

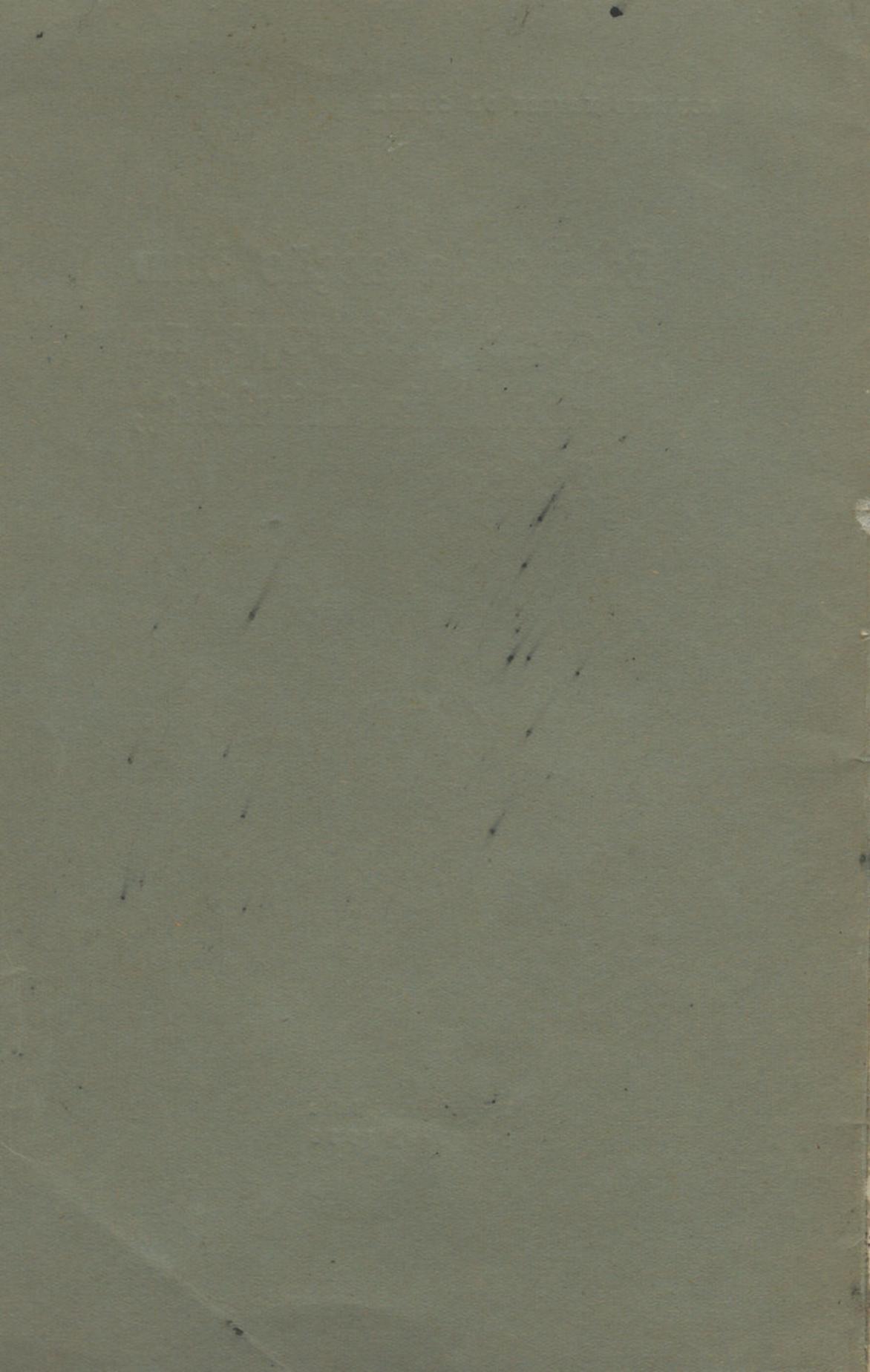
*Como
me. Junta Comita Cogas-Cunha
Paris*

ALBERTO XAVIER DA CUNHA

Estudo da acção dum
gene pleiotropo na
"Ephestia kühniella,"
Zeller



Tipografia da Atlântida
Coimbra, 1935



**Estudo da acção dum gene pleiotropo
na "Ephestia Kühniella" Zeller**

ALBERTO XAVIER DA CUNHA

Assistente de Zoologia na Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra

ESTUDO DA ACÇÃO DUM GENE PLEIOTROPO NA "EPHESTIA KÜHNIELLA" ZELLER

(Trabalho subsidiado pela Junta de Educação Nacional)



UNIVERSIDADE DE COIMBRA
CENTRO DE ESTUDOS
HOMENS DE COIMBRA

RC
MCT
57
CON

COIMBRA

TIPOGRAFIA DA ATLÂNTIDA

1935

SEPARATA

DA

Revista da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra

VOL. V — N.º 2 E 3

*DISSERTAÇÃO PARA DOUTORAMENTO
NA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA.*

Estudo da acção dum gene pleiotropo na «*Ephestia kühniella*» Zeller

INTRODUÇÃO

A Genética, parte da Biologia que estuda os fenómenos e os problemas relativos à hereditariedade e procura determinar as suas leis, deve o seu notável incremento nas últimas três décadas à redescoberta das leis de MENDEL por TSCHERMAK, CORRENS, e DE VRIES, independentemente uns dos outros, em 1900, desasseis anos depois da morte do grande investigador. Nêste período, relativamente curto, a Ciência da Hereditariedade Mendeliana conseguiu lançar luz explicando convenientemente os casos mais complexos e até então inexplicáveis de fenómenos hereditários.

O sistema de sucessivas hipóteses de trabalho, que às leis se sucederam e que factos ganhos pela experiência vinham demonstrar, foi pouco a pouco formando êsse vasto edificio que é hoje o da Ciência da Hereditariedade Mendeliana.

A introdução da experiência neste campo da Biologia foi, aliada à estreita colaboração com os dominios visinhos, como por exemplo a Citologia, uma das causas, talvez a principal, do tão rápido avanço dessa ciência.

Das plantas, nas quais as primeiras observações experimentais se efectuaram, passou-se ao estudo dos fenómenos hereditários nos animais; e a introdução nos laboratórios, por MORGAN, da pequena mosca do vinagre, *Drosophila melanogaster*, o objecto ideal para investigações genéticas, veio marcar uma data na história da Ciência da Hereditariedade.

As modernas teorias da estrutura do material hereditário são teorias corpusculares. Segundo estas teorias o material hereditário está dividido num certo número de unidades autónomas, que nós chamamos *genes*. Ainda segundo essas teorias e demonstrado por investigações citológicas e genéticas, se admite que os genes se encontram localizados nos cromosomas e nêles se dispõem em série linear. Os actuais conhecimentos sobre o modo de transmissão dos genes e suas leis são no presente bastante consideráveis. Os genes são, de facto, realidades e não concepções hipotéticas como o eram as antigas concepções da estrutura do material hereditário e das suas unidades, tais por exemplo as gémulas de DARWIN, os determinantes e bióforos de WEISSMAN e as pangenes de DE VRIES.

Se percorrermos no entanto toda a vasta bibliografia genética e procurarmos obter dados sobre o modo de acção dos genes, notaremos que êste lado da questão, o da conexão entre os genes e os caracteres por êles determinados, poucas vezes foi abordado e algumas vezes apenas acessoriamente. Poucos anos antes da sua morte escrevia BOVERI: « *Über die Vererbung selbst aber, d. h., über die Frage, wie die in der Zygote gegebene Konstellation zu jenem Erbeffekt hinführt, mit dem der Vererbungsforscher arbeitet, darüber erfahren wir nichts; denn darüber wissen wir eben, trotz aller exakten Vererbungslehre, so gut wie nichts* ». Hoje, volvidos alguns anos, os nossos conhecimentos não foram ainda muito mais longe.

As unidades que compunham o material hereditário nas teorias do período pre-mendeliano, a que acima nos referimos, eram geralmente consideradas como representantes ou gérmenes de órgãos definitivos ou de partes dêsses órgãos ou apenas de células ou partes das mesmas. Estas ideias foram, a principio transmitidas à concepção dos genes que eram também, por alguns, considerados como sendo gérmenes de órgãos ou partes de órgãos.

A descoberta de caracteres poligéneos, especialmente do fenómeno da polimeria (NILSSON-EHLE), tornou necessário reconhecer que a maior parte dos caracteres não são determinados por um único gene, mas por alguns ou muitos genes. Conhecem-se por outro lado genes que actuam em caracteres de diferentes partes do corpo, sem relação funcional dumas com as outras. Tais genes foram denominados *pleiotropos* por PLATE, denominação

esta usada especialmente por autores russos, alemães e escandinavos. Os autores americanos designam-nos também por genes *politopos* ou *polifenos*.

Segundo alguns autores o pleiotropismo dos genes não é um caso particular, mas antes uma regra geral. Para tais autores (MORGAN, JOHANNSEN) o desenvolvimento de uma parte do corpo, de um órgão, não depende de um certo número de genes, mas sim de todos os genes do organismo, do seu genótipo, que actua como um todo.

Podemos agora definir unidade hereditária ou gene, como sendo a causa contida na célula sexual, que produz pela sua presença o aparecimento de um ou mais caracteres num organismo e é transmitida hereditariamente como um todo indissolúvel e autónomo.

Os genes são, para JOHANNSEN, «*zunächst Rechnungseinheiten Ausdrücke von Realitäten unbekannter Natur, aber mit bekannten Wirkungen*». E, dada a impossibilidade do estudo directo dos genes por métodos físicos ou químicos, o seu estudo poderá fazer-se indirectamente pelo estudo dos seus efeitos e do seu modo de acção.

DOBZHANSKY (1924, 1927), investigou os caracteres morfológicos duma série de mutantes da *Drosophila*, e achou que essas mutações apresentavam também, além de outras, diferenças bem caracterizadas no aparelho sexual. Concluiu assim que todos os genes por ele investigados eram pleiotropos. E foi o primeiro a indicar a possibilidade e a utilidade da aplicação dos genes pleiotropos no estudo do mecanismo da acção dos genes, pelo estudo das relações entre as diferentes manifestações fenotípicas que um mesmo gene determina.

PLUNKETT (1926), chegou também a uma imagem da acção dos genes, pela acção de factores genéticos e externos, sobre o grau de manifestação fenotípica dos caracteres determinados por um mesmo gene.

GOLDSCHMIDT (1927), expõe na sua «*Physiologische Theorie der Vererbung*» uma hipótese, de carácter geral, sobre a acção dos genes. Segundo GOLDSCHMIDT, a acção dum gene pode estudar-se por métodos genéticos associados à embriologia, pela análise do fenómeno da chamada dominância, ou pela análise da determinação do sexo. Em ambos os casos há como ponto de

partida, duas espécies de genes e a possibilidade de alternativa da acção duma ou doutra no desenvolvimento.

GOLDSCHMIDT apoia-se principalmente em numerosas experiências suas sobre a determinação do sexo na *Lymantria* e nas experiências de BRIDGES e outros, na *Drosophila*, para chegar à sua concepção geral da natureza e do mecanismo da acção dos genes. Emite a hipótese de que os genes são da natureza de catalisadores e especialmente de autocatalisadores, e que os produtos das reacções por eles catalisadas são análogas às substâncias formativas que constituem o grupo conhecido pelo nome de *hormonas*.

Diz, em conclusão, «dass (zunächst die Geschlechtsgene) Autokatalysatoren sind, die mit einer ihrer Quantität proportionalen Geschwindigkeit eine Reaktion, resp. eine Reaktionskette katalysieren; die Endprodukte der Reaktionskette sind die spezifischen Hormone der geschlechtlichen Determinierung. Dieser Satz soll dann entsprechend abgeändert für sämtliche Gene verallgemeinert werden.»

STURTEVANT (1920 e 1927), observou no estudo de alguns ginandros e mosaicos da *Drosophila* a existência de uma acção entre diferentes partes do corpo ou entre tecidos dum mesmo órgão de constituição genética diferente. Nos ginandros de STURTEVANT os olhos tinham a constituição genética seguinte: um, o gene «*vermilion*», e o outro, o alelo dominante normal. Em tais ginandros pode o olho que contém o gene «*vermilion*» não tomar a côr correspondente devido à presença do seu alelo no outro. Análogamente, nos olhos dos mosaicos, a manifestação do caracter «*bar*» é influenciada pela presença de tecidos que contém o alelo normal de «*bar*».

Mas é DOBZHANSKY (1931) quem nos dá uma análise mais detalhada e com ideias mais concretas sobre a acção entre as partes masculinas e femininas de ginandros da *Drosophila simulans*. Tais ginandros tinham a seguinte constituição: as partes masculinas continham os genes «*yellow*» (côr do corpo: amarela) e «*white*» (olhos brancos em vez de vermelhos; testículos e vasos deferentes incolores em vez de amarelos). As partes femininas eram do tipo selvagem (alelomorfo dominante de «*w*» e «*y*»). Nos ginandros eram incolores os testículos e os vasos deferentes durante os primeiros dias de imago. Com a idade tomavam então a coloração amarela que aparecia primeiro nos indivíduos de olhos vermelhos do que nos de olhos brancos.

Quando um vaso deferente se encontrava em contacto com um ovário, tomava então a coloração mais cedo do que nos indivíduos que só possuíam testículos ou nos quais o vaso deferente se encontrava afastado do ovário. Do mesmo modo se comportava um testículo em contacto com um oviducto. DOBZHANSKY, atribui o aparecimento do pigmento nos testículos e vasos deferentes dos ginandros à influência dos tecidos femininos do tipo selvagem contendo o alelo dominante de «white».

