento pronunciado para a esquerda e o ponto de máximo, que na geração Original ocorria no 4º dia de emergência, passou para o 2º na geração F_6 . Nota-se também que houve bastante variação no padrão das curvas das diferentes gerações. Assim, a geração F_1 já apresentou uma diferença considerável em relação à F_0 . Na geração F_2 , no entanto, essa diferença diminuiu. As gerações F_3 e F_4 apresentaram padrões de distribuição com a moda claramente deslocada para os dois primeiros dias de emergência. Entretanto, com duas gerações de relaxamento, na geração $F_4 \neq 2$ houve novamente uma redução na precocidade. Interessante notar que após 4 ciclos com o relaxamento da seleção houve uma tentativa de volta ao padrão de distribuição original. Isso poderia ser explicado em termos de predominância de efeitos genéticos não aditivos. Caso semelhante foi mostrado por ROBERTSON & REEVE (1952) estudando seleção para tamanho do

F₆ Gráfico 1 - Distribuição da emergência de adultos (%) nas várias gerações de seleção nas populações Precoces de *Drosophila simulans*.

PORCENTAGEM DE EMERGÊNCIA DE ADULTOS



DIAS APÓS A COLOCAÇÃO DE ADULTOS NOS FRASCOS

corpo em *Drosophila melanogaster*. Quando a seleção era relaxada o tamanho médio dos insetos era reduzido nas próximas gerações sem seleção, como consequência de interações interalélicas que seriam, continuamente, mantidas nas populações com seleção. Nas gerações sem seleção essas combinações específicas de alelos eram desfeitas em consequência do fluxo genético aleatório.

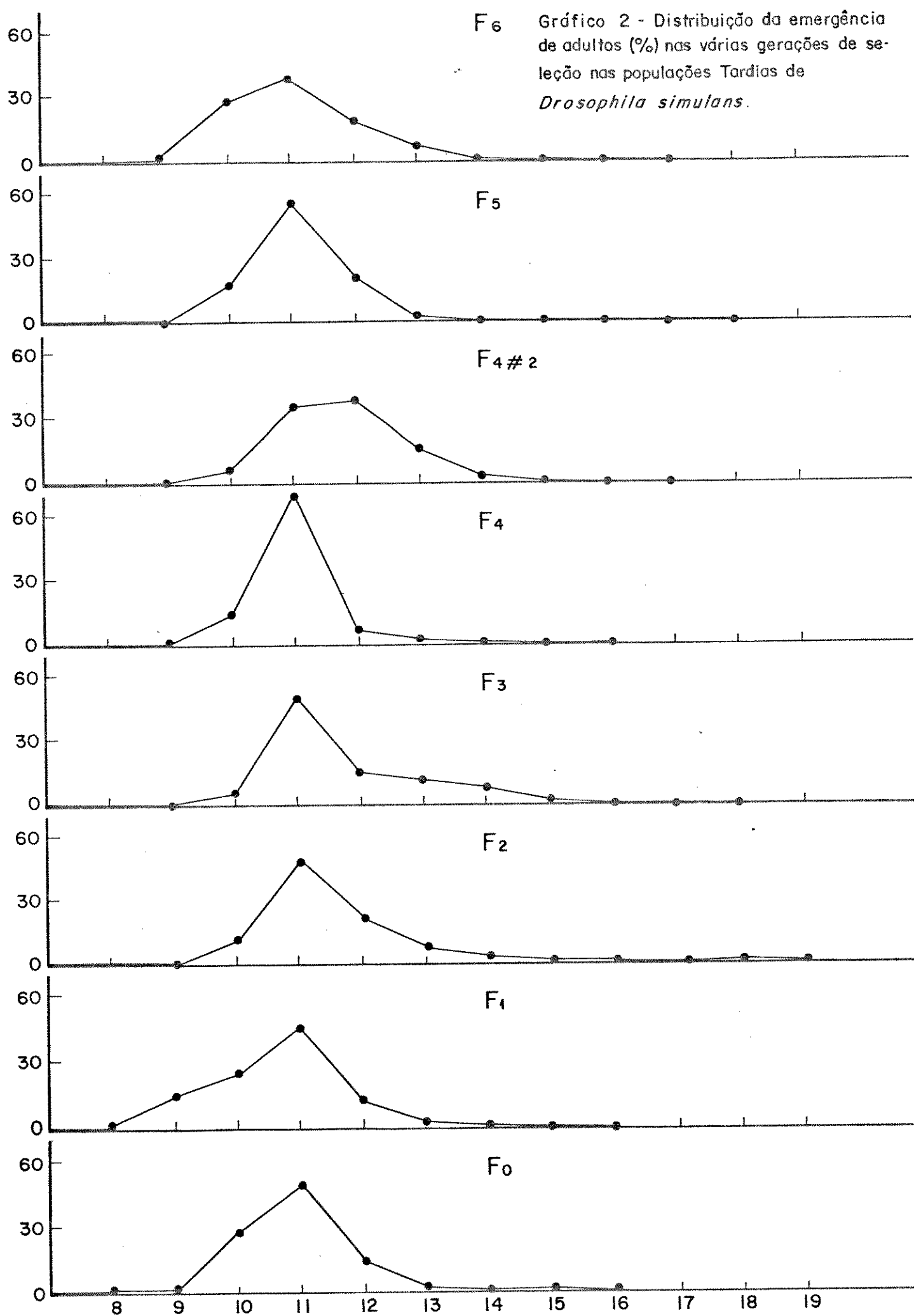
Na geração seguinte houve novamente o deslocamento da distribuição para os primeiros dias, ficando finalmente a geração F_6 com as maiores concentrações da distribuição de adultos nos 2º e 3º dias de emergência. Em termos de distribuição de insetos a seleção para precoces parece ter sido eficiente pois enquanto na população original menos de 0,5% dos adultos nasciam nos dois primeiros dias e 29% nos 3 primeiros dias, na geração F_6 verificou-se que 46% dos adultos nasciam nos dois primeiros dias e 85% nos 3 primeiros dias.

A comparação do ciclo total, isto é, de ovo à emergência do adulto, entre a geração F_6 da população Precoce e a Original revelou que apenas o padrão de emergência de adultos é diferente. O tempo gasto para a realização completa do ciclo foi o mesmo nas duas populações, ocorrendo porém, uma diferença. Foram gastos, em média, 6 dias da oviposição até o aparecimento das primeiras pupas e mais 2 dias para o aparecimento dos primeiros adultos na população Original. Na população F_6 Precoce, os insetos levaram 5 dias para

o aparecimento das primeiras pupas e mais 3 dias para o aparecimento dos primeiros adultos. Desse modo tanto a população selecionada como a população original tiveram o início da emergência no 8º dia.

Na seleção para população Tardia (gráfico 2), entretanto, não houve um progresso genético, em relação à distribuição de adultos, como o observado na população Precoce. A geração F_1 já mostrava uma tendência para a curva se deslocar para a esquerda, portanto, em direção dos precoces, embora a seleção tivesse sido feita para insetos que na geração F_0 emergiram após o 6º dia. As gerações F_2 , F_3 e F_4 apresentaram curvas relativamente semelhantes com picos de emergência um dia a menos que a geração original. A distribuição de adultos após duas gerações de relaxamento de seleção, $F_4 \neq 2$, deslocou-se para a direita em relação às três gerações anteriores. Finalmente, as gerações F_5 e F_6 mostraram a mesma distribuição das gerações F_2 , F_3 e F_4 , apresentando pico máximo de indivíduos no terceiro dia de emergência de adultos.

