

# **Hereditariedade e Evolução**

## **Guia de Trabalhos Práticos**

**Cristina Almeida Aguiar**



Departamento de Biologia  
Universidade do Minho 2015



### ***Drosophila melanogaster***

*Drosophila melanogaster*, vulgarmente conhecida por "mosca do vinagre" e frequentemente encontrada em adegas e lugares onde haja fruta em fermentação, é um díptero (duas asas). *Drosophila* significa "amigo da fermentação" e *melanogaster* significa "abdómen negro". Este insecto foi utilizado pela primeira vez por T. H. Morgan e W. Castle em 1900 e tem-se revelado um material conveniente para estudos de genética em virtude de possuir características muito vantajosas, como por exemplo:

- \*ter pequenas dimensões;
- \*para além de pouco dispendiosa, é de fácil obtenção e manutenção no laboratório;
- \*os meios de cultura são relativamente económicos e fáceis de preparar;
- \*tem ciclo de vida curto (a 25°C é produzida uma nova geração em 10-12 dias), associado à produção de uma descendência numerosa;
- \*são facilmente anestesiadas, recuperando rapidamente o estado normal e podem ser reutilizadas sem que tenham ocorrido mudanças fisiológicas assinaláveis;
- \*fácil distinção dos sexos;
- \*existem numerosos mutantes espontâneos e obtêm-se facilmente mutações induzidas;
- \*pequeno número de cromossomas ( $2n = 8$ );
- \*os núcleos das células das glândulas salivares das larvas apresentam cromossomas gigantes - cromossomas politénicos - com volume cerca de mil vezes superior aos cromossomas somáticos, e que podem ser utilizados em estudos citológicos de alterações cromossómicas.

#### **Ciclo de vida**

A fêmea adulta põe os ovos dois dias após da sua emergência. A frequência de postura aumenta até 50 a 75 ovos por dia (num total máximo de 400 a 500 ovos, em 10 dias). O desenvolvimento tem início imediatamente a seguir à fertilização, considerando-se (como na maioria dos insectos) dividido em dois períodos:

##### Período embrionário

Ocorre no interior do **ovo**, desde o momento da fertilização até à eclosão da jovem larva. Neste período, desenvolvem-se as estruturas larvares.

##### Período pós-embrionário

Ocorre após a eclosão do ovo e está dividido em três estados: **larva** (forma que se alimenta activamente, crescendo muito rapidamente, que nunca possui esboços alares e que difere grandemente da forma adulta em termos estruturais); **pupa** (forma imóvel que não se alimenta. É neste estado que os rudimentos alares se desenvolvem, internamente) e **adulto** (forma sexualmente madura com asas desenvolvidas; nesta fase não ocorre qualquer outro tipo de desenvolvimento a não ser o desenvolvimento das células sexuais).



**Cronologia do desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* a 25 °C**

HORAS	Dias	FASES
0	0	Postura do ovo
0 - 22	0 - 1	Embrião
22 - 24	1	Eclosão do ovo (1º estágio larvar)
47	2	1ª muda (2º estágio larvar)
70	3	2ª muda (3º estágio larvar)
118	5	Formação do <i>puparium</i>
122	5	Muda pré-pupal (4º estágio larvar)
130	5 1/2	Emersão da cabeça, asas e patas
167	7	Pigmentação dos olhos na pupa
214	9	Adulto emerge do <i>puparium</i> com as asas dobradas e enroladas
215	9	Adulto (asas distendidas)

**O ovo**

O ovo, de forma ovóide, é revestido exteriormente por um invólucro (córion) do qual se projectam, anteriormente, dois prolongamentos finos com porções terminais achatadas (em forma de colher) e que servem como flutuadores (por forma a impedir que o ovo se afunde e fique submerso no meio). Na região anterior, existe também um pequeno poro (micrópilo) através do qual entra o esperma. Embora possa entrar muito esperma, apenas um espermatozóide fertiliza o núcleo feminino (os restantes são rapidamente absorvidos durante o desenvolvimento dos tecidos embrionários).