A. WHITING (1934), estudou também na véspera parasita *Habrobracon juglandis* o comportamento da cor dos olhos de alguns mutantes, em mosaicos genéticos, observando factos semelhantes aos observados por STURTEVANT na *Drosophila*. Em olhos mosaicos de «wild-type» e «ivory» não há uma linha nítida de separação dos dois tecidos geneticamente diferentes, mas sim uma transição de preto para «ivory». Nos mosaicos com uma região dum olho «wild-type» e a outra «white» ou «cantaloup», é, pelo contrário, bem nítida a linha de separação que segue exactamente o bordo das facetas. Neste caso parece não haver qualquer acção de «wild» sobre «white» e «cantaloup» que se comportam como autónomos.

WHITING descreve ainda um outro tipo de interacção afectando a cor dos olhos, ainda que os olhos em si não sejam mosaicos, e que ocorre quando as gonadas de um macho ou uma fêmea «wild» heterozigótica para «ivory», são geneticamente «wild-type» enquanto a cabeça é geneticamente «ivory». Os olhos, são em tais indivíduos mais «orange» do que «ivory».

GREB (1934), faz a análise de alguns caracteres genéticos de mosaicos e ginandros ainda de *Habrobracon juglandis* e chega a conclusões concordantes com as de WHITING.

CASPARI (1933), efectuou na *Ephesia kühniella*, a tentativa de estudo da acção dum gene pleiotropo que determina, além de outros caracteres, as cores dos olhos e dos testículos. CASPARI verificou uma correlação positiva entre o grau de intensidade de coloração destes órgãos. Ambos se modificavam, e no mesmo sentido, pela acção de agentes externos e por selecção. Os animais *A* possuem olhos pretos e testículos pigmentados e *a* olhos vermelhos e testículos não ou muito fracamente pigmentados. O gene normal *A* é dominante sobre *a*. As cores dos olhos e dos testículos não se separam nos cruzamentos e CASPARI considera-as determinadas pelo mesmo gene. Efectuou depois transplantações

de testículos de animais *aa* para animais *AA* e observou que os testículos implantados se pigmentavam, não havendo qualquer influência sobre o organismo de *AA*. Testículos de animais *AA* implantados em *aa*, pigmentavam-se normalmente e produziam modificações na intensidade de coloração dos olhos dos animais *aa*. Implantações de testículos *AA* em animais *AA* e de *aa* em *aa*, como testemunhas, mostravam o factor *A*, como causa das modificações de pigmentações dos testículos e olhos dos animais *aa*. CASPARI conclui afirmando que o gene *A* efectua a sua acção por meio de substâncias que lança no líquido circulante.

Foi nosso intuito ao iniciar este trabalho, prosseguir as investigações de CASPARI usando do mesmo objecto, a *Ephestia kühniella* e utilizando o método das operações, método corrente na Fisiologia do desenvolvimento e pela primeira vez utilizado no estudo da acção de genes. De facto, os métodos exclusivamente usados em tais estudos eram métodos genéticos associados à embriologia. A razão disso está nas exíguas dimensões da *Drosophila* e doutros objectos usuais da Genética, não permitindo o emprego dos métodos operatórios.

Escolhemos para o nosso estudo a mutação «olhos vermelhos», gene *a*, que determina além da cor dos olhos outros caracteres, como veremos.

Efectuamos em primeiro logar transplantações de testículos entre larvas da mesma e diferentes idades, pertencendo umas à raça «olhos vermelhos» e outras à raça «selvagem» contendo o alelo *A* normal. Estendemos depois as transplantações aos ovários e a outros tecidos. Assim tentámos esclarecer o mecanismo pelo qual um dado gene, elemento do genotipo, realiza um determinado character ou grupo de caracteres, elementos do fenotipo.

Ao Ex.^{mo} Sr. Prof. Dr. ALFRED KÜHN, Director do Instituto de Zoologia da Universidade de Göttingen, somos devedores de sinceros agradecimentos pela hospitalidade que nos dispensou e pelo interesse com que seguiu e orientou os nossos trabalhos, iniciados no seu Instituto.

Ao Ex.^{mo} Sr. Prof. Dr. J. G. DE BARROS E CUNHA, Director do Museu e Laboratório de Zoologia, nos sentimos reconhecidos e agradecemos todo o auxilio que nos prestou tornando possível a conclusão, em Coimbra, deste trabalho.

Ao Ex.^{mo} Sr. Prof. Dr. EUSÉBIO TAMAGNINI, agradecemos

também o interesse demonstrado pelas nossas investigações e o valioso auxílio da rica Biblioteca do Instituto de Antropologia.

Ao Ex.^{mo} Sr. Dr. ANTERO FREDERICO DE SEABRA, Naturalista do Museu de Zoologia, pela amabilidade com que nos facilitou algum material necessário, nos sentimos igualmente reconhecidos.

E, finalmente, ao Ex.^{mo} Sr. ROGÉRIO NOGUEIRA DE CARVALHO, Conservador do Museu de Zoologia, patenteamos também o nosso reconhecimento pela cooperação e auxílio prestados.

Coimbra, Dezembro de 1934.

CAPÍTULO I

Material e técnica

A traça da farinha, *Ephestia kühniella* ZELLER, tem-se evidenciado nos últimos anos como um objecto próprio para investigações de Genética e Fisiologia do desenvolvimento. Facilidade de cultura, número suficientemente elevado de gerações por ano, grande número de indivíduos em cada geração e dimensões suficientes que permitem a utilização de métodos operatórios, tais são as razões que justificam a sua escolha como objecto de trabalho por KÜHN e sua escola. Grande número de mutações são hoje conhecidas e descritas.

Do material que utilizámos, proveniente das culturas do Instituto de Zoologia de Göttingen, pertence a raça selvagem à linha BK 14 e a raça de olhos vermelhos, à linha R o K IV. Seguimos com pequenas modificações a técnica de cultura de KÜHN usada no seu Instituto.

As culturas efectuem-se em taças de vidro de 11^{cm.} de diâmetro e 4,5^{cm.} de altura, cobertas por um simples disco de vidro. Os animais que se querem utilizar para cultura recolhem-se cuidadosamente com uma pinça de pontas muito flexíveis, ou melhor, com um pequeno tubo de vidro. Frequentemente encontram-se nas culturas alguns animais em cópula que de preferência se podem utilizar na repicagem das culturas. As fêmeas não fecundadas reconhecem-se pela posição de copulação que frequentemente tomam, quer espontaneamente, quer por ligeira agitação. Nessa posição, a extremidade do abdomen curva-se para a parte superior e o ovideponente desenvagina-se. Uma tal fêmea, isolada, pode efectuar a postura de alguns ovos, mas, regra geral, estes não se desenvolvem. Podem, pois, considerar-se as fêmeas em posição de copulação, como não fecundadas. Mais seguro, sempre que se pretendem efectuar cruzamentos, é isolar as pupas

em pequenas taças de vidro onde se colocam sobre um pouco de papel de filtro.

A postura pode efectuar-se directamente sôbre o alimento prèviamente colocado nas taças de cultura ou então sôbre papel de filtro ou uma fina camada de algodão em rama que se coloca no fundo das taças. Sôbre o papel de filtro ou o algodão contendo a postura se lança depois o alimento.

O alimento que empregámos foi exclusivamente farinha de trigo, moída grosseiramente.

Para combater a invasão das culturas pelo ácaro *Tyroglyphus farinae*, que aparece por vezes nas culturas antigas ou demasiado húmidas, e ataca as larvas e os insectos adultos, esterilizavamos prèviamente o trigo por meio duma lavagem com alcool a 70° e, depois de sêco, por aquecimento a 60-70° na estufa, durante 5 a 10 minutos. O trigo assim tratado era depois moído num pequeno moínho de mão, que freqüentemente era lavado com alcool.

Outro perigo de infecção das culturas que assim se atenua, é a produzida por uma *Gregarina*, espécie não determinada, que provoca uma doença das larvas. As larvas atacadas apresentam-se de côr avermelhada e mais escura que a normal e morrem em grande número. No intestino de tais larvas encontram-se, em abundância, gregarinas adultas e na hemolinfa numerosos esporos.

As culturas eram mantidas em estufas à temperatura de 25°. Em Göttingen servimo-nos duma estufa SARTORIUS com aquecimento de gás e regulação automática, e em Coimbra duma estufa ALTMANN com aquecimento de petróleo, regulada por tentativas, sob vigilância freqüente, de modo que em qualquer delas as variações de temperatura não eram superiores a 1° para mais ou para menos e a temperatura podia considerar-se constante de 25°. Nas culturas mantidas a esta temperatura nota-se, por vezes, uma demasiada secura do alimento que as larvas então rejeitam. Para a evitar coloca-se na estufa um copo contendo água. A humidade demasiada do alimento favorece o aparecimento dos ácaros e de bolores.

Em qualquer dos casos faz-se a mudança das larvas para novo alimento.

A velocidade de desenvolvimento da *Ephestia* é em alto grau dependente das condições externas e também de factores inter-

nos. A raça selvagem tem à temperatura de 18° uma duração do desenvolvimento quasi dupla da de 25°. O desenvolvimento desde a postura do ovo até à eclosão do insecto perfeito, efectua-se a 18° em 129 dias e a 25° em 67 dias, em média, supondo é claro, em ambos os casos, condições análogas de alimentação, natureza e humidade do alimento e densidade dos animais nos vasos de cultura. A raça de olhos vermelhos tem uma velocidade de desenvolvimento inferior, em alguns dias, à da raça selvagem.

O número de estados larvares é 5 ou 6 a 18° e quasi exclusivamente 6 a 25°.

CAPÍTULO II

As raças «selvagem» e «olhos vermelhos»

Os genes *A* e *a* determinam além da cor dos olhos, outros caracteres: cor dos testículos, cor das larvas, velocidade do desenvolvimento e vitalidade.

Nas raças «selvagem» os testículos apresentam-se pigmentados como acontece em muitos lepidópteros. A cor dos testículos da *Ephestia* é vermelha escura ou vermelha violácea. As cores, quer dos testículos, quer dos olhos, foram rigorosamente determinadas por comparação com as tabelas de cores de OSTWALD.

As tabelas de cores de OSTWALD, compõem-se de 24 tabelas triangulares (Fig. 1) cuja base apresenta uma série de cinzentos que estabelecem a transição entre o vértice *aa*, branco, e o vértice *pp*, preto. O vértice *pa* é ocupado por uma cor padrão. A linha *pa-aa*, à esquerda, contém as cores claras, misturas da cor e branco, e *pa-pp*, à direita, as escuras, misturas da cor e preto. Todos os outros campos são ocupados por cores resultantes da mistura das três: cor padrão, preto e branco. O número da tabela que exprime a cor padrão e duas letras que exprimem, como coordenadas, a posição da cor procurada no triângulo, e assim a sua riqueza em preto ou branco, são os elementos que servem para bem definir qualquer cor das tabelas.

Todos os campos situados na mesma horizontal, por ex.: *ga-pi* possuem a mesma quantidade de cor padrão, unicamente variam nas quantidades de preto e branco. As cores situadas na mesma vertical, por ex.: *na-gg*, possuem a mesma mistura de preto e branco e portanto o mesmo grau de intensidade de coloração. Tais verticais de igual intensidade vão numeradas de 1 a 15, sendo 1, branco e 15, preto puro.

A pigmentação dos testículos não é uniforme. O pigmento

distribui-se à superfície dos folículos em pequenos grupos e é mais abundante nas linhas de contacto e paredes de separação dos folículos, desenhando-se assim uma série de linhas mais fortemente pigmentadas que convergem num ponto. A determinação da côr fazia-se focando com o binocular pouco nitidamente o

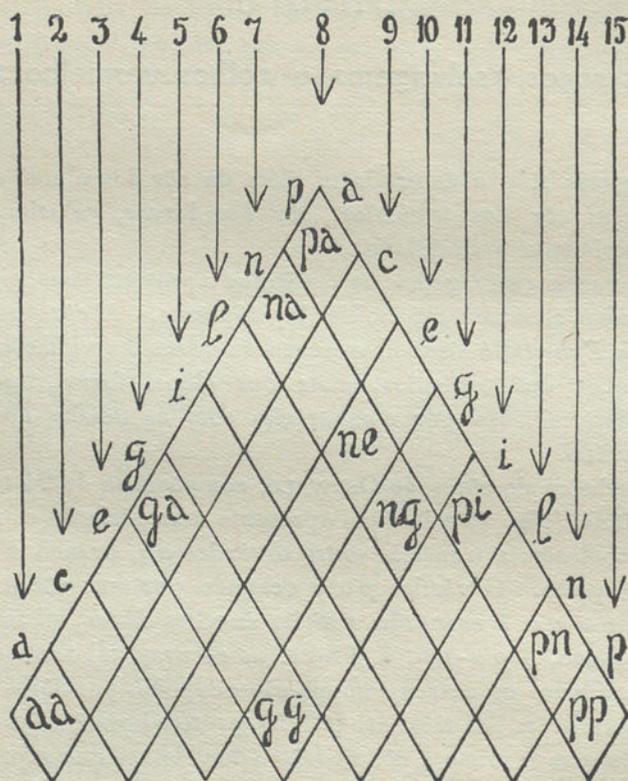


Fig. 1 — Tabela de cõres segundo OSTWALD.

testículo extraído da imago e contido em sôro fisiológico. Deste modo a côr aparecia-nos quasi uniforme. As cõres dos testículos da raça «selvagem» que empregámos (linha BK 14) eram na sua maioria compreendidas nas tabelas 6 e 7 e um menor número na tabela 8 (6, 3.º alaranjado; 7, 1.º vermelho; 8, 2.º vermelho; segundo OSTWALD).

Os testículos dos animais da raça «olhos vermelhos» com que trabalhámos (linha R o K iv), apresentavam-se, quando prove-

nientes de culturas a 25°, quási na totalidade desprovidos de pigmento. Tinham uma cõr amarelada compreendida na tabela 2 (2.º amarelo de OSTWALD) e nos campos mais claros. Em casos raros, apareciam as linhas de separação dos folículos com algum pigmento avermelhado e um pouco mais claro que o das raças «selvagens».