Ao contrário do que ocorreu para a população Precoce, o primeiro dia de emergência das tardias foi diferente daquele observado para a população original. Na população original houve a necessidade de 6 dias para o aparecimento das primeiras pupas e mais 2 dias para o aparecimento dos primeiros adultos. Na geração Tardia F_6 , entretanto, foram gastos 6 dias para o surgimento das primeiras pupas e mais 3



DIAS APÓS A COLOCAÇÃO DE ADULTOS NOS FRASCOS

dias para o aparecimento dos primeiros adultos. Assim o período de oviposição até o aparecimento dos primeiros adultos foi de 8 dias para a população Original e 9 dias para a população Tardia F_6 . Esses resultados revelam, portanto, que a seleção para moscas que emergem após o 6º dia em meio de farinha do duplo mutante *sugary opaque-2* não foi efetiva para alterar a frequência gênica de genes que condicionam essa característica.

O objetivo desse trabalho de seleção não foi propriamente estudar ganho de seleção, com relação a caracteres relacionados a ciclo, mas sim, gerar populações diferentes de *D. simulans* que pudessem responder distintamente quando submetidas a diferentes dietas de mutantes de milho. Assim, somente um teste de nutrição poderia realmente avaliar o efeito de seleção nas populações Precoce e Tardia.

Embora a situação ideal fosse uma análise comparativa das populações Precoce, Tardia e Original, num mesmo ensaio, isso não foi possível pelas razões técnicas e biológicas já discutidas. O próprio esquema da seleção fez com que a população Precoce atingisse o 6º ciclo de seleção bem antes do ciclo correspondente da população Tardia, exigindo que os testes das duas populações fossem feitos em épocas distintas. Para se compararem essas populações na mesma época, com o mesmo número de ciclos de seleção, haveria a necessidade de se promover um relaxamento na seleção de Precoce para aguardar a Tardia atingir a 6ª geração de seleção e

e isso iria introduzir mais um fator que poderia se confundir com os efeitos em questão. O outro ponto que fez com que se optasse pela execução dos testes em duas etapas foi o excelente controle das condições experimentais na câmara de cultura. Embora as condições de uniformidade das parcelas experimentais fossem bem evidentes, como precaução e como referência, utilizou-se a mesma população Original como controle experimental nas duas épocas.

A tabela 1 mostra os resultados obtidos para números de adultos nas 4 populações de moscas, ou sejam, as selecionadas para precoces, para tardias, bem como, as populações Originais testadas nas duas etapas.

Observando-se as duas colunas relativas às populações de originais verifica-se que os valores obtidos em todos os meios foram muito próximos nas duas populações. Na linha da média verifica-se que as populações Originais 1 e 2 são estatisticamente semelhantes enquanto a Precoce e Tardia são diferentes entre si e diferentes das Originais. A grande semelhança entre as populações Originais, analisadas em épocas distintas, revela a viabilidade de se proceder a uma análise comparativa das respostas das três populações, nos diferentes meios.

Comparando-se as médias do número de adultos nos diferentes meios de cultura verifica-se que eles são estatisticamente diferentes na população Original. O meio completo é cerca de 6,2 vezes superior ao *meio normal*; 2,4 vezes superior ao *meio opaque-2*; 2,1 vezes maior que o *meio*

Tabela 1: Número de adultos produzidos nas populações Originais, Precoce e Tardia de Drosophila simulans, nos meios de cultura completo, normal, sugary, opa-que-2 e sugary opa-que-2.

Meio	Populações			
	Original 1	Precoce	Original 2	Tardia
Completo	995,5 a	659,7 a	1000,7 a	1074,0 a
Normal	162,0 b	172,5 b	158,3 b	169,8 b
Sugary	474,3 c	577,5 c	457,8 c	461,7 c
Opaque-2	406,5 d	387,0 d	409,7 c	508,2 c
Sugary opaque-2	577,8 e	605,3 ac	560,0 d	783,5 d
Média	523,2 a	480,4 b	520,8 a	599,4 c

Letras distintas nas colunas das populações e na linha das médias indicam que os valores obtidos são diferentes ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

C.V. = 7,2%

sugary e 1,8 vezes maior que o *meio sugary opaque-2*.

Essas diferenças obviamente devem ser atribuídas às distintas composições dos meios determinados pelos genes *sugary* e *opaque-2* que atuam no endosperma do milho. O *meio completo* contém todos os componentes necessários para o desenvolvimento normal dos insetos, notadamente, açúcares e aminoácidos. Esse meio foi usado como referência para mostrar o tamanho que uma população pode atingir num meio sem limitações nutricionais, nessas condições experimentais.

O meio mais pobre, o *meio normal*, preparado com endosperma de milho comum, apresenta apenas 2% de açúcares e 9 a 10% de proteína, que se caracteriza principalmente por deficiências em lisina e triptofano. Nesse tipo a príncipal forma do carboidrato é o amido, com amilopectina e amilose na proporção aproximada de 3:1 (BATES et alii, 1943).

O meio de endosperma condicionado pelo gene *opaque-2* produz um aumento médio de 2,5 vezes no número de insetos em decorrência de alterações principalmente nas frações proteicas, que acarreta um aumento de 119% no teor de lisina e 33% na concentração de triptofano. Tanto os carboidratos como os lipídeos são poucos alterados em consequência da presença do gene o2 (MERTZ et alii, 1964; MISRA et alii, 1975; LOHDA et alii, 1976).

Um aumento pouco superior ao do *opaque-2*, da ordem de 2,9 vezes em relação ao endosperma normal, é obtido no número de insetos quando a dieta é preparada à base de enen

dosperma *sugary*. O efeito desse gene é mais restrito a carboídratos, havendo uma drástica redução na síntese de amido com consequente elevação, de cerca de 30%, no teor de fitoglicogênio, que é um polissacarídeo solúvel em água, portanto, de maior valor nutritivo que o amido (ANDREW et alii, 1944; DVONCH et alii, 1951; CREECH & MC ARDLE, 1966; AYÉRS & CREECH, 1969; JENNINGS & MC COMBS, 1969).

Quando, entretanto, os dois genes, *sugary* e *opaque-2*, são colocados na mesma planta, produzindo o endosperma *sugary opaque-2* a dieta desse material produz 3,6 vezes mais insetos que o meio do endosperma comum. Esse efeito, semelhante ao registrado em ratos por SGARBIERI et alii (1977), reflete as alterações químicas condicionadas pelos genes *sugary* e *opaque-2*, melhorando simultaneamente tanto o valor nutricional dos carboídratos como das frações nitrogenadas.