**A larva**

A larva é branca, segmentada e vermiforme. A armadura bucal, de cor escura, encontra-se na região anterior, dura e afunilada. A respiração faz-se por traqueias, existindo um par de espiráculos em ambas as extremidades (anterior e posterior) para a entrada do ar. A cutícula dos insectos não se expande, pelo que a larva muda de cutícula periodicamente até alcançar o tamanho adulto. Estes acontecimentos denominam-se mudas e ao período entre duas mudas sucessivas denomina-se *instar*, ocorrendo três *instares* ou estádios larvares e duas mudas. Após a segunda muda (terceiro *instar*), a larva alimenta-se até se encontrar pronta para se tornar pupa. Nesta fase final, a larva sai do meio de cultura para um local relativamente seco e cessa o seu movimento, revirando os seus espiráculos respiratórios anteriores.



### A pupa

Logo após revirar os espiráculos anteriores, o corpo da larva encurta-se e a cutícula torna-se mais dura e pigmentada. Forma-se então uma pré-pupa (sem cabeça e sem asas) sucedendo-se a formação de uma pupa com cabeça, esboços alares e patas. À capa externa da pupa denomina-se *puparium*. As estruturas do adulto que aparecem em primeiro lugar durante o período pupal surgem então como pequenas áreas de tecido dormente, de modo semelhante ao que se passa no estado pré-embriónico. A principal função da pupa é a de permitir o desenvolvimento destes tecidos para as proporções adultas, através da destruição dos tecidos larvares que fornecem o material e energia necessários a esse desenvolvimento.

### O adulto

As características gerais da forma adulta são basicamente as de qualquer insecto, apresentando-se o corpo dividido em cabeça, tórax e abdómen.

A cabeça apresenta-se coberta de pêlos e sedas. Anteriormente, apresenta um par de antenas; lateralmente, dois olhos compostos, vermelhos; na região médio-dorsal três ocelos dispostos em triângulo (triângulo ocelar).

O tórax de qualquer insecto subdivide-se em três segmentos. Em *Drosophila*, os dois primeiros encontram-se parcialmente fundidos formando o dorso, denominando-se o terceiro escutelo. Em cada um dos segmentos do tórax, existe um par de patas ventrais que terminam por garras, sendo cada pata constituída por cinco segmentos: coxa, trocanter, fémur, tibia e tarso com cinco artículos. O tórax é de cor amarela-acastanhada. Dorsalmente, inserem-se no tórax um par de asas finas e transparentes, que se distendem ao longo do abdómen e que apresentam uma nervação simples (seis nervuras longitudinais e duas transversais).

O abdómen é segmentado, apresenta-se em parte pigmentado de negro e está coberto de pêlos, sendo isento de apêndices.



## **Distinção do sexo em *Drosophila melanogaster***

### **Morfologia externa de *Drosophila melanogaster***

*Drosophila melanogaster* é um díptero e, como qualquer insecto, o seu corpo apresenta-se dividido em cabeça, tórax e abdómen.

A cabeça apresenta-se coberta de pêlos e sedas. Apresenta um par de antenas na região anterior e, lateralmente, dois olhos compostos, de cor vermelha.

O tórax, de cor amarela-acastanhada, apresenta três pares de patas que terminam em garras e um par de asas finas e transparentes, que se distendem ao longo do abdómen.

O abdómen é segmentado, apresenta-se em parte pigmentado de negro, está coberto de pêlos e é isento de apêndices.

### **Distinção do sexo em moscas adultas**

#### **- Tamanho do adulto**

A fêmea é geralmente maior que o macho.

#### **- Forma do abdómen**

O abdómen da fêmea é afilado na extremidade enquanto o do macho é arredondado e mais pequeno.

#### **- Pigmentação do abdómen**

Na fêmea as bandas pigmentadas do lado dorsal do abdómen são bem distintas umas das outras. No macho, as últimas bandas pigmentadas estão fundidas. Este critério só é válido em moscas adultas.