Em animais provenientes de culturas mantidas a 18° os testículos são algo mais pigmentados, sendo no entanto muito mais claros que os das raças «selvagens». Repartindo por sete classes de pigmentação os testículos de ambas as raças, os de BK 14 pertencem às classes 6 e 7 e os de RoK IV às classes de 1 a 5. Os animais da raça BK 14 possuem, pois, testículos muito mais pigmentados que os da raça RoK IV. Porém, a cõr dos olhos das raças «olhos vermelhos» varia dentro de limites bastante largos, desde amarelo claro até castanho escuro (KÜHN e HENKE, 1932), variabilidade que resulta em parte de factores hereditários, parte das condições de cultura.

CASPARI estudou as relações da pigmentação dos olhos e dos testículos em diferentes raças de «olhos vermelhos» a diferentes temperaturas e chegou a uma correlação positiva, de coeficiente elevado ($r = 0,60 \pm 0,03$). A análise de CASPARI mostrou que a cõr dos olhos e a cõr dos testículos variam no mesmo sentido pela acção da temperatura; a 18° eram, tanto os olhos como os testículos, mais pigmentados do que a 25°. Dentro de cada raça há uma correlação nítida entre o grau de pigmentação dos olhos e dos testículos. Os dois caracteres variam no mesmo sentido pela acção de agentes externos e por selecção.

Nos animais da linha RoK IV que utilizei e provenientes exclusivamente de culturas a 25°, os olhos distribuíam-se pelas tabelas 4 e 5 (1.º e 2.º alaranjado), raras vezes pelos campos mais claros da tabela 6 (3.º alaranjado, segundo OSTWALD). Os testículos apresentavam-se a essa temperatura quási sempre desprovidos de pigmentação, de modo que a correlação era impossivel de estabelecer.

Outro caracter influenciado pelos genes *A* e *a* é a cõr das larvas. As larvas da raça BK 14, como as das outras raças selvagens, possuem uma coloração rósea, ou cõr de carne em todos os estados larvares; tomam unicamente no fim do 6.º e último estado larvar, próximo do estado de pupa, uma coloração branca amarelada, por vezes amarelo de cõra. As larvas da

raça Ro K IV como as de outras raças de olhos vermelhos, possuem em todos os estados larvares uma côr branca amarelada, por vezes com tons esverdeados. Na Est. I fig. 2, vão representadas duas larvas, uma de cada raça, no último período larvar. Os testículos da larva AA da raça BK 14, já então pigmentados, reconhecem-se por transparência no 5.º segmento abdominal. Nas larvas aa não é possível a observação dos testículos, inteiramente despigmentados. Não é, pois, possível, ao contrário do que acontece nas larvas AA a distinção imediata dos sexos. A coloração das larvas é devida à coloração da quitina por um pigmento avermelhado, que falta nas larvas aa. No fim do último estado larvar, próximo da metamorfose em pupa, as larvas AA perdem a sua coloração e tomam uma coloração branca amarelada, sendo então impossível a distinção entre os dois tipos de larvas.

Segundo KÜHN e HENKE (1930, 1932) o gene *a*, em estado homozigótico, ocasiona também uma menor vitalidade e uma diminuição da velocidade do desenvolvimento.

Vejamos como se comportam estes caracteres nos cruzamentos das duas raças.

Segundo KÜHN e HENKE (1930, 1932), o caracter «olhos pretos» determinado pelo gene *A* é dominante sobre o caracter «olhos vermelhos». Os indivíduos *Aa* de F_1 apresentam, pois, todos o caracter «olhos pretos». Os testículos de *Aa* são também intensamente pigmentados como os de *AA*. A «pigmentação intensa» dos testículos é portanto dominante sobre «não pigmentação» ou «pigmentação fraca». A côr das larvas *Aa* é também a côr avermelhada das larvas *AA*. A côr das larvas das raças «olhos pretos» é, pois, também dominante sobre a côr das larvas das raças de «olhos vermelhos».

Em F_2 , obtém-se uma disjunção monohíbrida. Os caracteres côr dos olhos, côr dos testículos e côr das larvas, não se separam em F_2 , nem em nenhuma das gerações seguintes, ou nos cruzamentos com os progenitores.

Depois desta análise, tudo leva a admitir que todos estes caracteres sejam determinados por um mesmo gene *A* ou *a*, um gene *pleiotropo*. Possivelmente todos os caracteres determinados por *a* apareceram simultaneamente com a mutação da côr dos olhos. Com efeito, testículos incolores e larvas esbranquiçadas encontram-se em todas as raças de olhos vermelhos, provenientes por selecção dos mesmos animais ocasionalmente mutados.

Na raça de olhos pretos (linha XI) na qual os mutantes apareceram e que se manteve até hoje pura, existem testículos pigmentados e larvas avermelhadas.

Reforça esta hipótese o facto de numa das minhas culturas, a 18º, de *Ephestia elutella* (traça do chocolate) ter aparecido um mutante ♂ de olhos vermelhos muito claros (4 ne, das tabelas de OSTWALD). Tentei seguir esta nova mutação, mas do cruzamento desse macho com uma fêmea selvagem não se obteve descendência. A dissecação do mutante revelou a existência dum testículo completamente destituído de pigmento. A mutação da cor dos testículos, foi, neste caso, necessariamente simultânea, pois os outros indivíduos da mesma cultura confirmaram a existência de testículos normalmente pigmentados. Infelizmente a perda da descendência da nossa mutação impediu a verificação da simultaneidade de mutação da cor das larvas e dos caracteres fisiológicos, vitalidade e velocidade do desenvolvimento e se se tratava duma mutação paralela à do gene *a* da *Ephestia kühniella*.

Do anteriormente exposto se conclui que o gene *a* homozigótico se evidencia em diferentes estados do desenvolvimento. A cor das larvas é determinada ainda durante o desenvolvimento embrionário, pois no momento da eclosão do ovo, as larvas *aa* apresentam já a sua cor característica. A pigmentação dos testículos tem lugar no fim do 5.º ou princípio do 6.º e último período larvar e a pigmentação dos olhos durante o estado de pupa.

CAPÍTULO III

Transplantação de testículos

a) Método

Transplantações de gonada de insectos foram primeiramente efectuadas em Lepidópteros e depois em outros insectos, por MEISENHEIMER, КОРЕЧ e KLATT que, com fins diversos, as efectuaram dum para outro sexo e entre espécies diferentes. A técnica por nós seguida baseia-se na dêstes autores.

As operações eram efectuadas com o auxílio dum microscópio binocular. As larvas a operar foram narcotizadas pelo éter puro para narcose. Outros anestésicos também aconselhados por alguns autores deram resultados inferiores aos do éter. As larvas submetiam-se à acção do éter durante 2 a 3 minutos. Êste tempo era suficiente para, na maioria dos casos, manter o animal completamente imóvel durante a rápida operação. Como material cirúrgico, servimo-nos duma fina tesoura-pinça, segundo HARRISSON, pinças de pontas muito finas e agulhas de dissecação.

Os testículos a implantar eram extraídos das larvas por meio duma incisão dorsal na altura do 5.º segmento abdominal onde estão situadas as gonadas e isolados com a tesoura e pinça. Eram depois conservados, aguardando à implantação, numa solução isotónica com a composição seguinte: Na Cl, 0,70/0; K Cl, 0,020/0; Ca Cl, 0,020/0; e algumas gôtas duma solução saturada de Na HCO₃ por cada 100 c. c. de solução.

A implantação era executada do modo seguinte: A larva a operar colocava-se, depois de narcotizada, na platina do binocular sôbre uma placa de parafina. Efectuava-se então com a tesoura uma pequena incisão em V, no 4.º ou 5.º segmento abdominal; se da incisão saia hemolinfa em quantidade, era esta

absorvida com um fragmento de papel de filtro sustentado na extremidade duma pinça. Para evitar o ferimento do coração e subsequente derramamento de hemolinfa, a incisão efectuava-se sempre fóra da parte média. Com uma agulha era o testículo a implantar retirado da solução isotónica e cuidadosamente introduzido pela incisão. Os bordos da ferida eram convenientemente unidos e, depois de absorvida a hemolinfa que ocasionalmente se derramava durante a operação, cobertos com uma gôta de colódio. Depois de operadas colocavam-se as larvas, isoladas, em pequenas taças de vidro de 3 cm. de diâmetro, com alimento, e mantinham-se na estufa a 25°.

Os animais assim operados permaneciam algumas horas imóveis sob o efeito da narcose e logo que dela saíam, em regra, encasulavam-se. A mortalidade verificava-se em larga escala nos primeiros dias que se seguiam à operação. A perturbação ocasionada pela ferida durante as mudas e na passagem a pupa, provocava também algumas vítimas. Por êste facto eram sempre escolhidos para operar, de preferência, animais no princípio dos estados larvares. Da maioria das larvas que chegavam a pupa, eclodiam insectos perfectos. A mortalidade foi nas nossas experiências bastante elevada. CASPARI obteve nas suas transplantações 20% de insectos que eclodiram de larvas operadas. Nas nossas transplantações de testículos, de 620 larvas operadas, obtivemos 86 insectos o que nos dá uma percentagem de 14%. As causas de tão elevada mortalidade são difíceis de determinar. Infecção da ferida poucas vezes se observava, e nos casos que operámos em condições de relativa asepsia não se observou menor mortalidade. Ferimentos internos de gravidade atingindo o coração ou o intestino, eram evitados pelo nosso modo de operar.

As larvas entre as quais efectuámos as transplantações encontravam-se nos três últimos estados larvares. A maioria porém pertencia aos dois últimos. Em estados anteriores ao 4.º, são impossíveis de operar, dadas as suas exíguas dimensões. Os testículos implantados eram também provenientes de larvas dos mesmos três últimos períodos.

Os testículos da *Ephestia*, têm a meio do último período larvar o aspecto representado na Fig. 2a e 2b. A larva possui dois testículos que se compõem de quatro folículos, acidentalmente de cinco. A pigmentação existe não só nas paredes externas mas ainda nas paredes de separação dos folículos, onde primeiro

aparece, sendo, em geral, mais abundante. A pigmentação dos testículos inicia-se no fim do quinto período larvar ou princípio do sexto e último. Nas larvas R o K IV, de culturas a 25°, raras vezes aparecia pigmento e unicamente no final do último estado larvar. Por esta razão e ainda pelo facto de que a 25° a cor dos olhos é também mais clara, escolhemos para temperatura de cultura 25°. Nos primeiros dias de pupa, os dois testículos larvares unem-se e os oito folículos sofrem uma torção dando assim logar ao testículo único do insecto adulto (Fig. 2 c).

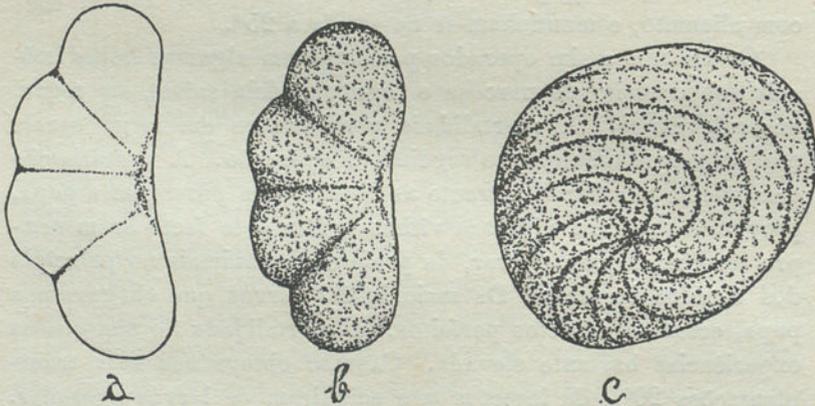


Fig. 2 — a) Testículo não pigmentado de uma larva *aa* no último estado larvar. b) Testículo pigmentado de uma larva *AA* ou *Aa* no início do último estado larvar. c) Testículo de imago *AA* ou *Aa*. $\times 40$.

Assim, as transplantações eram feitas antes que os genes *A* ou *a* produzissem as suas manifestações respeitantes às cores dos olhos e dos testículos.

As cores dos olhos dos insectos obtidos de larvas operadas foram avaliadas por comparação com as tabelas de OSTWALD e sempre, quanto possível, nas mesmas condições de iluminação. Depois disso eram os animais dissecados numa solução de RINGER sob a lupa binocular e o testículo implantado e as gonadas do insecto operado, cuidadosamente preparados; as cores dos testículos, quer do implantado quer do hospedeiro, eram também medidas com o auxílio das tabelas de cores.

MEISENHEIMER e KOPEČ, e para a *Ephestia* CASPARI, descreveram as consequências das operações nos insectos provenientes de larvas operadas. Nas nossas observações chegámos a resul-

tados concordantes. Assim, nos insectos adultos, ainda que eclodindo normalmente, eram sempre mais ou menos visíveis os efeitos das operações. Alguns tinham dificuldade em eclodir e era necessário retirá-los do casulo, com o auxílio duma pinça de pontas muito flexíveis. Possuíam com frequência anomalias nas asas e no abdomen e eram, em regra, de menores dimensões que as borboletas não operadas. As gonadas apresentavam-se normalmente desenvolvidas. O testículo implantado era também de menores dimensões que um testículo normal. Os caracteres da pigmentação serão descritos adiante detalhadamente. Em grande número de casos, os quatro folículos eram bem visíveis e nalguns nitidamente se notava a disposição em espiral das linhas de maior pigmentação, indicando as paredes de separação dos folículos, e mostrando que o testículo sofreu a torsão que normalmente executaria conjuntamente com o outro testículo larvar, para originar o testículo da borboleta adulta. No testículo implantado representado na Fig. 3 b, vê-se isso claramente. Em quasi todos os implantados se regenerava o cálice e por vezes, em certa extensão, o vaso deferente (Fig. 13 a). Algumas vezes os testículos implantados tinham dimensões muito reduzidas, sem dúvida devidas ao facto de alguns dos folículos feridos durante a operação se não desenvolverem. Noutros casos, não foi encontrado nenhum implantado. Todos os autores que se ocuparam de transplantações de testículos em insectos, observaram casos análogos e admitem que o testículo implantado tenha sido totalmente resorvido pelo animal operado. Os testículos implantados eram algumas vezes encontrados crescidos conjuntamente com as gonadas do insecto operado. Se tal acontecia num individuo masculino, os dois testículos distinguíam-se pelas menores dimensões do implantado e pela pigmentação (Fig. 3 a).

b) Transplantações de testículos entre larvas homozigóticas *aa* e *AA*.