Verifica-se ainda na Tabela 1, que as moscas das diferentes populações responderam de maneiras distintas aos diferentes meios, indicando a existência de interação entre o tipo de seleção efetuada e tipo de dieta. Isso pode ser importante em estudos futuros de seleção de insetos indicadores para aumentar ainda mais a sua capacidade de diferenciar o valor nutritivo dos alimentos. A maior média registrou-se para a Tardia (599 indivíduos) a segunda, para a Original (ao redor de 522 indivíduos) e a última, para a Precoce (480 indivíduos). Essas diferenças mostram claramente

que a seleção efetuada nas populações foi suficiente para alterar as frequências gênicas para características de resposta dos insetos ao valor nutritivo de mutantes de milho. Embora a emergência de adultos na população Tardia não tenha sido alterada em consequência da seleção para esse caráter, essa população difere geneticamente da população Original para número de adultos produzidos. De fato houve um aumento de 15,1% no número de insetos na população Tardia em relação ao estoque original, enquanto na Precoce, que diferiu claramente da Original no padrão de emergência de adultos, houve uma redução de apenas 8,2% no número de moscas. Entretanto, a principal alteração que ocorreu em consequência da seleção nas precoces foi no comportamento das moscas no meio completo. Nessa dieta a população Precoce apresentou uma redução significativa de 33,7% no número de insetos, comparado com a aquele obtido nesse mesmo meio pela população Original. Isso aparentemente indica uma redução da capacidade da mosca de responder a meios mais nutritivos. Observou-se também que não houve diferenças significativas entre a população Precoce e a Original para os *meios normal*, *opaque-2* e *sugary opaque-2*. Entretanto, no *meio sugary* houve um aumento de 21,8% no número de insetos, indicando que a população Precoce parece responder mais aos polissacarídeos solúveis condicionados pelo gene *sugary*.

Na população Tardia, ao contrário da Precoce, o número de insetos no *meio completo* foi mantido, e ela não diferiu da população Original para os *meios normal* e *sugary*.

Em consequência da seleção houve um aumento significativo de 24,0% no número de indivíduos no *meio opaque-2* e de 39,9% no *meio sugary opaque-2*. Os insetos da população Tardia responderam, pois, mais às alterações das frações proteicas, condicionadas pelo gene *opaque-2*, do que as condicionadas pelo gene *sugary* nos carboidratos.

Esse resultado poderá ser de grande importância em estudos de nutrição, pois as respostas dos insetos na população Tardia, aos diferentes meios, é muito semelhante àquelas encontradas por SGARBIERI et alii (1977) utilizando os mesmos mutantes em experimentos de ganho de peso em ratos. O ganho de peso de ratos no *meio normal* foi o menor, seguido do *sugary*, depois do *opaque-2* e do duplo mutante *sugary opaque-2*. Em nosso caso, entretanto, o efeito do duplo mutante para essa característica correspondeu praticamente a soma dos efeitos do gene *sugary* e do gene *opaque-2*.

A tabela 2 mostra os valores obtidos para peso seco de 250 adultos. Uma análise comparativa das duas populações originais confirma as inferências feitas a partir dos dados de número de indivíduos, sobre a repetibilidade de respostas dos animais às diferentes dietas. Dessa forma torna-se perfeitamente válida a comparação direta entre as populações de insetos precoces, tardios e originais, que foram analisadas em épocas diferentes.

Verifica-se que as médias das populações Precoces e Tardia diferiram significativamente da média da popu

Tabela 2: Peso seco (mg) de 250 insetos adultos das populações Originais, Precoce e Tardia de *Drosophila simulans* nos meios de cultura completo, normal, sugary, opaque-2 e sugary opaque-2.

Meio	Populações			
	Original 1	Precoce	Original 2	Tardia
Completo	45,89 a	51,88 a	45,94 a	53,49 a
Normal	39,99 b	35,46 b	39,78 b	40,24 b
Sugary	46,81 a	50,96 a	46,76 c	48,71 c
Opaque-2	46,84 a	42,97 c	46,57 ac	51,07 d
Sugary opaque-2	48,31 c	52,50 a	47,83 c	57,18 e
Média	45,57 a	46,75 b	45,38 a	50,14 c

Letras distintas nas colunas das populações e na linha das médias indicam que os valores obtidos são diferentes ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

C.V. = 0,9%

lação Original. Nota-se que a precisão da análise para peso de insetos ($cv=0,9\%$) é bastante superior à análise para número de insetos ($cv=7,2\%$) e que diferenças mesmo da ordem de 2,5% no peso de insetos na população Precoce, em relação à Original, foram significativas a 1% de probabilidade. O efeito de seleção foi bem maior na população Tardia, com um aumento médio de 10,5% no peso de insetos em relação à população Original.

O meio com endosperma normal, à semelhança do que ocorreu para o número de insetos, revelou o mais baixo valor nutritivo, tanto na população Original como nas selecionadas. Na população Original os meios *sugary*, *opaque-2*, *sugary opaque-2* e *completo* diferiram muito pouco entre si. Na população Precoce, entretanto, houve uma redução significativa da resposta para o meio *opaque-2*.

Foi na população Tardia que ocorreram as maiores diferenças de respostas. Todos os meios, com exceção do meio *normal*, apresentaram aumento no peso de insetos em relação à população Original. São evidentes as respostas positivas registradas para o endosperma *sugary* e para o endosperma *opaque-2*. A diferença do *normal* para o *sugary opaque-2*, que era de aproximadamente 8,1 mg na população Original, passou para 16,9 mg na população Tardia. A população Tardia produziu, portanto, indivíduos que oferecem uma maior resolução para separar os diferentes efeitos de genes mutantes de endosperma de milho. Esses resultados sugerem, pois, que a altera

ção na frequência gênica de fatores genéticos que determinam o tipo de resposta nutricional através de programas de seleção adequados oferece uma importante alternativa para a síntese de genótipos mais apropriados para diferenciar o valor nutritivo dos alimentos.

Como na população Tardia os insetos após 6 ciclos de seleção não diferiram no comportamento de emergência de adultos na população Original, mas sim, nas respostas às diferentes dietas, conclui-se que a resposta de seleção deveu-se, aparentemente, a um melhor aproveitamento das proteínas de melhor qualidade nutritiva e dos carboidratos mais solúveis do endosperma *sugary opaque-2*. Observa-se ainda que o efeito dos genes *su* e *o2* em insetos da população Tardia, para número de insetos e, melhor ainda, para peso de adultos, acha-se fortemente correlacionado com os ganhos de peso em ratos obtidos por SGARBIERI et alii (1977). As semelhança entre essas respostas sugere fortemente o uso de *Drosophila*, principalmente da população selecionada Tardia, como inseto indicador do valor nutritivo de endosperma de milho.

Em nutrição de *Drosophila* existem várias dúvidas com relação a sua forma de alimentação. Alguns autores afirmam que a alimentação mais efetiva não seria do meio de cultura em si (fubá, banana, mel, etc.), mas sim de leveduras que se desenvolvem nesses meios. O inseto levaria em seu trato digestivo microorganismos e ele próprio seria o veículo de inoculação desses microorganismos nos diferentes

meios. Sendo assim, o meio mais nutritivo para Drosophila seria aquele que propiciasse o maior desenvolvimento das leveduras.

Por outro lado, sabe-se que a quantidade e qualidade do alimento disponível muda em estágios sucessivos do desenvolvimento de uma cultura de Drosophila (BEGG & ROBERTSON, 1950). Pelo método de seleção adotado verifica-se que o meio de cultura para moscas precoces estaria em condições distintas daquele dos insetos tardios, pois, enquanto na seleção de precoces selecionava-se indivíduos do 1º e 2º dias, na seleção de tardias apenas eram mantidos os indivíduos do 6º dia de emergência em diante. Dessa forma a população de precoces não entrava nunca em contato com o meio de cultura mais velho, ao passo que as tardias desenvolviam-se principalmente nele. Esse fato poderia estimular o desenvolvimento de linhagens de levedura diferentes nas duas populações como sugeriram ROBERTSON & SANG (1944). Esses autores verificaram que mudanças na natureza do substrato podem favorecer algumas linhagens mais do que outras e consequentemente alterar o valor nutritivo do meio. A seleção na população Precoce e na Tardia no meio *sugary opaque-2* poderia, desse modo, selecionar leveduras do trato digestivo diferentes nas duas populações. Isso poderia até explicar as diferenças nas respostas dessas duas populações testadas nos vários meios de cultura. Na pesquisa realizada e em outras já relacionadas, não se têm condições de determinar se o efeito do ali

mento é direto ou indireto.