#### **- Pente sexual**

Os machos apresentam o chamado pente sexual, uma franja de cerca de dez sedas grossas e pretas, na superfície distal do segmento tarsal basal da pata anterior. Esta estrutura está ausente nas fêmeas. Este é o critério mais seguro para a distinção do sexo em moscas jovens, ou sempre que existam dúvidas quanto ao sexo de uma mosca.



## Mutações e nomenclatura em *Drosophila melanogaster*

O tipo padrão no estudo de *Drosophila melanogaster* é o chamado **tipo selvagem**, que forma a quase totalidade das populações naturais desta espécie. A qualquer variação hereditária deste "tipo padrão" denomina-se **mutante**.

As mutações são frequentes e podem afectar as diferentes partes do corpo do adulto (cor do corpo, tamanho do corpo, cor dos olhos, forma dos olhos, forma da asa, nervuras da asa, morfologia das sedas, etc.). Contudo, nos cerca de mil mutantes que se conhecem, somente um pequeno número apresenta características morfológicas observáveis e que permitem a sua utilização em estudos genéticos.

*Drosophila melanogaster* apresenta quatro pares de cromossomas ( $2n=8$ ) homólogos que se designam por **I, II, III e IV**. O cromossoma **I** corresponde ao cromossoma **X**. Na fêmea há dois cromossomas X e, no macho, um cromossoma X e um cromossoma Y. Este, devido à sua heterocromatina, é praticamente inactivo do ponto de vista genético pelo que não se costuma representar no mapa de cromossomas. Naturalmente, as diversas mutações que se conhecem em *Drosophila melanogaster* terão que se distribuir pelos quatro pares de cromossomas. Como numa célula somática os cromossomas são iguais dois a dois (homólogos), para efeitos de localização (mapa), os diversos mutantes ordenam-se em quatro cromossomas (não homólogos).

### Nomenclatura

A cada mutante é atribuído um nome segundo a sua característica principal. Este nome é geralmente um adjectivo simples, tal como **black**, ou um substantivo, como **Bar**. Por conveniência, a cada mutante corresponde um símbolo. Este, é geralmente uma abreviatura, podendo consistir da letra inicial do nome do mutante (por ex. **e**, de **ebony**), ou deste e uma ou mais letras adicionais do resto do nome (por ex. **ey**, de **eyeless** ou **dp**, de **dumpy**). Os nomes e símbolos dos mutantes com características recessivas tais como **ebony** ou **dumpy**, começam sempre com letra minúscula; os nomes e símbolos dos mutantes com características dominantes começam sempre com letra maiúscula (por ex. **B**, de **Bar**). Contudo, o alelo selvagem de um mutante (dominante ou recessivo) é representado por uma letra adicionada do símbolo (**+**). Assim, o alelo selvagem dominante de **b (black)** é **b<sup>+</sup>**, e o alelo recessivo selvagem de **B (Bar)** é **B<sup>+</sup>**. O símbolo (**+**) é sempre lido como "tipo selvagem".



## Descrição de algumas mutações de *Drosophila melanogaster*

### I. Mutações dos olhos

**ey** (eyeless): Olhos pequenos, normalmente reduzidos a cerca de 1/4 ou 1/2 da área do tipo selvagem, ou por vezes mesmo ausentes.

**v** (vermilion): Olhos de cor vermelhão, mais claros que no tipo selvagem, não translúcidos.

**se** (sepia): Olhos de cor acastanhada, escurecendo para preto com a idade.

**w** (white): Olhos brancos.

**lz** (lozange): Olhos de cor vermelha com reflexos castanhos e brilhantes, mais estreitos que os do tipo selvagem.

**bw** (brown): Olhos de cor vermelha-acastanhada que se tornam púrpura com a idade.

### II. Mutações das sedas e pêlos

**f** (forked): Sedas bifurcadas ou recurvadas, mais curtas que as do tipo selvagem.

**ss** (spineless): Sedas mais curtas que no tipo selvagem.

### III. Mutações da cor do corpo

**y** (yellow): Corpo amarelo.

**e** (ebony): Corpo de cor escura.

### IV. Mutações das asas

**cy** (curly): Asas reviradas para cima.

**ct** (cut): Asas "cortadas" na extremidade (nervuras marginais e margens da asa recortadas).

**m** (miniature): Asas reduzidas em tamanho, ultrapassando ligeiramente o abdómen e mais escuras que as do tipo selvagem.