Efectuámos quatro grupos de transplantações de testículos entre as larvas homozigóticas *aa* e *AA*: Testículos de larvas *AA* para larvas *aa*, testículos de *aa* para *AA* e como testemunhas, transplantações de *aa* para *aa* e *AA* para *AA*. As transplantações foram feitas entre larvas dos 4.º, 5.º e 6.º estados larvares, e não só entre larvas no mesmo estado larvar mas ainda em estados larvares diferentes. Deste modo eram implan-

tados testículos de larvas dos últimos estados larvares em estados larvares anteriores e inversamente, testículos jovens em estados larvares posteriores. Efectuámos ainda, por último, algumas implantações de testículos de insectos perfeitos em larvas no último estado larvar, às quais nos referiremos separadamente.

Analiseemos os resultados destas experiências, começando por observar as modificações da cõr dos olhos de alguns dos animais

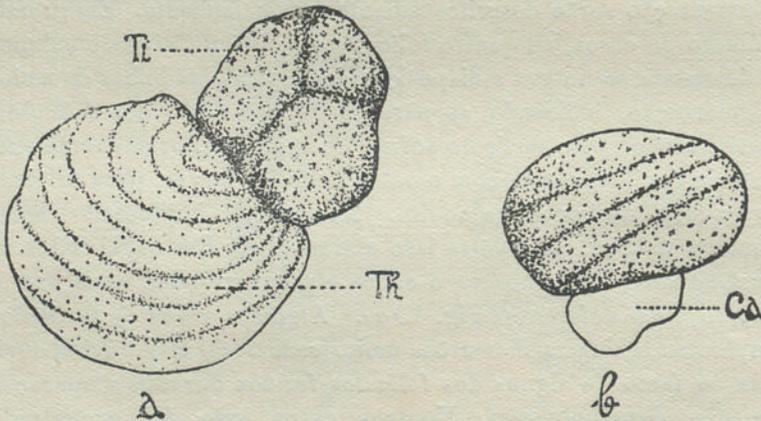


Fig. 3—*a*) Testículo *Aa* implantado crescido conjuntamente com o testículo *aa* do hospedeiro. *Ti*, testículo implantado; *Th*, testículo do hospedeiro.
b) Testículo *Aa* implantado num animal *aa*. *Ca*, cálice regenerado. $\times 40$

operados. As cõres dos olhos dêstes animais foram medidas com o auxílio das tabelas de OSTWALD e distribuidas por três classes: classe 1, olhos vermelhos; classe 2, olhos castanhos, e classe 3, olhos pretos. À classe 2, olhos castanhos, pertencem os olhos cuja pigmentação coincide com os graus 11 a 13 das tabelas 6 e 7 de OSTWALD, e que normalmente nunca aparecem nas culturas de *R o K IV* à temperatura de 25° . Pigmentações mais intensas que *6 pl* e *7 pl* consideram-se pertencentes à classe 3. O quadro 1 representa a distribuição pelas três classes de pigmentação, das cõres dos olhos dos animais operados e dos animais testemunhos. (Estampa 1, 3-5).

A cõr dos olhos dos animais homozigóticos *AA* é sempre da classe 3, e a dos homozigóticos *aa* sempre a da classe 1. A cõr dos olhos em nada se modificou pela implantação, nas

QUADRO I

Pigmentação dos olhos dos animais operados com implantação de testículos *AA* e *aa*, e dos animais testemunhos. *n* número absoluto de animais observados; nas restantes colunas, em percentagens.

Grupos de transplantações	Pigmentação dos olhos			n	
	CLASSE 1 vermelhos	CLASSE 2 castanhos	CLASSE 3 pretos		
Animais <i>AA</i> (Testemunhos)	—	—	100	219	
Transplantações	Testículos <i>AA</i> em larvas <i>AA</i> . . .	—	—	100	12
	Testículos <i>aa</i> em larvas <i>AA</i>	—	—	100	17
	Testículos <i>AA</i> em larvas <i>aa</i> (desenvolvidos)	—	—	100	13
	Testículos <i>AA</i> em larvas <i>aa</i> (resorvidos)	54,6	36,3	9,1	11
	Testículos <i>aa</i> em larvas <i>aa</i>	100	—	—	14
Animais <i>aa</i> (Testemunhos)	100	—	—	127	

larvas, de testículos larvares *aa* ou *AA*. Outro tanto não aconteceu pela implantação de um testículo *AA* em larvas *aa*: a cor dos olhos das borboletas provenientes das larvas assim operadas era modificada, apresentando uma pigmentação mais intensa, pela acção do testículo implantado. Na maioria dos casos a acção era tão intensa que os olhos se podiam considerar pertencentes à classe 3 de pigmentação.

Alguns animais operados apresentavam também olhos com cores que ficavam compreendidas dentro dos limites das classes 2 e 1. A dissecação mostrou porém que todos os indivíduos operados nos quais o testículo implantado se encontrava bem desenvolvido, possuíam olhos pertencentes à classe 3 de pigmentação. Nos indivíduos com olhos cuja pigmentação os incluía na classe 2, encontrava-se o testículo implantado muito mal desenvolvido, reduzido apenas a vestígios ou faltando mesmo nalguns casos. Em nenhum indivíduo operado cujos olhos pertenciam à classe de pigmentação 1, foi encontrado o testículo implantado. A presença de animais com olhos castanhos, classe 2, entre aqueles que apresen-

tavam o testículo implantado reabsorvido, deve atribuir-se também à acção do testículo implantado antes da reabsorção, pois tais animais não aparecem nas culturas de ROK IV a 25°, e a operação só por si não altera a cor dos olhos, como se conclui das transplantações efectuadas como testemunhas, entre larvas *aa* e *aa* que deram sempre como resultado insectos perfeitos com olhos vermelhos, classe 1.

Não observámos qualquer influência da idade do testículo implantado em relação à da larva hospedeira.

Estamos assim, em presença de *uma acção a distância do testículo implantado AA, pigmentando os olhos do animal hospedeiro aa, no sentido do seu fenotipo dominante A.*

Os animais operados eram depois dissecados e cuidadosamente analisados os caracteres das gonadas. Os testículos *AA* implantados em larvas *aa* pigmentavam-se normalmente, segundo o seu fenotipo. A sua acção fazia-se ainda notar nos testículos do hospedeiro: os animais ♂, genotipicamente *aa*, provenientes de larvas operadas, apresentavam também os testículos pigmentados. Distribuindo os testículos por sete classes, segundo a sua pigmentação, vimos que os testículos dos indivíduos *AA* (raça BK 14) pertenciam na sua maior parte às classes 6 e 7. Os testículos dos insectos provenientes das larvas *aa*, operadas com implantação dum testículo *AA*, não eram todavia tão fortemente pigmentados: as classes 3 e 4 eram, com efeito, as de maior frequência. O número de casos não foi suficientemente elevado para que se fizesse a comparação, com valor estatístico. Podemos, contudo, afirmar que *pela implantação de um testículo AA, os testículos a a do animal hospedeiro se pigmentavam, modificando assim o seu fenotipo no sentido do fenotipo de A, sem que no entanto a sua pigmentação atingisse a normal do fenotipo de AA.*

Algumas vezes, como vimos, os testículos implantados cresciam juntamente com os da larva hospedeira (Fig. 3a), mas na maioria dos casos o testículo implantado não ficava em contacto com os testículos da larva operada. No primeiro caso podíamos admitir uma acção de pigmentação por contacto, pela passagem de célula a célula de determinadas substâncias, dos tecidos genotipicamente diferentes dos testículos em contacto. No segundo caso existe uma acção de pigmentação a distância, sobre o testículo *aa*, análogamente ao que acontecia com a pigmentação dos olhos.

Inversamente, a implantação de testículos *aa* em larvas *AA*

conduzia a testículos pigmentados, ainda que não tão intensamente como os de *AA*. Os resultados obtidos eram independentes do sexo da larva hospedeira; os testículos implantados pigmentavam-se igualmente em larvas masculinas e femininas.

Estamos agora em presença da acção inversa, *duma acção do organismo hospedeiro contendo o gene dominante A, sobre o implantado contendo o gene recessivo a*.

Implantações, efectuadas como testemunhas, de testículos *aa* em larvas *aa* conduziram sempre a testículos não pigmentados e excluem qualquer possível influência da operação sobre a pigmentação. Das implantações de testículos *AA* em organismos *AA*, resultava uma, ainda que ligeira, diminuição de pigmentação dos testículos implantados em relação à pigmentação normal dos testículos *AA*. Assim é também de explicar o facto de testículos *AA* em animais *aa* não se pigmentarem até à pigmentação normal de *AA*. A operação seria nestes casos responsável por uma diminuição da pigmentação relativamente à normal.

Vemos pois que das transplantações de testículos entre larvas homozigóticas *aa* e *AA*, em todos os estados larvares operados (4.º, 5.º e 6.º) e independentemente da idade do testículo implantado em relação à da larva hospedeira, podemos concluir as seguintes acções:

- 1.º — *Do testículo implantado, contendo o gene dominante A, sobre a pigmentação dos olhos e testículos do organismo hospedeiro contendo o gene a, recessivo, modificando-a no sentido do seu fenotipo dominante A.*
- 2.º — *Do organismo hospedeiro contendo o gene dominante A, independentemente do seu sexo, sobre a pigmentação do testículo implantado contendo a, modificando-a também no sentido do fenotipo de A.*

c) **Implantação de testículos de insectos perfeitos.**

Estabelecida a acção do gene *A* sobre um organismo contendo o recessivo *a*, por transplantações de testículos dos três últimos estados larvares, uma nova questão se nos oferece: Só os tecidos em via de crescimento e diferenciação são capazes de efectuar tal acção ou também tal efeito pode ser obtido a partir de tecidos diferenciados dum insecto adulto?

Para resolver esta questão implantámos testículos de insectos perfeitos *AA* em larvas *aa* do princípio do sexto estado larvar. A operação oferecia alguma dificuldade em virtude das dimensões dos testículos a implantar e pela menor consistência e espessura da parede dos testículos dos insectos perfeitos, sendo com frequência destruídos durante a operação. Efectuámos 140 de tais implantações. As larvas operadas, apesar de, nos primeiros dias que seguiam à operação, se apresentarem com aspecto normal e não sofrerem mortalidade superior à média obtida nas operações com testículos larvares, acabavam por morrer inesperadamente. Assim, das 140 larvas operadas obtivemos apenas três borboletas, duas das quais com olhos castanhos e uma com olhos vermelhos. A dissecação dos dois primeiros animais, ambos do sexo feminino, revelou a presença de tecidos necróticos junto dos ovários, por certo restos dos testículos implantados. O terceiro animal não apresentava qualquer modificação.

A eclosão dos dois animais com olhos castanhos pode explicar-se também pela acção do gene *A* do testículo implantado antes da reabsorção e necrose, caso análogo ao observado algumas vezes com testículos larvares. É-nos portanto lícito afirmar que *as implantações de testículos de insectos adultos contendo o gene A, em organismos contendo o gene a recessivo, nos revelam a possibilidade da acção daquele gene contido em tecidos adultos.*

A causa de tão elevada mortalidade nestas operações deve ser procurada na degenerescência e subsequente necrose dos tecidos testiculares implantados. A dificuldade da operação, não explica, só por si, tal aumento de mortalidade.

d) Transplantações de testículos heterozigóticos Aa.

Nesta série de transplantações pretendemos observar, pela implantação de testículos, qual o comportamento do gene *A* em estado heterozigótico.

Pela implantação de testículos de larvas *Aa* em larvas homozigóticas *aa* obtivemos borboletas com olhos pretos. (Quadro II).

Em casos, nos quais o testículo implantado se desenvolvia mal, as implantações conduziam a borboletas com olhos castanhos. Os testículos *aa* das larvas hospedeiras pigmentaram-se

QUADRO II

Pigmentação dos olhos dos animais operados com implantação de um testículo *Aa* e dos animais testemunhos.

Grupos de transplantações	Pigmentação dos olhos			n
	CLASSE 1 vermelhos	CLASSE 2 castanhos	CLASSE 3 pretos	
Animais <i>AA</i> (Testemunhos)	—	—	100	176
Transplantações { Testículo <i>Aa</i> em larvas <i>aa</i> {	Test. impl. desenvol- vido	10	90	10
	Test. impl. resorvido	88,8	11,2	9
Animais <i>aa</i> (Testemunhos)	100	—	—	127

também pela implantação do testículo *Aa* (Fig. 3 a). A implantação de testículos *aa* em larvas *Aa* dava como resultado testículos pigmentados e com valores para a pigmentação, não distintos dos obtidos com as implantações em animais *AA*.

Os valores obtidos para a pigmentação dos olhos e dos testículos de animais *aa* pela acção de testículos *Aa*, não são, pois, distintos dos obtidos pela acção dos testículos *AA*. *A acção do gene A em estado heterozigótico, manifestada em transplantações de testículos, não é distinta da acção do mesmo gene em estado homozigótico.*



CAPITULO IV

Transplantações de ovários

a) Transplantações de um ovário *AA* em larvas *aa*.