5.2. Experimento de contagem de ovos

A distribuição do número médio de ovos obtidos nos diferentes meios de cultura durante 7 dias consecutivos é mostrada na tabela 3. Devido à grande amplitude de variação encontrada nos diferentes meios, foi necessária uma transformação dos dados do tipo $\log(x)$ para melhorar a precisão da análise estatística. Com essa transformação o coeficiente de variação do experimento caiu de 7,3% para 1,1%. O *meio completo* apresentou um número de ovos 43 vezes superior ao *meio normal*, enquanto os *meios sugary*, *opaque-2* e *sugary opaque-2* praticamente não diferiram entre si. A distribuição de ovos variou diariamente nos diferentes meios. No primeiro dia o *meio normal* não diferiu do *meio opaque-2* e do *sugary opaque-2*. Entretanto, os meios do endosperma *sugary* destacaram-se dos demais revelando um acréscimo de 4 vezes no número de ovos, o que parece indicar que o gene *sugary* produz polissacarídeos solúveis que estimulam mais a oviposição que as alterações proteicas causadas pelo gene *opaque-2*.

As grandes diferenças encontradas no número de ovos nos diferentes meios podem explicar, em parte, as diferenças no número de indivíduos nesses mesmos meios (DE CARO, 1976). Entretanto o número de ovos no *meio completo* é significativamente superior ao número de adultos nesse meio.

Tabela 3: Número médio de ovos de Drosophila melanogaster produzido por 20 fêmeas nos meios de cultura completo, normal, sugary, opaque-2 e sugary opaque-2, durante 7 dias.

	Dias							Total
	1	2	3	4	5	6	7	
Completo	60,7	588,0	749,3	910,7	795,7	847,0	712,7	4664,0 a
Normal	19,3	26,7	21,3	15,7	9,0	10,0	6,7	108,7 b
Sugary	34,3	113,3	72,7	39,0	22,3	28,3	22,0	332,0 cd
Opaque-2	23,3	43,0	40,3	51,0	41,3	29,3	33,3	261,7 c
Sugary opaque-2	20,3	89,3	51,0	54,7	49,7	49,7	38,7	354,7 d

Letras distintas na mesma coluna indicam que as médias são diferentes ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey feito com log (x).
C.V. = 1,1%

Dois fatores poderiam explicar essa grande diferença. Um de les seria o excessivo número de ovos colocados numa quanti dade não proporcional de meio, o que levaria a uma forte com petição pelo alimento. Um segundo fator, agindo independente ou simultaneamente, seria uma possível superestimativa do nú mero de ovos no *meio completo* nesse tipo de experimento de taxa de oviposição que apresenta condições um pouco dife tes do experimento de contagem de adultos. A diferença fundamen tal é que neste último os casais são mantidos durante os sete dias no mesmo meio de cultura. Em contraposição, no ex perimento de contagem de ovos, os adultos eram transferidos a cada 24 horas para novos frascos. Assim sendo, ao longo de sete dias as fêmeas entravam, diariamente, em contacto com os meios novos e seriam estimuladas a ovipositarem mais que as fêmeas dos casais mantidos no mesmo frasco durante os se te dias. Nas condições experimentais descritas, 20 fêmeas, de quatro a oito dias de idade, têm o potencial para produzi rem, em média, 800 ovos por dia no *meio completo*. Portanto, o meio com açúcares e proteínas de composição adequada esti mula uma alta e igual oviposição todos os dias. Essa alta ta xa, entretanto, não foi obtida nos meios de endosperma de mi lho, de qualidade nutritiva inferior ao *meio completo*. De mo do geral, nos meios com farinha de milho de mutantes e do tipo *normal*, o número de ovos foi cerca de 15 vezes menor que o número de ovos encontrados no *meio completo*.

Aparentemente, os meios de mais baixo valor nutritivo estimulam negativamente a oviposição com o passar do tempo. Um meio pobre afetaria inclusive o amadurecimento

dos ovos, uma vez que a produção dos primeiros está relacionada com as reservas que o inseto adquiriu enquanto larva (WENTWORTH, 1913; HYDE, 1914). Após esse período, a taxa de oviposição passa a ser função do valor da alimentação dos próprios adultos. Aparentemente, o *meio normal* foi considerado desfavorável para a oviposição, como indicam os baixos valores de número de ovos encontrados nesse meio, principalmente depois do terceiro dia de avaliação. Isso confirma a idéia de que a subnutrição reduz a capacidade reprodutiva (ALPATOV, 1932).

Para os meios feitos apenas com farinha de milho, ao contrário do que ocorreu para o *completo*, foi maior o número de adultos em relação ao número de ovos. Uma possível explicação para essa discrepância seria o fato dos meios sem o fermento, trocados a cada 24 horas, não estimularem muito a oviposição, especialmente o *meio normal*, de baixo valor nutritivo. No experimento da contagem de adultos, como o meio era o mesmo nos sete dias, os adultos, com suas levedu^{ras}, e as próprias larvas eclodidas dos primeiros ovos, provocariam alterações nos meios com a fermentação de alguns compostos, tornando-os mais estimulantes para a ovoposição.

5.3. Experimento de preferência

O resultado obtido da contagem de ovos no teste de múltipla escolha em duas condições de intensidade

luminosa pode ser visto na tabela 4.

Observa-se que o *meio sugary opaque-2* apresentou um número de ovos quase 400 vezes maior que o do *normal*, meio que apresentou apenas 1 a 2 ovos. Em decorrência dessa grande amplitude de variação fez-se uma transformação dos dados em $10(x+1)$ para tornar a análise estatística mais adequada. Esse expediente reduziu o coeficiente de variação do experimento de 31,6% para 8,9%.

42881BC
Testes de múltipla escolha são muito exigentes, havendo necessidade de um bom controle das variáveis envolvidas. Por essa razão o *meio completo* não foi aqui avaliado com os demais. As placas contendo os animais de cultura ficam próximas umas das outras na base da caixa de população e o odor do fermento do *meio completo* poderia afetar a oviposição em placas vizinhas a esse meio. Esse odor atrai as fêmeas de *Drosophila*, de tal maneira para a oviposição, que o faz servir de isca para a captura do inseto na natureza.

Diferenças acentuadas no número de ovos foram observadas tanto a 780 lux como a 7,8 lux.

A análise estatística revelou um significativo efeito de luz na oviposição. De modo geral observou-se que o número de ovos nas placas colocadas na parte iluminada foi 2,2 vezes maior que o número de ovos observados nas placas colocadas na parte mais sombreada. O efeito de luz variou diferentemente nos vários meios mostrando que existe, portanto, uma interação entre efeito de luz e o efeito de meios.

Tabela 4: Número médio de ovos de Drosophila melanogaster nos meios de cultura *normal*, *sugary*, *opaque-2* e *sugary opaque-2*, num período de 24 horas, em duas intensidades luminosas.