**vg** (vestigial): Asas muito pequenas e de contorno irregular.

**dp** (dumpy): Asas obliquamente truncadas e reduzidas a 2/3 do comprimento em relação ao tipo selvagem.



## **Técnicas para estudos genéticos com *Drosophila melanogaster***

### **Métodos para cultivar *Drosophila melanogaster***

As larvas e as moscas adultas alimentam-se fundamentalmente de leveduras (que constituem uma fonte importante de proteínas), pelo que podem ser cultivadas e mantidas sobre qualquer meio em fermentação. Ao alimentarem-se, as larvas formam pequenos canais que, por sua vez, proporcionam uma maior superfície para o crescimento de leveduras. A presença destes canais é indício de uma boa cultura.

Um dos problemas técnicos mais graves na cultura de *Drosophila melanogaster* é a contaminação do meio com fungos e ácaros semiparasitas, assim como de outras estirpes de *Drosophila*, pelo que a preparação do meio deverá obedecer a determinadas precauções. As culturas não devem permanecer mais de um mês sem serem repicadas.

### **Preparação do meio**

Existem vários meios de cultura para cultivar *Drosophila melanogaster*. Um dos meios frequentemente utilizados, por ser de fácil preparação e pouco dispendioso, é o Meio de Farinha, cuja preparação é a seguinte: ferver 600 ml de água e adicionar 5g de agar, 25g de levedura de cerveja integral e 60 ml de melaço de cana (ou mel). Deixar ferver novamente e adicionar 70g de sêmola de milho (ou farinha). Ferver novamente até engrossar e adicionar 400 ml de água. Ferver, deixar engrossar e adicionar 60 ml de NIPAGEN (antifúngico).

Uma vez preparado, o meio é colocado em frascos com rolhas de algodão envolvido em gaze (previamente esterilizados) e deixa-se arrefecer. Se a sua utilização não for imediata, deve ser conservado a 4°C.

### **Eterização (anestesia)**

Quando se pretende examinar ou contar as moscas, é possível anestesiá-las com uma pequena dose de éter, sem que estas percam a viabilidade. No entanto, uma dose de éter excessiva pode ser letal. As moscas mortas devem ser colocadas na "morgue" (uma bacia com detergente em água ou com álcool).

As moscas anestesiadas são colocadas sobre um rectângulo de papel branco e são observadas à lupa. A separação (ou mudança de posição) das moscas deve ser feita com um pincel ou com uma pinça de pontas finas. As moscas permanecem anestesiadas durante 5 a 10 minutos. Se for necessário anestesiá-las de novo, deve inverter-se uma caixa de Petri sobre as moscas e colocar uma faixa de papel de filtro embebida em éter no seu interior, sem contudo colocar o éter em contacto directo com as moscas. Se anestesiadas repetidas vezes durante um período de tempo relativamente curto, acabarão por morrer.





### **Isolamento de fêmeas virgens**

Para se efectuarem cruzamentos entre moscas de raças diferentes, é necessário utilizar fêmeas virgens, por forma a assegurar que sejam fecundadas com o esperma do macho que possui o fenótipo pretendido. Para o efeito, devem retirar-se pupas do frasco de cultura de onde se pretende isolar fêmeas virgens, escolhendo pupas de coloração castanha escura. Cada pupa é colocada dentro de um pequeno frasco, sobre uma porção de papel de filtro dobrada e húmida, tapando-se de seguida o frasco com uma rolha de algodão. Este procedimento deve ser repetido para cerca de 20 pupas, seleccionando-se as fêmeas após eclosão das moscas.