Estudámos no capítulo anterior as acções entre os testículos implantados e os organismos hospedeiros, de constituição genética diferente. Uma nova questão se punha naturalmente: Serão só as gonadas masculinas capazes de tais acções, ou será também possível, por implantação de gonadas femininas, influenciar dum modo análogo os organismos hospedeiros de constituição genética diferente?

Para resolver esta questão, começámos por efectuar implantações de um ovário de larvas homozigóticas *AA*, em larvas *aa*, experiências paralelas às da primeira série de transplantações de testículos.

O método seguido nas transplantações de ovários, foi, em tudo, análogo ao seguido nas operações com gonadas masculinas. A preparação dos ovários a implantar oferecia alguma dificuldade em virtude das suas pequenas dimensões e da sua coloração que só difficilmente permitia distingui-los dos tecidos adiposos em contacto. Todavia, nalgumas larvas, uma ligeira coloração amarela dos ovários era sufficiente para comodamente os distinguir dos tecidos adiposos em redor. A maioria das transplantações foi efectuada entre larvas no princípio do último estado larvar. Neste estado do desenvolvimento, os ovários, situados dorsalmente no quinto segmento abdominal, apresentam o aspecto representado na Fig. 4; reconhecem-se já, em cada ovário, os quatro ovaríolos que só durante a fase de pupa se desenvolverão e diferenciarão originando o ovário do insecto adulto. Os ovários a implantar eram mantidos, depois de extraídos das larvas, na mesma solução isotónica de que nos servimos nas operações

com gonadas masculinas, e a implantação efectuava-se do mesmo modo. Em virtude das pequenas dimensões do ovário a implantar, os insucessos durante as operações foram em maior número, pois a hemolinfa que brotava da incisão arrastava o pequeno ovário e impedia, em muitos casos, a conclusão da operação.

A mortalidade nos animais assim operados foi algo inferior à dos operados com implantação de testículos. Com efeito, efectuámos um total de 283 implantações de um ovário, e obtivemos 50 insectos perfeitos o que equivale à percentagem de 18⁰/₀, contra 14⁰/₀ de animais obtidos nas transplantações de testículos. As menores dimensões dos ovários, permitindo fazer uma incisão diminuta explicam, talvez, a menor mortalidade. A mortalidade nas nossas operações é, comparada com a das experiências doutros autores, por ex. de KOPĚČ, bastante elevada. A razão está, por um lado, nas pequenas dimensões do nosso objecto (KOPĚČ trabalhou com *Macrolepidopteros*) e por outro, na extrema sensibilidade da *Ephestia* a quaisquer acções mecânicas. O simples contacto duma pinça de pontas muito finas e flexíveis usada para remover os animais das taças de cultura era, muitas vezes, a causa da morte de algumas larvas.

Os insectos obtidos eram, depois de avaliada a pigmentação dos olhos, dissecados sob um microscópio binocular e as gonadas, implantada e do hospedeiro, cuidadosamente observadas.

Vejamos, em primeiro lugar, a morfologia dos ovários da *Ephestia kühniella* (Fig. 5). Os ovários da *Ephestia* são, como os da maioria dos *Lepidópteros*, constituídos, cada um, por quatro ovaríolos, número igual ao de folículos dos testículos. Os ovaríolos são compridos e contêm grande número de ovos; os quatro ovaríolos reúnem-se no cálice, que se continua por um curto oviducto. Os dois oviductos, um de cada ovário, reúnem-se depois num oviducto comum.

Cada ovaríolo (Fig. 6) possui uma parte terminal, a câmara terminal; as quatro câmaras terminais de cada ovário estão ligadas pela membrana conjuntiva que forma a parede dos ovários.

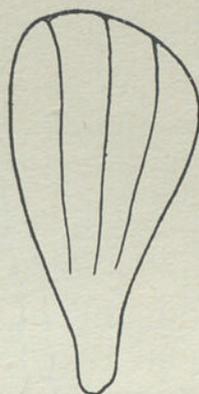


Fig. 4 — Ovário de uma larva no princípio do último estado larvar. $\times 120$.

As restantes porções dos ovaríolos continuam livres até ao cálice. Os ovaríolos são do tipo *politrofo* e compõem-se de uma série de câmaras, constituídas por uma célula germinativa

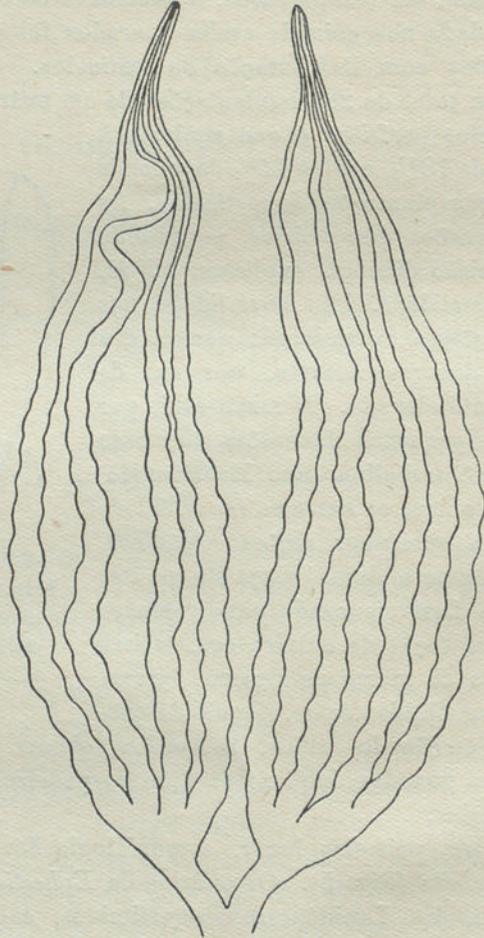


Fig. 5 — Ovários do insecto perfeito. $\times 14$.

e cinco células vitelinas, que servem para a nutrição da célula germinativa em crescimento. Externamente são revestidos por um epitélio folicular. Nas fêmeas recém-eclodidas, cada ovaríolo contém, em média, sete ou oito ovos, completamente desenvolvidos e maduros para a postura.

Os ovários implantados apresentavam-se muito diversamente desenvolvidos. Algumas vezes os ovaríolos desenvolviam-se



FIG. 6 — Ovaríolo dum ovário de imago. $\times 30$.

incompletamente e continham um pequeno número de ovos normalmente desenvolvidos (Fig. 7). Em outras, contudo, os quatro

ovários desenvolviam-se bem, não atingindo todavia o desenvolvimento normal (Fig. 8). Ainda noutros casos, mas mais raros, apenas alguns dos quatro ovários se desenvolviam, possivelmente em resultado de ferimentos do ovário durante a implantação.

Ocasionalmente havia coalescência e crescimento em comum dos ovários implantados, quer com as gonadas masculinas quer com os ovários dos animais hospedeiros. Não verificámos qualquer diferença no desenvolvimento dos ovários implantados, segundo o sexo do hospedeiro.



Fig. 7 — Ovário *AA* implantado, pouco desenvolvido. $\times 20$.

Analisemos agora os efeitos das implantações sobre os animais operados. A implantação de um ovário *AA* em larvas *aa* conduziu a insectos perfeitos com olhos cuja cor foi modificada no sentido do fenotipo de *AA*, denunciando a acção do ovário implantado sobre o organismo hospedeiro. Nos casos em que o ovário implantado se não encontrava, as cores dos olhos mantinham-se dentro dos limites da classe 1 de pigmentação (olhos vermelhos),

como acontecia nas implantações de testículos. Num pequeno número, porém, apesar de não ter sido encontrado o ovário implantado, os olhos possuíam uma pigmentação que os fazia incluir na classe 2 (olhos castanhos). Em todos os casos, nos quais se verificou a presença do implantado, a cor dos olhos modificou-se. Mas ainda mesmo quando o ovário implantado apresentava o máximo de desenvolvimento a cor dos olhos não atingia a cor preta das borboletas *AA*, e que se obtinha nas implantações de testículos.

Em grande número de animais operados, as cores castanhas dos olhos não pertenciam à tabela 6 das cores de OSTWALD, como acontecia nas implantações de testículos, mas sim à tabela 7 (7 *pg*, 7 *pi*, etc.); a intensidade de pigmentação é a mesma e a cor difere apenas no tom que é neste caso castanho arroxeadado.

No quadro III vão reunidos os resultados dos efeitos da implantação de um ovário, sobre a pigmentação dos olhos dos animais *aa*

operados. Os animais que no quadro vêm incluídos na classe de pigmentação 3 (olhos pretos), possuíam a côr 7 *pl* que não é contudo preta, mas que incluímos, pela sua intensa pigmentação, nessa mesma classe juntamente com as côres 14 e 15 das tabelas, como já o fizemos nas implantações de testículos. Foram êstes

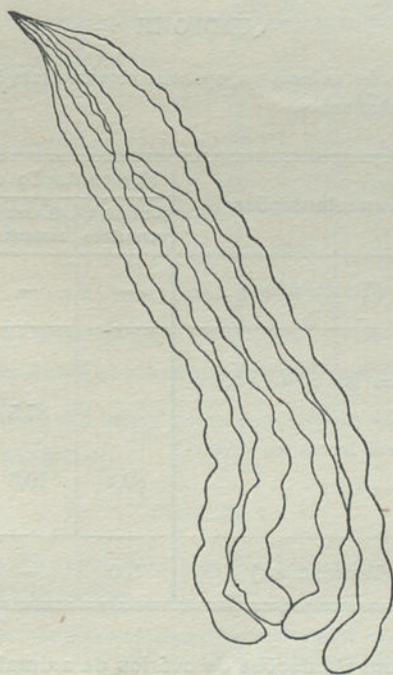


Fig. 8 — Ovário *AA* implantado, com os quatro ovaríolos bem desenvolvidos. $\times 14$.

animais 7 *pl*, os de olhos mais escuros que obtivemos nas implantações de um ovário.

Pela comparação dos efeitos sôbre a pigmentação dos olhos, da implantação dum testículo e dum ovário, se conclui pois que os efeitos da implantação dum testículo, são, apesar das suas menores dimensões, superiores aos efeitos da implantação dum ovário. A implantação simultânea de dois ovários, habilitar-nos-á a discutir e explicar a razão dêste facto.

Os testículos dos animais masculinos *aa*, operados por implantação dum ovário *AA*, pigmentavam-se também. A maior parte

pertencia às classes de pigmentação 3 e 4 que anteriormente estabelecemos. O número de casos obtidos não é suficientemente elevado para estabelecer a diferença, com significação estatística, entre as pigmentações obtidas pelas implantações de testículos e de ovários. A diferença parece ser aqui menos nítida.

QUADRO III

Pigmentação dos olhos dos animais *aa*, operados com implantação de um ovário *AA* e dos animais testemunhos.

Grupos de transplantações	Pigmentação dos olhos			n
	CLASSE 1 vermelhos	CLASSE 2 castanhos	CLASSE 3 pretos	
Animais <i>AA</i> (Testemunhos)	—	—	100	186
Transplantações {	—	87,5	12,5	16
{	89,4	10,6	—	19
{				
Animais <i>aa</i> (Testemunhos)	100	—	—	145

b) Transplantações de ovários de animais *Aa*.

Paralelamente ao que fizemos para as implantações de testículos, efectuámos implantações de um ovário contendo o gene *A* em estado heterozigótico *Aa*. Os resultados obtidos, quer para a pigmentação dos olhos (Quadro IV), quer para a pigmentação dos testículos dos indivíduos masculinos operados, não permitem distinguir a acção do gene *A* em estado heterozigótico da sua acção em estado homozigótico.

c) Transplantações de dois ovários *AA*.

Vimos que os efeitos das implantações dos ovários não eram quantitativamente equivalentes aos das implantações das gonadas masculinas. Com o fim de investigar qual a causa de tal dife-

QUADRO IV

Pigmentação dos olhos dos animais *aa*, operados com implantação de um ovário *Aa* e dos animais testemunhos.

Grupos de transplantações	Pigmentação dos olhos			n	
	CLASSE 1 vermelhos	CLASSE 2 castanhos	CLASSE 3 pretos		
Animais <i>Aa</i> (Testemunhos)	—	—	100	147	
Transplantações {	Ovário <i>Aa</i> em larvas <i>aa</i> (desenvolvido)	—	85,8	14,2	7
	Ovário <i>Aa</i> em larvas <i>aa</i> (resorvido)	87,5	12,5	—	8
Animais <i>aa</i> (Testemunhos)	100	—	—	116	

rença, efectuámos uma série de implantações simultâneas de ovários *AA* em larvas *aa*.

QUADRO V

Pigmentação dos olhos dos animais *aa*, operados com implantação de dois ovários *AA*, e dos animais testemunhos.

Grupos de transplantações	Pigmentação dos olhos			n	
	CLASSE 1 vermelhos	CLASSE 2 castanhos	CLASSE 3 pretos		
Animais <i>AA</i> (Testemunhos)	—	—	100	182	
Transplantações {	Dois ovários <i>AA</i> em larvas <i>aa</i> . (Os dois ovários impl. desenvolvidos)	—	—	100	9
	Dois ovários <i>AA</i> em larvas <i>aa</i> . (Um só ovário impl. desenvolvido) . .	—	100	—	8
	Dois ovários <i>AA</i> em larvas <i>aa</i> . (Os dois ovários impl. resorvidos) . .	90	10	—	10
Animais <i>aa</i> (Testemunhos)	100	—	—	143	

Dêste modo foram operadas 170 larvas no último período larvar, das quais 27 atingiram o estado de imago.