Meio	Iluminação (lux)		Média
	7,8	780	
<i>Normal</i>	1,0	2,0	1,5 a
<i>Sugary</i>	41,3	53,7	47,5 b
<i>Opaque-2</i>	31,0	47,7	39,3 b
<i>Sugary opaque-2</i>	341,0	814,3	577,7 c
Média	103,6 a	229,4 b	166,5

Letras distintas na coluna e linha das médias indicam que as médias são diferentes ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, feito com valores transformados em $\log (x + 1)$.

C.V. = 8,9%

Os meios de farinha de milho dos mutantes simples, *sugary* e *opaque-2*, não diferiram entre si, apresentando número de ovos 28 vezes maior que o *meios normal*. O duplo mutante foi 13 vezes superior aos mutantes simples e apresentou número de ovos 385 vezes maior que o endosperma *normal*, devido ao efeito conjunto dos genes *sugary* e *opaque-2*.

Os resultados obtidos no teste de preferência de oviposição, em apenas um dia de experimento, indicaram que *Drosophila melanogaster* responde distintamente a mutantes de endosperma de milho de maior valor nutritivo, principalmente em condições de maior iluminação.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho permite as seguintes inferências:

1. Insetos da espécie Drosophila simulans respondem distintamente a diferentes dietas de mutantes de endosperma de milho, condicionadas por genes que alteram a composição de proteínas e carboidratos.

2. Em dieta de endosperma *sugary opaque-2*, a seleção em Drosophila simulans, para modificação da distribuição da emergência de adultos, produziu duas populações de insetos designadas Precoce e Tardia. Essas populações, bem como a população Original, responderam de modo distinto às diferentes dietas de milho, indicando a eficiência do programa de seleção. Esses resultados revelam a possibilidade, através de seleção, de se sintetizar populações com melhor capacidade de diferenciar o valor nutritivo dos alimentos.

3. A população Tardia de Drosophila simu
lans, avaliada para peso de insetos, apresentou exatamente o mesmo tipo de resposta registrada em teste de nutrição de ratos, indicando que essa população pode perfeitamente ser utilizada para avaliação do valor nutritivo de mutantes de endosperma de milho, à semelhança dos mamíferos monogástricos.

4. O teste de preferência de oviposição com Drosophila melanogaster, realizado em apenas 24 horas mostra

claramente o mutante de endosperma de milho de maior valor nutritivo (*sugary opaque-2*).

7. RESUMO

O presente trabalho tem o objetivo de sugerir novas alternativas para estudo de nutrição animal através da análise das respostas de *Drosophila melanogaster* e *Drosophila simulans* a alguns mutantes de endosperma de milho, que conferem melhor qualidade ao produto.

Para tanto, efetuaram-se 6 ciclos de seleção para moscas precoces (1º e 2º dias de emergência de adultos) e tardias (6º dia de eclosão de adultos em diante) em *D. simulans*, em meio com farinha de milho *sugary opaque-2*. O efeito de seleção foi analisado em um experimento com delineamento do tipo inteiramente casualizado, com seis repetições, envolvendo as populações Precoce, Tardia e Original (sem seleção), nos meios *normal*, *sugary*, *opaque-2*, *sugary opaque-2* e *completo*. A avaliação foi feita através da contagem diária de adultos emergidos em cada meio e através do peso seco de 250 adultos.

Os resultados obtidos com o número de adultos revelaram consideráveis diferenças entre os vários meios de cultura testados. Para a população Original, o meio completo foi cerca de 6,2 vezes superior ao *meio normal*; 2,4 vezes superior ao *meio opaque-2*; 2,1 vezes maior que o *meio su*gary e 1,8 vezes maior que o *meio sugary opaque-2*. A população Precoce comparada com a Original, revelou que não houve diferenças significativas para os meios *normal*, *opaque-2* e

sugary opaque-2. Entretanto, no *meio completo* houve uma redução de 33,9% no número de insetos e no *meio sugary*, um aumento de 23,9% no número de moscas, indicando que com a seleção, as moscas precoces responderam mais aos polissacarídeos solúveis condicionados pelo gene *sugary* do que às frações proteicas controladas pelo gene *opaque-2*. Por outro lado, as tardias não diferiram da população Original nos meios *completo*, *normal* e *sugary*. Houve um aumento de 24,5% no número de adultos no *meio opaque-2* e de 37,7% no *meio sugary opaque-2*, indicando, nesse caso, que a seleção para tardias produziu uma população que respondeu mais às alterações das frações proteicas, condicionadas pelo gene *opaque-2*.

Com relação ao peso de insetos, verificou-se uma precisão muito grande na análise e diferenças mínimas de 2,5% no peso de adultos foram consideradas significativas a 1% de probabilidade. Na análise dessa variável, a população Tardia apresentou respostas bastantes semelhantes àquelas obtidas em testes de nutrição de ratos, sugerindo que essa população pode ser utilizada para avaliação do valor nutritivo de mutantes de endosperma de milho, à semelhança dos mamíferos monogástricos.

Na tentativa de explicar as diferenças observadas no número de adultos, instalou-se um outro ensaio com *D. melanogaster*, com delineamento do tipo inteiramente casualizado com três repetições, onde analisou-se o número de ovos nos meios de cultura *normal*, *sugary*, *opaque-2*, *suga*

ry opaque-2 e *completo*. O *meio completo* apresentou número de ovos 43 vezes superior ao *meio normal*, com 4664 ovos e 109 respectivamente. Com valor cerca de três vezes superior ao *normal*, os *meios opaque-2*, *sugary* e *sugary opaque-2* apresentaram respectivamente 262, 332 e 355 ovos. Os resultados desse tipo de experimento indicam que as grandes diferenças encontradas no número de insetos, nos diferentes meios de cultura, podem ser explicados, apenas em parte, pelas diferenças na postura nesses meios.

Além disso, afim de se verificar a possibilidade de oviposição preferencial, instalou-se um experimento de múltipla escolha, onde os insetos foram submetidos a várias dietas de milho simultaneamente para ovipositarem. Nesse ensaio, insetos da espécie *D. melanogaster* foram mantidos por 24 horas em caixas de população contendo placas de Petri com meios de cultura dos diferentes mutantes de endosperma de milho. Os meios de farinha de milho dos mutantes simples, *sugary* e *opaque-2* apresentaram número de ovos 28 vezes maior que o *meio normal* e não diferiram entre si. O duplo mutante apresentou número de ovos 385 vezes maior que o *meio normal* e foi significativamente superior aos mutantes *sugary* e *opaque-2*. Esse teste de preferência, realizado em apenas 24 horas, indicou que *D. melanogaster* diferencia facilmente o mutante de endosperma de milho de maior valor nutritivo.

8. SUMMARY

This work is an attempt to suggest new alternatives for the study of animal nutrition through the response of *Drosophila* to maize endosperm mutants that present better nutritional value.