### **Cruzamentos**

Quando se pretende cruzar moscas de fenótipos diferentes, à medida que se obtêm as fêmeas virgens, devem transferir-se, individualmente, para um frasco de cultura onde se encontra já o macho do outro fenótipo. As moscas anestesiadas devem ser colocadas horizontalmente, sobre a tira de papel absorvente, ou nas paredes laterais do frasco, mas nunca directamente sobre o meio de cultura. O frasco é novamente colocado na posição vertical quando as moscas recuperarem da anestesia.

Os frascos de cultura devem ser devidamente rotulados, contendo indicação dos fenótipos do macho e da fêmea, o tipo de cruzamento, a data, a identificação do grupo, etc.

Antes de se dar a emergência dos descendentes, aproximadamente 7 a 9 dias após iniciadas as culturas, os progenitores devem ser retirados por forma a não serem confundidos com a descendência.

### **Contagens e registos**

À medida que se vai dando a eclosão das moscas, elas devem ser retiradas, anestesiadas e examinadas segundo os métodos anteriormente descritos. Deverão ser separadas em grupos, de acordo com o sexo e com o fenótipo que exibirem. O número de indivíduos de cada grupo deve ser cuidadosamente registado.



### Cruzamentos com *Drosophila melanogaster*

#### Objectivo

Neste trabalho pretende-se efectuar cruzamentos entre diferentes mutantes de *Drosophila melanogaster* e observar a sua descendência. Após classificação e contagem de cada um dos vários fenótipos obtidos nas gerações F1 e F2, deverá ser formulada uma hipótese que permita explicar os resultados obtidos. Esta hipótese deverá ser comprovada estatisticamente, através da utilização do teste do  $X^2$ .

#### Procedimento

1. Isolar pupas de fenótipo **A** de modo a obter fêmeas virgens.
2. Cruzar essas fêmeas com machos de fenótipo **B**. Pode utilizar-se um simples par; contudo, é preferível utilizar alguns pares de moscas. Estas moscas são designadas por progenitores (**P**).
3. Rotular os frascos indicando o tipo de cruzamento (P: fêmea A x macho B) e a data.
4. Repetir o procedimento anterior, efectuando o cruzamento recíproco.
5. Após 7 - 8 dias, retire os progenitores.
6. A nova geração de moscas, resultantes do cruzamento efectuado, é conhecida como **F<sub>1</sub>**.

a) observe e registe os fenótipos e respectivas frequências durante não mais que 7 a 8 dias após a eclosão das primeiras moscas.

#### Frequências fenotípicas obtidas na geração F1

Fenótipos									
Sexo	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	
Datas contagens									
	<b>Totais</b>								

b) cruze a geração F<sub>1</sub> entre si (F<sub>1</sub> x F<sub>1</sub>). Utilize, novamente, mais do que um par de moscas (P<sub>2</sub>).



7. Repita a linha 3.
8. Após 7 a 8 dias, retire as moscas P2.
9. A nova geração de moscas, resultantes do cruzamento efectuado em 6b), é conhecida por **F<sub>2</sub>**. Uma vez mais, observe e registe os fenótipos, e as respectivas frequências, durante não mais que 7 a 8 dias após a eclosão das primeiras moscas. Após cada contagem, coloque as moscas na "morgue".

**Frequências fenotípicas obtidas na geração F<sub>2</sub>**

	Fenótipos								
	Sexo	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Datas contagens									
<b>Totais</b>									

10. Formule uma explicação para os resultados do cruzamento efectuado, com base nos conhecimentos de hereditariedade que adquiriu.
11. Aplique o método de análise estatística ( $\chi^2$ ) à hipótese que formulou.
12. Verifique se existe acordo; caso contrário, formule uma nova explicação, procedendo como se indica na alínea 10.
13. Uma vez comprovada a hipótese formulada, construa um esquema que ilustre, para cada uma das duas gerações, as conclusões a que chegou.
14. Analise paralelamente os resultados do cruzamento recíproco, efectuado por outro grupo de trabalho. Que conclusões se podem tirar?