A dissecação dos animais obtidos revelou que, em alguns dêles, os dois ovários implantados se tinham desenvolvido, noutros apenas um, noutros ainda, nenhum dos ovários se desenvolvera. Quási sempre os ovários implantados cresciam conjuntamente com os testículos e ovários do animal hospedeiro. Nas Fig. 9 e 10, estão representados dois casos de ovários implantados coalescentes com os testículos do hospedeiro. O desenvolvimento dos ovários implantados é contudo bem diferente nos

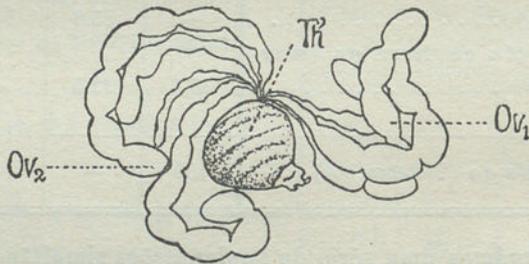


FIG. 9 — Dois ovários *AA* implantados, em coalescência pelas câmaras terminais com o testículo *aa* do hospedeiro. *Ov₁* e *Ov₂*, ovários implantados; *Th*, testículo do hospedeiro. $\times 20$.

dois casos. No caso representado na Fig. 11, os dois ovários implantados cresceram conjuntamente com os ovários do hospedeiro, distinguindo-se bem dêstes pelo seu menor desenvolvimento.

A Fig. 12 mostra-nos dois ovários implantados, bem desenvolvidos e livres na cavidade abdominal do hospedeiro.

Os ovários implantados eram, em regra, de dimensões menores que os do hospedeiro que por sua vez se encontravam algo atrofiados. Uma diferença das dimensões dos implantados, com os sexos dos hospedeiros, observada por MEISENHEIMER e por KOPEČ, não foi por nós encontrada.

No Quadro v vão-reunidos os resultados obtidos pela implantação de dois ovários. Os animais nos quais os dois ovários implantados se desenvolveram, apresentavam, sem excepção, os seus olhos com côres que os faziam incluir na classe 3 de pigmentação e que iam até 6 *pp* e 7 *pp*, isto é, preto normal do fenotipo de *AA*.

Reunimos num segundo grupo, aqueles animais nos quais um só dos ovários implantados se desenvolveu e cujos olhos possuíam pigmentações que estão dentro dos limites da classe 2 e portanto castanhos, tais como os obtidos nas implantações de um só ovário.

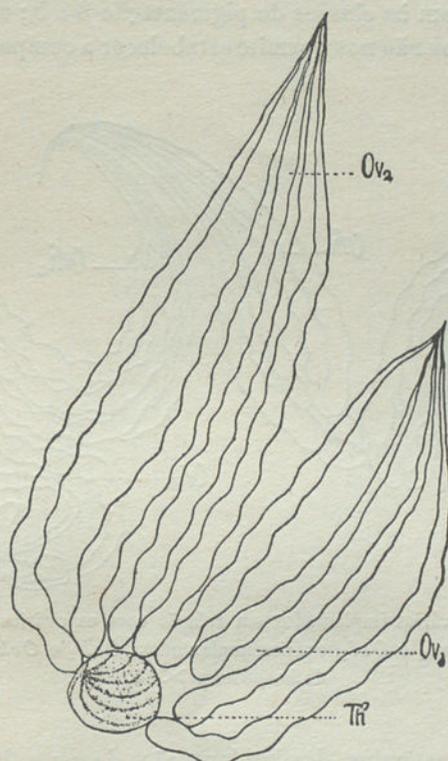


FIG. 10 — Dois ovários *AA* implantados, em relação com o testículo *aa* do hospedeiro. Todos os ovariolos bem desenvolvidos. *Ov₁* e *Ov₂*, ovariolos implantados; *Th*, testículo do hospedeiro. $\times 14$.

No terceiro grupo incluímos os animais, nos quais implantado algum se desenvolveu. Apresentavam, com excepção de um só, olhos pertencendo à classe 3, olhos vermelhos, não modificados. O caso de excepção, olhos castanhos, classe 2, é explicável, como já anteriormente vimos, pela acção dos ovários implantados antes da sua reabsorção.

Verificámos assim que a acção de dois ovários implantados é quantitativamente equivalente à resultante da implantação de um

testículo. Ficámos agora com elementos suficientes para a discussão da diferença de acção de um ovário e de um testículo, que faremos adiante.

A acção sobre os testículos dos animais ♂ hospedeiros verificava-se também. Os testículos pigmentavam-se e na sua maior parte pertenciam às classes de pigmentação 3 a 5; mas o pequeno número de casos não nos permite estabelecer a comparação dos efei-

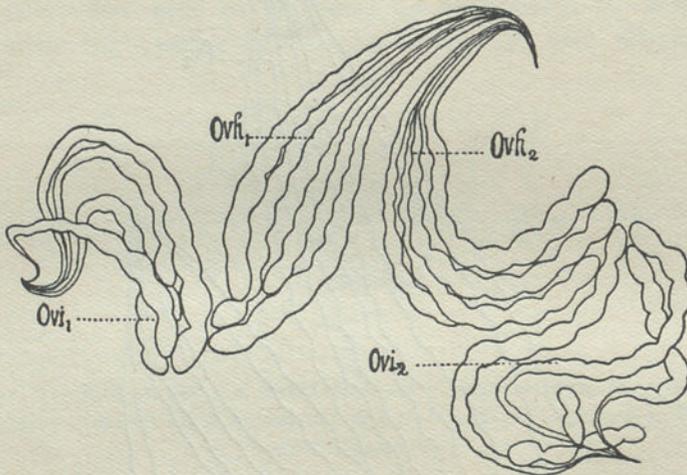


FIG. 11 — Dois ovários implantados em relação com os ovários do animal hospedeiro. *Ovi*₁ e *Ovi*₂, ovários implantados; *Ovh*₁ e *Ovh*₂, ovários do hospedeiro. $\times 14$.

tos, sobre os testículos, das implantações de um e de dois ovários, que aliás resulta claramente pela comparação dos efeitos da modificação da pigmentação dos olhos, de mais fácil e segura avaliação.

d) Descendência dos animais *aa*, com olhos escuros, obtidos por implantações de gonadas.

CASPARI efectuou cruzamentos de dois indivíduos, um ♀ e outro ♂, genotipicamente *aa* e fenotipicamente de olhos pretos, pela implantação de testículos *AA*, com animais *aa* normais. As gonadas dos primeiros, não tendo sido afectadas pela operação produzirão normalmente óvulos *a* e espermatozoides *a*. Com

feito, de ambos os cruzamentos, CASPARI obteve unicamente borboletas com olhos vermelhos.

Tentámos também cruzar alguns dos animais de olhos castanhos, obtidos por implantações de ovários. Os cruzamentos

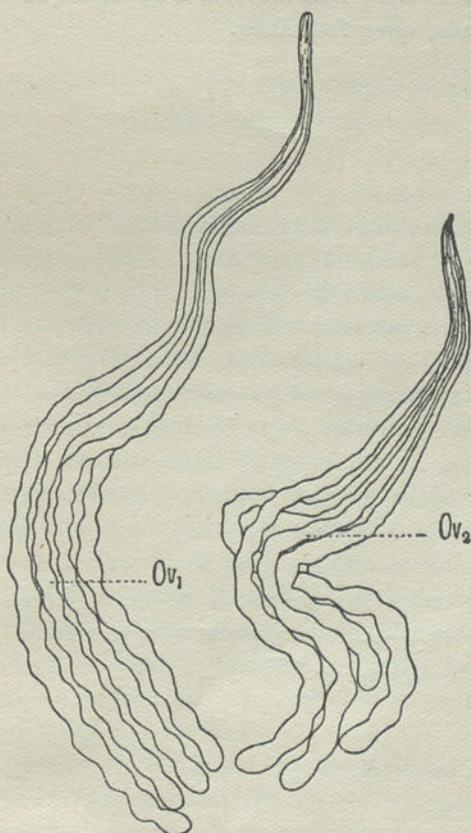


Fig. 12 — Dois ovários implantados Ov_1 e Ov_2 , desigualmente desenvolvidos e livres na cavidade abdominal do hospedeiro. $\times 14$.

tornavam-se difíceis em virtude das operações affectarem algumas vezes as gonadas e diminuírem, em geral, a vitalidade dos animais. Conseguimos num único caso obter 83 borboletas, do cruzamento de uma fêmea genotipicamente aa , operada com implantação de um ovário e cujos olhos possuíam a coloração $7 pl$ (castanho escuro), com um macho aa normal. Todas as

borboletas da descendência obtida, apresentavam os olhos vermelhos e eram portanto genotipicamente *aa*.

Assim se prova que a modificação da cor dos olhos não foi transmitida à descendência e também que os indivíduos de olhos escuros obtidos têm a constituição genotípica *aa* e portanto a modificação é devida, sem dúvida, à implantação das gonadas, quer masculinas, quer femininas.

CAPITULO V

Castração de larvas. Implantação de testículos em larvas castradas.

Demonstrámos nas experiências dos capítulos anteriores a existência de uma acção entre as gonadas implantadas e o organismo hospedeiro, de constituição genética diferente. Essa acção era revelada pela modificação de certos caracteres recessivos, no sentido do fenotipo dominante. Pode perguntar-se se essa acção é própria unicamente das gonadas, ou se qualquer tecido contendo o gene dominante *A* é capaz de acção idêntica e portanto se se trata, com efeito, de uma acção do gene *A*.

É geralmente admitido que nos insectos existe uma grande autonomia celular e que o desenvolvimento de caracteres somáticos especialmente dos caracteres sexuais secundários é independente de qualquer acção hormonal das gonadas. Assim o provaram as transplantações e castrações efectuadas por OUDEMANS, MEISENHEIMER, KOPEČ, HEGNER e REGEN, as experiências de cruzamentos na *Lymantria*, de GOLDSCHMIDT e as castrações embrionais na *Drosophila*, de GEIGY.

Por meio de castrações de larvas da *Ephestia* pretendemos pois, verificar se o aparecimento dos caracteres somáticos determinados pelo gene *A* era ou não dependente das gonadas.

Para concluir se outros tecidos, que não os das gonadas, contendo o gene *A*, seriam capazes de acções análogas às das gonadas, bastaria proceder a implantações de tecidos ou órgãos não sujeitos à metamorfose. Para êsse efeito pareceram-nos convenientes os discos imaginais e os gânglios nervosos. O método era no entanto delicado e difícil, já pela implantação em si, já pela dificuldade de verificação da presença dos tecidos implantados, requerendo quasi sempre o exame histológico. Abandonámos êste método e preferimos o seguinte: Verificado que fôsse

(por castração) que o aparecimento dos caracteres determinados pelo gene *A* era independente das gonadas, efectuávamos implantações de testículos *aa* em larvas *AA* ou *aA* previamente castradas. Assim sujeitava tecidos com o gene recessivo à acção dos tecidos dum organismo, com excepção das gonadas, contendo o gene dominante *A*.

Os trabalhos de castração de insectos de OUDEMANS (1898), MEISENHEIMER (1907, 1909) e KOPEČ (1908, 1910, 1911) sobre lepidópteros e REGEN (1909, 1910) sobre o *Gryllus campestris*, foram efectuados com o fim de demonstrar que o aparecimento e desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários eram independentes das gonadas. Com efeito todos estes autores observaram que das larvas castradas se desenvolviam insectos adultos que diferiam dos normais, apenas na falta de gonadas. A implantação de gonadas em animais de sexo diferente não influa também no desenvolvimento normal dos caracteres sexuais secundários.

São dois os métodos geralmente seguidos para a castração de larvas de insectos: extração das gonadas por meio de uma fina pinça introduzida por uma incisão dorsal no segmento correspondente ou destruição das gonadas *in loco* por cauterização.

Seguimos o primeiro destes métodos e procedemos à castração de larvas masculinas no fim do 5.º e princípio do 6.º estado larvar. A castração de larvas femininas, mostrou-se extremamente difícil, pois as pequenas dimensões dos ovários e a coloração que os não distingue dos tecidos adiposos circunjacentes dificultam a sua localização e extração. Mas, estabelecida que seja a semelhança de acções dos organismo masculinos e femininos sobre os implantados de constituição genética diferente, são-nos suficientemente comprovativas as castrações de larvas masculinas.

A castração de larvas ♂ não oferece dificuldades de maior. Uma incisão transversal na parte média dorsal do quinto segmento do abdómen, permitia a introdução duma pinça de pontas extremamente finas com a ajuda da qual se retiravam os dois testículos, fáceis de reconhecer pela sua pigmentação. O corte do coração ocasionava a perda de grande quantidade de hemolinfa e conseqüentemente uma elevada mortalidade dos animais castrados. Das 115 larvas *AA* castradas, obtivemos apenas 6 insectos adultos e que não apresentavam quaisquer alterações em relação aos insectos normais. Os olhos apresentavam-se

pretos, normalmente pigmentados. A presença ou ausência das gonadas não influi, pois, na pigmentação dos olhos.

Procedemos depois à implantação de testículos *aa* em larvas *AA* castradas. Pela mesma incisão efectuada para a extracção dos testículos se introduzia um testículo *aa*. Assim obtivemos apenas 8 insectos, provenientes das 190 larvas operadas. Os animais obtidos foram cuidadosamente dissecados e depois de verificada a sua completa castração, extraíam-se os testículos implantados e media-se a sua pigmentação. Na Fig. 13, vão

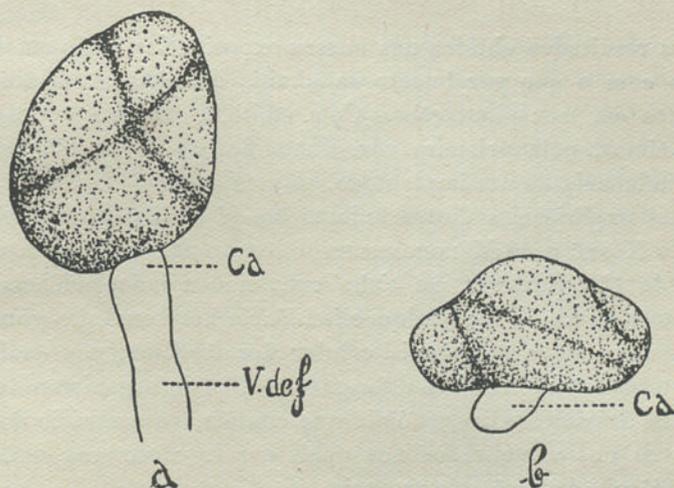


FIG. 13 — Testículos *aa* implantados em larvas *AA* castradas. *Ca* e *V. def.*, cálice e vaso deferente regenerados. $\times 40$.

representados dois dos testículos implantados que obtivemos.