Six selection cycles were performed for early emerging flies (1st and 2nd days of hatching) and late emerging flies (6th day on) in *D. simulans*, in a rearing medium with *sugary opaque-2* corn flour. The effect of the selection was analysed with six replicates, involving the Early, Late and the Original (without selection) populations, in *normal*, *sugary*, *opaque-2*, *sugary opaque-2* and *complete* media. Daily counts on adults born in each medium and dry weight of 250 adult individuals were performed. Data on number of adults indicated significant differences among the five culture media. For the Original population *complete* medium was 6.2 times superior to *normal* corn medium; 2.4 times superior to *opaque-2*; 2.1 times greater than *sugary* and 1.8 times greater than the *sugary opaque-2* medium. The Early population when compared to the Original revealed no significant differences for the *normal* medium, *opaque-2* or *sugary opaque-2*. However, in the *complete* medium there was a reduction of 33.7% in the number of insects and an increase of 21.8% in the number of flies at the *sugary* medium indicating that early flies responded more to water soluble polysaccharids, coded by the *sugary* gene, than to the protein

fractions controlled by the *opaque-2* gene. On the other hand, late flies did not differ from the Original population in the *complete*, *normal* and *sugary*. There was an increase of 24.0% in the number of adults in the *opaque-2 medium* and 39.9% in the *sugary opaque-2*, indicating that selection for late flies gave rise to a population that responded more to the modification of protein fractions, controlled by the *opaque-2* gene than to carbohydrates.

Weight of insects showed to be an appropriate trait to indicate medium quality as the precision of this measurement allow to detect significant differences of 2.5% at 1% level of probability. The Late population showed very similar responses to rats suggesting that this population can be used for evaluation of nutritive value of maize endosperm mutants as monogastric mammals.

In an attempt to explain the differences observed in the number of adults, another assay was set with *D. melanogaster*, in a complete randomized design with three replicates, where it was analysed the number of eggs laid in the *normal*, *sugary*, *opaque-2*, *sugary opaque-2* and *complete media*. In the *complete medium* the number of eggs was 43 times higher than the *normal medium*. The *media opaque-2*, *sugary* and *sugary opaque-2* showed respectively 262, 332 and 355 eggs, about three times higher than the *normal medium*. The results of this type of experiment indicated that only part of differences found in number of insects in the

different media can be explained by differences in the number of eggs laid in the media.

To verify the possibility of preferential egg laying it was set an experiment of multiple choice, where the insects were simultaneously exposed to the corn diets. In this assay, insects of D. melanogaster were maintained 24 hours in population boxes containing Petri dishes with the culture medium of the different endosperm corn mutants. The flour media of the single mutants, *sugary* and *opaque-2* showed a number of eggs 28 times greater than the *normal* medium and were not different among themselves. The double mutant had 385 times more eggs than the *normal* medium and therefore highly superior to the single mutants *sugary* and *opaque-2*. This preference test, run for just 24 hours, clearly indicated that D. melanogaster easily chooses the endosperm corn mutant with the highest nutritive value.

9. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, K.J. & ROGLER, J.C. 1970. A comparison of opaque-2 and normal corn in a finishing ration for turkeys. *Poult. Sci.*, 49: 1114-6.
- ALPATOV, W.W. 1932. Egg production in Drosophila melanogaster and some factors which influence it. *J. exp. Zool.* 63: 85-111.
- ANDREW, R.H.; BRINK, F.A. & NEAL, N.P. 1944. Some effects of the waxy and sugary genes on endosperm development in maize. *J. agric. Res.*, 69: 355-71.
- AYÉRS, J.E. & CREECH, R.G. 1969. Genetic control of phytoglycogen accumulation in maize (*Zea mays* L.). *Crop. Sci.* 9: 739-41.
- BARBOSA, H.M. & GLOVER, D.V. 1978. Genes and gene interactions affecting protein and lysine content in the endosperm of maize. *Revta. bras. gen.*, 1: 29-39.
- BATES, L.L.; FREENCH, D. & RUNDLE, R.E. 1943. Amylose and amylopectin content of starches determined by their iodine complex formation. *J. Am. chem. Soc.*, 65: 142-8.
- BAUDET, J.; MOSSE, J.; LANDRY, J. & MOUREAUX, T. 1966. Etude sur les protéins du maiz. I. Composition en acides

- aminés des fractions azotées du grain. *Annls Physiol. vég.*, 8: 321-5.
- BEADLE, G.W. & TATUM, E.L. 1941. Genetic control of biochemical reactions in Neurospora. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S.A.*, 27: 499-506.
- BEADLE, J.B.; JUST, D.E.; MORGAN, R.E. & REINERS, R.A. 1965. Composition of Corn Oil. *JAACS* 42: 90-5.
- BEGG, M. & ROBERTSON, F.W. 1950. The nutritional requirements of Drosophila melanogaster. *F. Exp. Biol.*, 26: 380-7.
- BOLETIM ESTATÍSTICO IBGE. Rio de Janeiro. 1979, v.37.
- BRANDT, A.B. 1975. In vivo incorporation of lysine ^{14}C into the endosperm proteins of wild type and high .lisine barley. *Febs Letters*, 52: 288-91.
- BRESSANI, R. 1972. The importance of maize for human nutrition in Latin America and other countries. In Nutricional Improvement of Maize - INCAP, p. 5-29.
- BRESSANI, R. & CONDE, R. 1961. Changes in the chemical composition and in the distribution of nitrogen of maize at different stages of development. *Cereal Chem.*, 38: 76-84.

- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G. & GÓMEZ, R.A.B. 1969. Protein quality of Opaque-2 corn evolution in rats. *J. Nutr.* 97: 173.
- BURR, F.A. & BURR, B. 1975. Localized synthesis of zein in maize endosperm. *International maize symposium abstracts*. University of Illinois, Urbana Champaign, September 8-12.
- CAMERON, J.W. 1947. Chemic - genetic bases for the reserve carbohydrates in maize endosperm. *Genetics*, 32: 459-85.
- CHITTENDEN, R.H. & OSBORNE, T.B. 1891. A study of the proteins of the corn on maize kernel. *Am. Chem. J.*, 13: 453-529.
- CHRISTIANSON, D.D.; NIELSEN, H.C.; KHOO, V.; WOLF, M.J. & WALL, J.S. 1969. Isolation and chemical composition of protein bodies and matrix proteins in corn endosperm. *Cereal Chem.*, 46: 372-6.
- CREECH, R.G. 1965. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. *Genetics*, 52: 1175-86.
- CREECH, R.G. 1968. Carbohydrate synthesis in maize. *Adv. Agron.*, 20: 275-322.
- CREECH, R.G. & MC ARDLE, F.J. 1966. Gene interaction for quantitative changes in carbohydrates in maize kernels.,

Crop. Sci., 6: 192-4.

CROMWELL, G.L.; PICKETT, R.A. & BEESON, W.M. 1967a. Nutri-
tional value of Opaque-2 corn for swine. *J. Anim. Sci.*
26: 1325.

CROMWELL, G.L.; ROGLER, J.C.; FEATHERSTON, W.R. & PICKETT, R.
A. 1967b. Nutritional value of Opaque-2 corn for the
chick. *Poult. Sci.*, 56: 705.

CROMWELL, G.L.; PICKETT, R.A.; CLINE, T.R. & BEESON, W. M.
1969. Nitrogen balance and growth studies of pigs fed
Opaque-2 and Normal corn. *J. Anim. Sci.*, 28: 478.

DALBY, A. & TSAI, C.Y. 1975. Comparison of lysine and
zein and nonzein protein contents in immature and mature
maize endosperm mutants. *Crop. Science*, 15: 513-5.

DAVIS, G.R.F. 1972. Application of insect Nutrition in solv-
ing general Nutrition problems. In RODRIGUES, J.G. ed.
Insect and Mite Nutrition. Amsterdam, North-Hol. p. 33-99.