A média das pigmentações dos testículos dos oito animais eclodidos, nesta série de operações, está compreendida entre 4 e 5. A média não é, pois, distinta da obtida por implantação em larvas não castradas.

Concluimos, pois, que a acção do organismo *AA* sobre o testículo *aa* é independente da presença das gonadas e que os efeitos observados com as implantações das gonadas, se podem observar com qualquer tecido contendo o gene dominante *A*.

CAPITULO VI

Discussão

Os resultados obtidos nas nossas experiências estão em desacôrdo com o que geralmente se admitia do comportamento dos insectos em transplantações. Com efeito, CASPARI e agora nós, verificámos, pela primeira vez, a modificação de um hospedeiro pela influência de um implantado.

Das experiências de transplantações já citadas e em especial das de KOPEČ e de MEISENHEIMER e dos cruzamentos na *Lymantria*, de GOLDSCHMIDT, se tinha concluido a independência dos caracteres sexuais, de qualquer influência hormonal das gonadas e era afirmada a autonomia celular dos insectos, nos quais os caracteres fenotípicos das diferentes células do organismo seriam devidas unicamente ao genómio que contém, ao contrário do que acontece nos vertebrados nos quais certos caracteres estão na dependência de acções hormonais.

A existência de acções entre tecidos genéticamente diferentes dum mesmo organismo, foi primeiramente observada por STURTEVANT no estudo de ginandros e mosaicos da *Drosophila*. DOBZHANSKY, estudou mais tarde detalhadamente tais acções, também na *Drosophila* e WHITING observa ainda comportamento análogo de tecidos de mosaicos na vêspera parasita *Habrobracon*.

Nos ginandros estudados por DOBZHANSKY, continham as partes masculinas os genes «yellow» e «white» e as partes femininas eram de tipo selvagem. DOBZHANSKY observou que nos ginandros eram incolores os testículos e os vasos deferentes durante os primeiros dias de imago e que com a idade tomavam então a coloração amarela que aparecia primeiro nos indivíduos de olhos vermelhos do que nos de olhos brancos. Observou mais, que quando um vaso deferente se encontrava em contacto com um ovário tomava a coloração mais cedo do que nos indivíduos

nos quais o vaso deferente se encontrava afastado do ovário. Do mesmo modo se comportava um testículo em contacto com um oviducto. São estes resultados os que mais se aproximam dos obtidos nas transplantações de gonadas na *Ephestia*.

De facto, nos ginandros de DOBZHANSKY, as acções entre tecidos genéticamente diferentes, em contacto, originando o aparecimento da coloração nos testículos e nos vasos deferentes, são comparáveis às acções de pigmentação dos testículos implantados *aa*, em contacto com as gonadas do hospedeiro *AA* ou *Aa*, ou de pigmentação dos testículos do animal hospedeiro *aa*, por implantação de gonadas *AA* ou *Aa*.

E o facto do mais rápido aparecimento da coloração dos testículos e vasos deferentes nos ginandros com olhos vermelhos, faz supor uma acção a distância, dos olhos contendo o alelo dominante, sobre a coloração dos testículos. Tal facto seria comparável ao observado nas nossas experiências, da acção a distância das gonadas implantadas *AA* e *Aa* sobre a pigmentação dos olhos.

DOBZHANSKY, baseado nas suas observações, supõe que o alelo normal de «w» e «y» exerce a sua acção sobre os tecidos que contêm estes genes, por meio de substâncias que são lançadas no líquido circulante.

Pelas transplantações efectuadas na *Ephestia* se demonstrou experimentalmente que a hipótese de DOBZHANSKY era de molde a explicar os factos observados. As acções que estabelecemos são, pois, acções do gene *A*, exercidas por meio de uma substância, a substância *A*, levada pelo líquido circulante aos órgãos onde em determinados momentos do desenvolvimento essas acções se evidenciam. A discussão detalhada das experiências de transplantações, permitir-nos-á analisar mais de perto o modo de acção da substância *A*.

Os resultados das transplantações de testículos, efectuadas entre indivíduos nos três últimos estados larvares e as transplantações de testículos adultos *AA* em animais *aa*, levam-nos a concluir que a substância *A* se produz em todos os estados do desenvolvimento. Atingido que seja determinado estado de desenvolvimento dos órgãos sobre os quais actua o gene *A*, exercer-se-á sobre eles a acção da substância *A*, cujo efeito final será a realização de certos caracteres. Assim o gene *A*, realizava em diferentes momentos do desenvolvimento, diversos caracte-

res : a cõr das larvas, no período embrionário, a coloração dos testículos, nos dois últimos períodos larvares e a pigmentação dos olhos, no período de pupa.

Vimos que nas transplantações de um só ovário *AA* ou *Aa* as pigmentações mais escuras que obtivemos, dos olhos dos animais *aa* hospedeiros, foram *7pl* (castanho escuro), das tabelas de OSTWALD, ainda mesmo nos casos em que o ovário implantado se desenvolvia completamente. Apesar das suas maiores dimensões, um ovário exercia uma acção inferior à de um testículo. As transplantações simultâneas de dois ovários levavam, porém, a animais com olhos pretos, tais como os obtidos nas transplantações de testículos e os dos fenotipos de *AA* e *Aa*. Estas experiências permitem-nos tirar uma conclusão importante: a acção quantitativa da substância *A*. A acção final é, pois, proporcional à quantidade de substância *A* formada.

A diferença de intensidade das acções das gonadas masculinas e femininas, deve explicar-se do seguinte modo: Sendo a substância *A* um produto do gene *A* localizado nos cromosomas, a quantidade de substância *A* formada depende da quantidade de substância nuclear dos tecidos implantados. Uma gonada masculina contém grande número de células sexuais, de pequenas dimensões, e pobres em citoplasma. As gonadas femininas contém menor número de células sexuais e estas de maiores dimensões devido à grande quantidade de vitêlo que possuem. Assim, conterá um testículo apesar das suas menores dimensões, maior quantidade de substância nuclear; produzindo maior quantidade de substância *A* a sua acção será mais intensa que a de um ovário.

A última série de experiências que efectuámos, castrações e implantações de testículos em larvas castradas, demonstrou-nos que as acções observadas não eram devidas a qualquer acção hormonal das gonadas, mas sim a quaisquer tecidos contendo o gene *A*, e que se tratava, portanto, de uma acção deste gene.

Estabelecemos assim experimentalmente a acção do gene pleiotropo *A*, por meio de uma substância, a substância *A*, que actua em quantidades mínimas e possui uma acção quantitativa.

A sua acção evidenciava-se em diferentes momentos do desenvolvimento e em diferentes órgãos, quer no próprio órgão onde era produzida (pigmentação dos testículos *AA* em animais *aa*), quer por difusão de célula a célula (gonadas *AA* ou *Aa* implan-

tadãs, em contacto com testículos *aa*) ou ainda, era levada a todo o organismo pelo líquido circulante (pigmentação dos olhos e dos testículos de animais *aa*, não em contacto com as gonadas implantadas *AA* ou *Aa*).

Nada sabemos sobre a constituição química da substância *A* e da natureza das suas acções bioquímicas. Conhecemos apenas algumas das suas propriedades e os seus efeitos. Pelo seu modo de acção aproxima-se do grupo de activadores orgânicos das hormonas. Tomando esta designação num sentido lato, chamaremos à substância *A*, produto do gene *A*, uma hormona do desenvolvimento. O desconhecimento da sua constituição química e da natureza das suas acções bioquímicas não invalida a nossa afirmação. Toda a investigação dos activadores orgânicos, hormonas e vitaminas, se efectuou a princípio sem que se conhecesse a sua composição química, como ainda hoje se conhece muito pouco sobre a constituição química das enzimas. No entanto o seu estudo e classificação baseou-se sobre os efeitos das suas acções bioquímicas, de natureza íntima mal conhecida.

Á Biologia competirá, pois, a investigação dos efeitos das acções bioquímicas das substâncias análogas às hormonas, por meio das quais os genes efectuem as suas acções. Á Química, especialmente à Bioquímica, competirá, em estreita colaboração com a Biologia, a investigação da composição química e natureza íntima das acções bioquímicas dessas substâncias, cujos efeitos apenas nos são conhecidos.

Sumário e conclusões

- I — Efectuámos transplantações de gonadas entre duas raças da *Ephestia kühniella*, com o fim do estudo do mecanismo da acção de um gene pleiotropo.
- II — O gene pleiotropo em questão evidencia-se em diferentes fases do desenvolvimento, determinando a côr dos olhos, a pigmentação dos testículos, a côr das larvas e modificando caracteres fisiológicos, tais como: vitalidade e velocidade do desenvolvimento. Os animais *AA* possuem olhos pretos e testículos intensamente pigmentados, *aa*, olhos vermelhos e testículos não ou fracamente pigmentados; as larvas *AA* possuem uma côr avermelhada, côr de carne, e *aa*, uma côr branca amarelada. Os animais *aa* têm menor vitalidade e menor velocidade de desenvolvimento. O gene *A* é dominante sôbre *a*.
- III — As transplantações de testículos entre larvas homozigóticas *aa* e *AA*, em todos os estados larvares e independentemente da idade do testículo implantado em relação à da larva operada, levaram aos seguintes resultados:
- 1) As transplantações de testículos *AA* em animais *aa*, conduziam a insectos perfeitos com olhos pretos. Os testículos implantados pigmentavam-se segundo o seu genotipo, não atingindo contudo a pigmentação normal. Os testículos do animal hospedeiro pigmentavam-se também sem atingir a pigmentação de um testículo *AA*.
 - 2) As transplantações de testículos *aa* em animais *AA*, conduziam a testículos *aa* pigmentados, ainda que não tão intensamente como os de *AA*. Os resultados obtidos são independentes do sexo da larva hospedeira.

3) As transplantações de testículos aa , em larvas aa , conduziram sempre a testículos não pigmentados e a animais com olhos vermelhos.

4) As transplantações de testículos AA em animais AA , deram como resultados, uma diminuição, ainda que ligeira, da pigmentação dos testículos implantados e uma pigmentação normal dos olhos e dos testículos do animal operado.

IV — As transplantações de testículos AA de insectos perfeitos, em larvas aa , deram lugar, em dois dos três animais eclodidos (de 140 larvas operadas), ao aparecimento de olhos castanhos.

V — As transplantações de testículos Aa deram resultados idênticos aos dos testículos AA .

1) Os testículos Aa , implantados em animais aa , conduziam a insectos com olhos pretos e testículos pigmentados.

2) Os testículos aa pigmentavam-se pela implantação em larvas Aa .

VI — Por transplantações de um ovário AA , em larvas aa , obtivemos também uma modificação da cor dos olhos dos animais operados. As cores obtidas iam até castanho escuro e em caso algum se chegou à cor preta normal dos animais AA .

VII — As transplantações de ovários Aa deram resultados idênticos aos obtidos com ovários AA .

VIII — As transplantações simultâneas de dois ovários AA , em larvas aa , levaram ao aparecimento de animais com olhos pretos, nos casos em que os dois ovários implantados se desenvolviam. Se apenas um dos ovários se desenvolvia, os animais apresentavam então os olhos castanhos.

IX — A descendência do cruzamento de um animal aa , de olhos castanhos pela implantação de um ovário AA , com um animal aa , normal, possuía os olhos vermelhos.

- X — Os animais *AA*, castrados nos últimos períodos larvares, não apresentavam qualquer modificação. Os olhos de tais animais eram pretos.
- XI — A transplantação de testículos *aa*, em larvas *AA*, castradas, deu lugar à pigmentação dos testículos transplantados.
- XII — Da discussão dos resultados podemos concluir que o gene *A* efectua as suas acções por meio duma substância, a *substância A*, lançada no líquido circulante. A substância *A* actua em quantidades mínimas e os seus efeitos são proporcionais às quantidades de substância produzidas. Pelo seu modo de acção, a substância *A* deve aproximar-se das substâncias do grupo das hormonas.

Résumé et conclusions

- I — Nous avons effectué des transplantations de gonades entre deux races de *Ephestia kühniella*, dans le but de l'étude du mécanisme de l'action d'un gène pléiotrope.
- II — Le gène pléiotrope en question se fait remarquer par différentes phases du développement, en déterminant la couleur des yeux, la pigmentation des testicules, la couleur des larves et en modifiant des caractères physiologiques, tels que: vitalité et rapidité du développement. Des animaux *AA* possèdent des yeux noirs et des testicules intensément pigmentés, *aa* des yeux rouges et des testicules non ou faiblement pigmentés; des larves *AA* ont une couleur rougeâtre, couleur chair, et *aa* une couleur blanche jaunâtre. Des animaux *aa* ont une vitalité moindre, et une moindre rapidité de développement. Le gène *A* est dominant sur *a*.
- III — Les transplantations de testicules entre larves homozygotiques *aa* et *AA*, dans tous les états larvaires opérés et indépendamment de l'âge du testicule implanté en relation à celui de la larve opérée ont conduit aux résultats suivants:
- 1) Les transplantations de testicules *AA* en des animaux *aa*, conduisaient à des insectes parfaits aux yeux noirs. Les testicules implantés se pigmентаient selon leur génotype sans toutefois obtenir la pigmentation normale. Les testicules de l'animal opéré se pigmентаient aussi sans atteindre la pigmentation d'un testicule *AA*.
 - 2) Les transplantations de testicules *aa* en des animaux *AA* ont abouti à des testicules *aa* pigmentés quoique moins intensément que ceux de *AA*. Les résul-

tats obtenus sont indépendants du sexe de la larve opérée.