DE CARO, C.M.; SILVA, R.M.M.; MEDINA, A.M. & DA SILVA, W.J.
1976. O uso de Drosophila melanogaster na identificação
de mutantes de endosperma de milho. *Anais da XXVII Reu-
nião Anual da Soc. Bras. Prog, Ciênc.*, p. 278.

DREWS, J.E.; MOODY, N.W.; HAYS, V.W.; SPERR, V.C. & EWAN,

- R. C. 1969. Nutritional value of Opaque-2 corn for young chicks and pigs. *J. Nutr.*, 97: 537.
- DUVICK, D.N. 1961. Protein granules of maize endosperm cells. *Cereal Chem.*, 38: 374.
- DVONCH, W.; KRAMER, H.H. & WHISTLER, R.L. 1951. Polyssaccharides of high corn. *Cereal Chem.*, 28: 270-80.
- EARLE, F.R.; CURTIS, J.J. & HUBBARD, J.E. 1946. Composition of the component parts of the corn kernel. *Cereal Chem.* 23: 504-11.
- EARLEY, E.B. 1952. Percentage of carbohydrates in kernels of station reid yellow dent corn at several stages of development. *Pl. Physiol.*, 27: 184-90.
- FALK, D.R. & NASH, D. 1972. The search for auxotrophic mutants in Drosophila melanogaster. In RODRIGUES, J. G. ed. Insect and Mite Nutrition. Amsterdam North-Hol p. 19-31.
- GARWOOD, D.L. & CREECH, R.G. 1972. Kernel phenotypes of Zea mays L. Genotypes possessing one to four mutated genes. *Crop. Sci.*, 12: 119-121.
- GIANAZZA, E.; VIGLIENGHI, V.; RIGHETTI, P.G.; SALAMINI, F. & SOAVE, C. 1977. Amino acid composition of zein molecular

- components. *Phytochem.*, 16: 315-7.
- GOMES, F.P. 1978. Curso de estatística experimental (8 ed.), *Liv. Nobel S.A. Distribuidora.* p. 198-228.
- HARPSTEAD, D.D. 1970. High-lysine corn. *Sci. Am. august*, p. 34-42.
- HINTON, T. 1955. The genetic basis of nutritional requirement in *Drosophila*. *Genetics*, 40: 224-34.
- HOLDER, D.G.; GLOVER, D.V. & SHANNON, J.C. 1974. Interaction of shrunken-2 with five other carbohydrate genes in Zea mays L. endosperm. *Crop. Sci.*, 14: 643-6.
- HOUSE, H.L. & GRAHAM, A.R. 1967. Capric acid blended into foodstuffs for control of an insect pest, Tribolium confusum (Coleoptera: Tenebrionidae). *Can. Ent.*, 99: 994-9.
- HYDE, R.R. 1914. Fertility and sterility in Drosophila. *J. exp. Zool.*, 17: p. 141-71, 173-212, 343-72.
- INGLETT, G.E. 1970. Corn in perspective. In Corn, Culture Processing Produts (INGLETT, G.E. ed.). The AVI Publishing Co. Inc. Westport, Conn.
- JENNINGS, P.H. & MC COMBS, C.L. 1969. Effect of sugary-1 and shrunken-2 loci on kernel carbohydrate contents, phosph

phorylase and branching enzyme activities during maize kernel ontogeny. *Phytochem*, 8: 1357-63.

JIMENES, G.E. 1966. Protein fractionation studies of high lysine corn. In Proc. High Lysine Corn Conf., MERTZ, E.T. & NELSON, O.E., editores. *Corn. Ind. Res. Found.*, Washington, D.C.

JIMENEZ, J.R. 1968. The effect of opaque-2 and floury-2 genes on the production of protein in maize endosperm. *Thèse de PH.D.* Purdue Uni. W. Lafayette, Indiana, U.S.A.

JOHNSON, V.A. & LAY, C.L. 1974. Genetic improvement of plant protein. *J. agric. Fd. Chem.*, 22: 558-66.

KRAMER, H.H. & WHISTLER, R.L. 1949. Quantitative effects of certain genes on the amylose content of endosperm starch. *Agron.*, 41: 409-11.

KRAMER, H.H.; PFAEHER, P.L. & WHISTLER, R.L. 1958. Gene interaction in maize affecting endosperm properties. *Agron. J.*, 50: 207-10.

LANDRY, J. & MOUREAUX, T. 1970. Hétérogénéité des glutélines du grain de Maïs: extraction sélective et composition en acides aminés des trois fractions isolées. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 52: 1021-37.

- LAUGHMAN, J.R. 1953. The effect of sh2 factor on carbohydrate reserves in the mature endosperm of maize. Genetics, 38: 485-99.
- LECLERCQ, J. & DE BAST, D. 1965. Project d'utilisation des larves de Tenebrio molitor pour comparer le valeur nutritive des proteïns. Annls. Nutr. aliment., 19: 19-25.
- LOHDA, M.L.; SRIVASTAVA, K.N.; GUPTA, H.O.; EGGUM, B. O. ; MEHTA, S.L. & SINGH, J. 1976. Nutritive value of normal and Opaque-2 maize. Curr. Sci., 45: 287.
- LOSCHIAVO, S.R.; MC GINNIS, A.J. & METCALFE, D.R. 1969. Nutritive value of barley varieties assessed with the confused flour beetle. Nature, Lond., 224: 88.
- MA, Y. & NELSON, O.E. 1975. Amino acid composition and storage proteins in two new high - lysine mutants in maize. Cereal Chem., 52: 412-9.
- MACKENZIE, J.A. & PARSONS, P.A. 1974. The genetic architecture of resistance to desiccation in populations of Drosophila melanogaster and D. simulans. Aust. J. Biol. Sci. 27: 441-56.
- MARROQUIM, C.R.; CROMWELL, G.L. & HAYS, V.W. 1973. Nutritive value of several varieties of opaque-2 corn and normal corn for growing swine. J. anim., 36(2): 253-7.

- MEDINA, A.M.; DE CARO, C.M. & DA SILVA, W.J. 1979. Discriminação de diferentes mutantes de endosperma de milho por larvas de Drosophila melanogaster. *Anais da XXXI Reunião Anual da Soc. Bras. Prog. Ciênc.*, p. 583.
- MEIGEN, J.W. 1830. Systematische Beschreibung der bekannten europäischem zweis - flügeligen. *Insekten*, 6: 1-401.
- MERTZ, E.T.; BATES, L.S. & NELSON, O.E. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. *Science*, 145: 279-84.
- MERTZ, E.T.; VERON, O.A.; BATES, L.S. & NELSON, O.E. 1965. Growth of rats fed on opaque-2 maize. *Science*, 148: 1741-2.
- MILLER, R.S. 1964. Larval Competition in Drosophila melanogaster and D. simulans. *Ecology*, 45: 132-48.
- MISRA, P.S.; JANBUNATHAN, R.; MERTZ, E.T.; GLOVER, D.V.; BARBOSA, H.M. & MC WHIRTER, K.S. 1972. Endosperm protein synthesis in maize mutants with increased lysine content. *Science*, 176: 1425-6.
- MISRA, P.S.; MERTZ, E.T. & GLOVER, D.V. 1975. Studies on corn proteins. VIII Free amino acid content of opaque-2 double mutants. *Cereal Chem.*, 52: 844-8.