3) Les transplantations des testicules *aa*, en des larves *aa*, ont toujours donné des testicules non pigmentés et des animaux aux yeux rouges.

4) Les transplantations des testicules *AA*, en des animaux *aa*, ont donné comme résultat une diminution — légère il est vrai — de la pigmentation des testicules implantés et de la pigmentation normale des yeux et des testicules de l'animal opéré.

IV — Les transplantations de testicules *AA* d'insectes parfaits, en des larves *aa*, ont donné lieu, en deux des trois animaux nés (de 140 larves opérées), à l'apparition d'yeux marron.

V — Les transplantations de testicules *Aa* ont donné des résultats identiques à ceux des testicules *AA*.

1) Les testicules *Aa* implantés en des animaux *aa*, ont conduit à des insectes aux yeux noirs et aux testicules pigmentés.

2) Les testicules *aa* se sont pigmentés après l'implantation en des larves *Aa*.

VI — À la suite de la transplantation d'un ovaire *AA* en des larves *aa*, nous avons obtenu aussi une modification de la couleur des yeux des animaux opérés. Les couleurs obtenues se sont modifiées jusqu'à marron et dans aucun cas on ne réussit à avoir la couleur noire normale des animaux *AA*.

VII — Les transplantations des ovaires *Aa* ont donné des résultats identiques à ceux obtenus avec des ovaires *AA*.

VIII — Les transplantations simultanées de deux ovaires *AA* en des larves *aa*, ont fait apparaître, dans les cas où les deux ovaires implantés se sont développés, des animaux aux yeux noirs. Dans les cas où il ne se développait qu'un seul des ovaires, les animaux possédaient alors des yeux marrons.

- IX — La descendance du croisement d'un animal *aa*, aux yeux marron par l'implantation d'un ovaire *AA*, avec un animal *aa*, normal, avait des yeux rouges.
- X — Les animaux *AA*, châtrés dans les dernières périodes de larve, ne présentaient aucune modification. Les yeux de ces insectes étaient noirs.
- XI — La transplantation de testicules *aa* en des larves *AA*, châtrées, a conduit à la pigmentation des testicules implantés.
- XII — De la discussion des résultats nous pouvons conclure que le gène *A*, réalise ses actions au moyen d'une substance, *la substance A*, lancé dans le liquide circulant. La substance *A* agit en des quantités minimales et ses effets sont proportionaux aux quantités de substance produites. Par le mode de son action, la substance *A*, doit s'approcher des substances du groupe des hormones.

BIBLIOGRAFIA

- BAUR (E.), 1930. — «Einführung in die Vererbungslehre», 11.ª edição. — Berlin.
- CASPARI (E.), 1933. — «Über die Wirkung eines pleiotropen Gens bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Zeller». — Roux'Arch. Entw. mech. der Org., CXXX.
- CUNHA (A. X. da), 1935. — «Über die Entwicklung der Geschlechtsdrüsen bei der *Ephestia kühniella* Zeller». — (Em publicação).
- DEMEREK (M.), 1933. — What is a gene? — J. of Genetics, xxiv.
- DOBZHANSKY (Th.), 1924. — «Über den Bau des Geschlechtsapparates einiger Mutanten von *Drosophila melanogaster*». — Zeit. Ind. Ab. Ver., XXXIV.
— 1927. — «Studies on the manifold effect of certain genes in *Drosophila melanogaster*». — Zeit. Ind. Ab. Ver., XLIII.
— 1931. — «Interaction between female and male parts of gynandromorphs of *Drosophila simulans*». — Roux'Arch. Ent. mech. der Org., CXXIII.
- FERWERDA (F. P.), 1929. — «Genetische Studien am Mehlkäfer *Tenebrio molitor*» L. — Genetica, xi.
- GEIGY, 1931. — Action de l'ultra-violet sur le pôle germinal dans l'œuf de *Dr. melanogaster*. — Rev. Suisse de Zool. XXXVIII.
- GIERKE (E. von), 1932. — «Über die Häutungen und die Entwicklungsgeschwindigkeit der Larven der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Zeller». — Roux'Arch. Ent. mech. der Org., CXXVII.
- GOLDSCHMIDT (R.), 1927. — «Physiologische Theorie der Vererbung». — Berlin.
— 1928. — «Einführung in die Vererbungswissenschaft», 5.ª edição — Berlin.
— 1928. — «Gen und Aussencharakter». — Zeit. Ind. Ab. Ver., Supl. Vol. I.
- GOTTSCHESKI (G.), 1934 — «Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* über die Umstimmbarkeit des Phänotypus und des Genotypus durch Temperatureinflüsse». — Zeit. Ind. Ab. Ver., LXVII.
- GREB (R. J.), 1934. — «Quantitative analysis of the modification of some genetic characters in *Habrobracon*». J. of Genetics. XXIX.

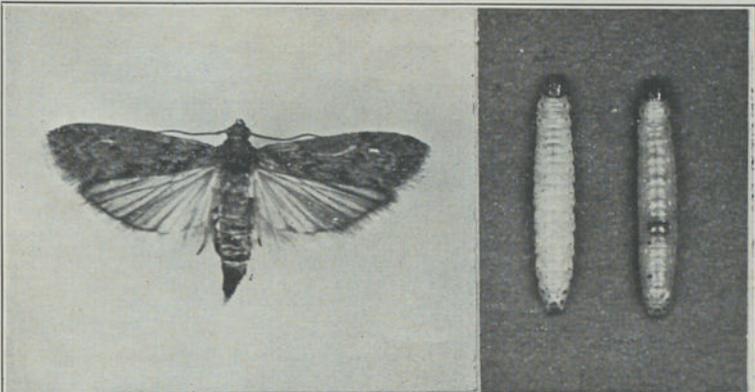
- GUIÉNOT (E.), 1930. — «L'Hérédité». — Paris.
- JOHANNSEN (W.), 1926. — «Elemente der exakten Erblchkeitslehre mit Grundzügen der biologischen Variationsstatistik», 3.ª edição. — Jena.
- KLATT (B.), 1919. — «Keimdrüsentransplantationen beim Schwammspinner». — Zeit. Ind. Ab. Ver., XXII.
- KÖHLER (W.), 1932. — «Die Entwicklung der Flügel bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* mit besonderer Berücksichtigung des Zeichnungsmusters». — Zeit. Morph. und Ökol. der Tiere, XXIV.
- KOPEČ (St.), 1911. — «Untersuchung über Kastration und Transplantation bei Schmetterlingen». — Roux'Arch. Entw. mech. der Org., XXXIII.
- KORSCHOLT (E.), 1931. — «Renegeration und Transplantation», II Vol. Transplantation. — Berlin.
- KÜHN (A.) und HENKE (K.), 1929. — «Genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an der Mehlmotte *Ephestia kühniella*, I-VII». Abh. Ges. Wiss. zu Göttingen, XV, 1.
 — 1932. — «Genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an der Mehlmotte *Ephestia kühniella*, VIII-XII». — Abh. Ges. Wiss. zu Göttingen, XV, 2.
 — 1930. — «Eine Mutation der Augenfarbe und der Entwicklungsgeschwindigkeit bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella*». — Roux. Arc. Ent. mech. der Org., CXXII.
- MEISENHEIMER (J.), 1909. — «Experimentelle Studien Zur Soma- und Geschlechtsdifferenzierung. I. Beitrag. Über den Zusammenhang primärer und sekundärer Geschlechtsmerkmale bei den Schmetterlingen und den übrigen Gliedertieren». Jena.
 — 1910. — «Zur Ovarialtransplantation bei Schmetterlingen». — Zool. Anzeiger, XXXV.
 — 1922. — «Kastration und Gonadentransplantation bei Insekten». Abderhaldens'Handbuch der Biol. Arbeitsmethoden. Abt. IX, Teil 4.
- MORGAN (T. H.), 1926. — «The theory of the gene». — New Haven. Yale University Press.
- OSTWALD (W.), 1922. — «Der Farbkörper und die Farbenfibel». — Leipzig.
- OUDEMANS (J. TH.), 1898. — «Falter aus kastrierten Raupen, wie sie aussehen und wie sie sich benehmen». — Zool. Jahrb. Abt. Syst., XII.
- PLUNKETT (Ch.), 1926. — «The interaction of genetic and environmental factors in development». — J. of exp. Zool., XLVI.

- REGEN (J.), 1909 e 1910. — «Kastration und ihre Folgeerscheinungen bei *Grillus campestris*, I e II». — I. Mitt. Zool. Anzeiger, XXXIV. II Mitt. Zool. Anzeiger, XXXV.
- STURTEVANT (A. H.), 1920. — «The vermilion gene and gynandromorphism». — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., XVII.
- 1927. — «The effect of the bar gene of *Drosophila* in mosaic eyes». — J. of Exp. Zool., XLVI.
- 1932. — «The use of mosaics in the study of the developmental effect of genes». — Proc. Sixth Int. Cong. Gen., I.
- TAMMES (T.), 1934. — «Die Übereinstimmung Zwischen Entwicklungsstadien und Phaenotypen verschiedener Genotypen». — Genetica, XV.
- TIMOFÈEFF-RESSOVSKY (H.), 1931. — «Über phänotypische Manifestierung der polytopen (pleiotropen) Genovariationen «Polyphän» von *Drosophila funebris*. — Naturwissenschaften, XIX.
- 1934. — «Über die Vitalität einiger Genmutationen bei *Drosophila funebris* und ihre abhängigkeit von «genotypischen» und von äusseren Milieu». — Zeit. Ind. Ab. Ver., LXVI.
- WHITING (A. R.), 1934. — «Eye colours in the parasitic wasp *Habrobracon* and their behaviour in multiple recessives and in mosaics». — J. of Genetics, XXIX.
- WHITING (P. W.), 1928. — «The relation between gynandromorphism and mutation in *Habrobracon*». — Amer. Nat. LXII.
- and WHITING (A. R.), 1934. — «A unique fraternity in *Habrobracon*». — J. of Genetics XXIX.



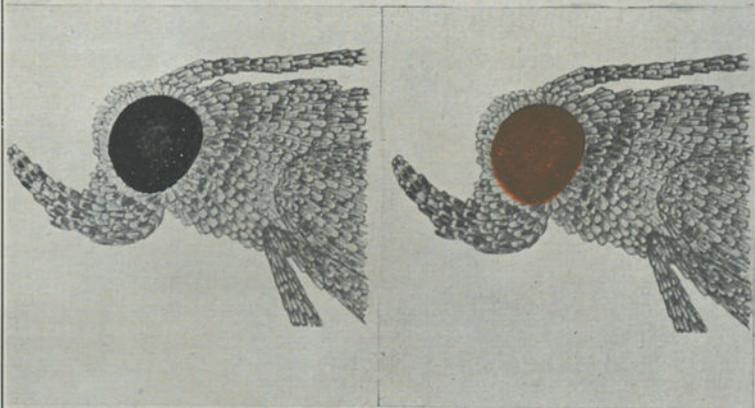
EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA

- Fig. 1 — *Ephestia kühniella* Zeller. $\times 2$
Fig. 2 — Larvas das raças *aa* e *AA*, no último período larvar. $\times 2$
Fig. 3 — Imago da raça *AA*; olhos pretos. $\times 18$
Fig. 4 — Imago da raça *aa*; olhos vermelhos.
Fig. 5 — Imago da raça *aa*, com olhos castanhos obtidos por implantação de um ovário.



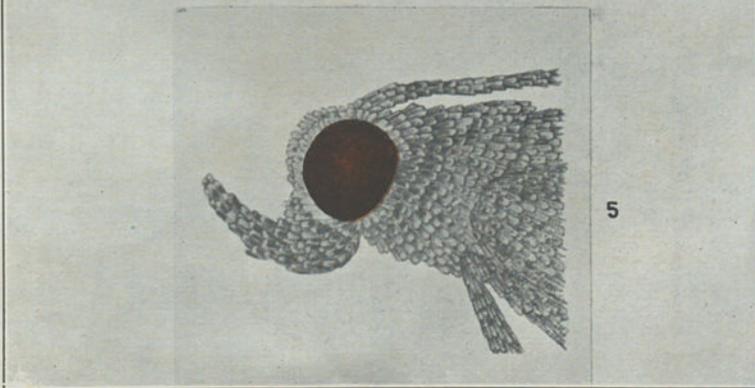
1

2



3

4



5

INDICE

	Págs.
Introdução	7
CAPÍTULO I — Material e técnica	14
CAPÍTULO II — As raças « selvagens » e « olhos vermelhos »	17
CAPÍTULO III — Transplantação de testículos	22
<i>a</i>) Método	22
<i>b</i>) Transplantações de testículos entre larvas homozigóticas <i>aa</i> e <i>AA</i>	25
<i>c</i>) Implantação de testículos de insectos perfeitos	29
<i>d</i>) Transplantações de testículos heterozigóticos <i>Aa</i>	30
CAPÍTULO IV — Transplantações de ovários	32
<i>a</i>) Tansplantações de um ovário <i>AA</i> em larvas <i>aa</i>	32
<i>b</i>) Transplantações de ovários de animais <i>Aa</i>	38
<i>c</i>) Transplantações de dois ovários <i>AA</i>	38
<i>d</i>) Descendência dos animais <i>aa</i> , com olhos escuros obtidos por implantações de gonadas	42
CAPÍTULO V — Castração de larvas. Implantação de testículos em larvas castradas	45
CAPÍTULO VI — Discussão	48
Sumário e conclusões	52
Résumé et conclusions	55
Bibliografia	58



RÓ
MU
LO

CENTRO CIÊNCIA VIVA
UNIVERSIDADE COIMBRA



1329655767