- MOORE, J.A. 1952. Competition between Drosophila melano
gaster and Drosophila simulans. I. Population cage ex
periments. *Evolution*, 6: 407-20.
- MOSSÉ, J. 1966. Alcohol soluble proteins of cereal grains.
Feden. Proc., 25: 1663-9.
- MOSSÉ, J.; BAUDET, J.; LANDRY, J. & MOUREAUX, T. 1966. Étu
de sur les proteines du maiz. II. Comparison entre les
compositions en acide amines et les proportions mutueles
des fractions proteiques de grains normaux et mutants.
Annls. Physiol. vég., 8: 331-4.
- MOUREAUX, T.; BAUDET, J. & MOSSÉ, J. 1966. Fractionnement
des albumines du maïs par chromatographie sur Sephadex.
C.R. Acad. Sc. Paris, 262: 1710-3.
- MURPHY, J.J. & DALBY, A. 1971. Changes in the protein fract
tions of developing normal and opaque-2 maize endosperm .
Cereal Chem., 48: 336-49.
- NELSON, O.E. 1966. Opaque-2, floury-2 and high-lysine
maize. In Proc. High Lysine Corn. Conf., E.T. MERTZ and
O.E. NELSON, eds. *Corn. Ind. Res. Found. Washington, D.*
C.
- NELSON, O.E.; MERTZ, E.T. & BATES, L.S. 1965. Second mut
ant gene affecting amino acid pattern of maize endosperm

- protein. *Science*, 150: 1469-1470.
- NILSSON, J.L.G.; REDALEIN, E.; NILSSON, I.M. & FOLKERS, K. 1968. On the protection against infracton by corn oil. *Acta chem. scand.*, 22: 97-105.
- OSBORNE, T.B. & MENDEL, L.E. 1914. Nutritive properties of the maize kernel. *J. biol. Chem.*, 18: 1-6.
- PARSONS, P.A. 1975. The comparative evolutionary biology of the sibling species Drosophila melanogaster and D. simulans. *Ch. Rev. Biol.*, 50: 151-69.
- PATTERSON, J.T. & STONE, W.S. 1952. Evolution in the genus Drosophila. New York: The Mac. Millan Company. p. 610.
- PAULIS, J.W. & WALL, J.S. 1969. Albumins and globulins in extracts of corn grain parts. *Cereal Chem.*, 46: 262-73.
- RIGHETTI, P.G.; GIANAZZA, E.; VIOTTI, A. & SOAVE, C. 1977. Heterogeneity os storage proteins in maize. *Planta*, 136: 115-23.
- ROBERTSON, F.W. & SANG, JH. 1944. The ecological determi
nants of population growth in a Drosophila culture. *Proc. R. Soc. B.*, 132: 277-91.
- ROBERTSON, F.W. & REEVE, E.C.R. 1952. Studies in quantita

- tive inheritance. I. The effects of selection of wing and thorax length in Drosophila melanogaster. *J. Genet.*, 50: 444-8.
- ROSA, J.G. 1976. Normal, opaque-2 waxy, waxy/opaque-2, sugary-2 and sugary/opaque-2 maize endosperm types in rats and pigs. MS Thesis, Purdue University, Library.
- SANG, J.H. 1954. Differences in the nutritional requirements of Drosophila. *Proc. 9th Int. Congr. Genet.*
- SANG, J.H. 1956. The quantitative requirements of Drosophila melanogaster. *J. Exptl. Biol.*, 33: 45-72.
- SANG, J.H. 1972. The use of mutants in nutritional research. In RODRIGUES J.G. ed. Insect and Mite Nutrition. Amsterdam. North-Hol, p. 9-17.
- SGARBIERI, V.C.; DA SILVA, W.J.; ANTUNES, P.L. & AMAYA, J. F. 1977. Chemical composition and Nutritional Properties of a Sugary-1/Opaque-2 (su 1/02) variety of maize (Zea mays L.). *J. agric. Fd. Chem.*, 25: 1098-101.
- SHANNON, J.C. & CREECH, R.S. 1973. Genetics of storage polyglucosides in Zea mays L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 210: 279-89.
- SHUKLA, T.P. 1975. Cereal proteins: chemistry and food

- applications. *CRC - Critical Rev. Fd. Sci. Nutr.*, 6: 1.
- SILVA, R.M.M.; DE CARO, C.M.; MEDINA, A.M. & DA SILVA, W. J.
1977. Seleção em Drosophila melanogaster para melhor discriminação de mutantes de endosperma de milho. *Anais da XXIX Reunião Anual da Soc. Bras. Prog. Ciênc.*, p. 700.
- SILVA, W.J.; TEIXEIRA, J.P.F.; ARRUDA, P. & LOVATO, M. B.
1978. Nutrimaiz, a tropical sweet maize cultivar of high nutritional value. *Maydica*, 23: 129.
- SILVA, W.J. & ARRUDA, P. 1979. Evidence for the genetic control of lysine catabolism in maize endosperm. *Phytochem.*, 18: 1803-5.
- SODEK, L. & WILSON, C.M. 1970. Incorporation of leucine ^{14}C and lysine - ^{14}C into protein in the developing endosperm of normal and opaque-2 corn. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 140: 29-38.
- SODEK, L. & WILSSON, C.M. 1971. Amino acid composition of proteins isolated from Normal, Opaque-2 and Floury-2 corn endosperm by a modified OSBORNE procedure. *J. agric. Fd. Chem.*, 19: 1144-50.
- SPRAGUE, G.F.; BRIMHALL, B. & HIXON, R.M. 1943. Some effects of the waxy gene in corn on properties of the endosperm starch. *Agron. J.*, 35: 817-22.

- STURTEVANT, A.H. 1919. A new species closely resembling Drosophila melanogaster. *Psyche*, 26: 153-5.
- STURTEVANT, A.H. 1920. Genetics Studies on Drosophila simulans. I. Introduction. Hybrids with Drosophila melanogaster. *Genetics*, 5: 488-500.
- STURTEVANT, A.H. 1929. The genetics of Drosophila simulans. *Carnegie Inst. of Wash. Publ.*, 399. 62 pp.
- TOSELO, G.A. 1975. Avaliação da qualidade e do conteúdo de proteína e carboidratos em mutantes selecionados para endosperma e suas duplas combinações com Opaque-2 em dois estágios de desenvolvimento em Zea mays L. *Informativo del Maiz Lima - Perú*, 1: 45.
- TSAI, C.Y.; SALAMINI, F. & NELSON, O.E. 1970. Enzymes of carbohydrate metabolism in developing endosperm of maize. *Pl. Physiol.*, 46: 299-306.
- TSAI, C.Y. & DALBY, A. 1974. Comparison of the effect of Shrunken-4, Opaque-2, Opaque-7 and Floury-2 genes on the zein content of maize during endosperm development. *Cereal Chem.*, 51: 825.
- VINEYARD, M.L. & BEAR, R.P. 1952. Amylose content. *Maize Genetic Coop News Letter*, 26: 5.

VYSE, E.R. & SANG, J.H. 1971. A purine and pyrimidine requiring mutant of Drosophila melanogaster. *Genet. Res.* 18: 117-21.

WEBER, E.J. 1978. Corn Lipids. *Cereal Chem.*, 55 (5):572-84.

WENTWORTH, E.N. 1913. The segregation of fecundity factors in Drosophila. *J. Genet.*, 3: 113-20.