C E N A

CENA - BIBLIOTECA
Data 12 NOV 1975
Procedência
Preço
Doação CENA - Piracicaba

BC-034

MARCAÇÃO DE OVOS DE *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN) ATRAVÉS DE ESPERMA RADIOATIVO (^{32}P)

F.M. Wiendl
J.M. Pacheco

30 de junho de 1975

BOLETIM CIENTÍFICO

CENA
BIBLIOTECA
N.o 3631

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA
USP-CNEN
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
PIRACICABA-SP
- BRASIL -

ÍNDICE

	Página
RESUMO	01
SUMMARY	02
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	03
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
3. MATERIAIS E MÉTODOS	06
4. DADOS OBTIDOS	08
5. DISCUSSÃO	09
6. CONCLUSÕES	11
7. BIBLIOGRAFIA	12

MARCAÇÃO DE OVOS DE *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN) ATRAVÉS DE ESPERMA RADIOATIVO (^{32}P)

F.M. Wiendl - Professor Adjunto de Entomologia - CENA
J.M. Pacheco - Bolsista - CNEN

R E S U M O

No presente trabalho estudou-se a marcação de ovos da mosca do Mediterrâneo, através da transmissão do radioisótopo ^{32}P pelo esperma.

Utilizaram-se 100 casais recém emergidos, sendo os machos alimentados com uma dieta composta de 5 g de açúcar refinado e 1,66 g de proteína hidrolizada. Esta dieta foi marcada com uma solução de Na_2HPO_4, com o átomo do fósforo marcado com o isótopo ^{32}P.

A dieta apresentava uma atividade calculada em 343,9µCi.

Os cálculos estatísticos indicam com uma margem de segurança de 99% de certeza que as fêmeas botaram ovos marcados até o quinto dia após a cópula, mesmo quando permaneceram com machos não tratados.

Recebido para publicação em 29 de setembro de 1 974.

LABELLING OF EGGS OF *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN) THROUGH RADIOACTIVE SPERM (^{32}P)

S U M M A R Y

The present paper describes the labelling of Med-fly eggs, using the sperm in the transmission of radioisotope ^{32}P. 100 recently hatched couples were used, the males fed on a diet made of 5 g sugar and 1.66 g of hydrolized protein.

This diet was labelled with a solution of Na_2HPO_4 in wich the atom of phosphorus was labelled with ^{32}P isotope.

The diet showed an activity calculated at 343.9 µCi.

Statistical treatment of the data indicated that the eggs became labelled and remained labelled until 5^{th} day after mating, even on eggs laid by female who meted with untreated males.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A marcação de insetos para estudos de ecologia, biologia e fisiologia é há muito conhecida. Porém neste campo foram os radioisótopos que vieram revolucionar a maneira de marcação, possibilitando uma mais perfeita distinção dos insetos marcados, sem causar o mínimo disturbio bio-fisiológico aparente, criando assim novos rumos na investigação entomológica.

O objetivo do presente trabalho é de estudar a possibilidade de transmissão de ^{32}P presente em espermatóforos para os ovos de *Ceratitis capitata*, o que servirá de base para os estudos de aplicabilidade da Técnica do Inseto Estéril, como por exemplo a de determinar a competitividade dos machos e fêmeas, irradiadas ou não, os hábitos de acasalamento, existência e freqüência de mono ou poligamia ou poliandria, número de acasalamentos, etc. Por outro lado permite a marcação do esperma ou espermatozóides ou mesmo espermatóforos, a avaliação da efetividade dos machos estéreis soltos, pela maior ou menor densidade de ovos marcados existentes no campo.

Preferiu-se também neste trabalho a utilização do fósforo radioativo (^{32}P), por este ser elemento metabolito universal, participando de todas as reações vitais dos organismos, assim como a sua relativa facilidade de manuseio, meia vida adequada para este tipo de pesquisa e, facilmente detectável.

CENA
Biblioteca

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

São raros os trabalhos entomológicos que visam a marcação de espermatozóides, espermatóforos, esperma ou mesmo ovos, utilizando-se de radioisótopos.

Desta maneira, em 1966, *AZEVEDO e PINHÃO (1967)* injetando ^{32}P em cobaias, lograram marcar machos da mosca tse-tse, *Glossina morsitans*. A metodologia daquele trabalho consistiu em injetar intraperitonialmente o fósforo-32, logrando com isto não somente marcar os machos, mas também os seus espermatóforos. Desta maneira conseguiram determinar a ocorrência de cruzamentos intervarietais e interespecíficos, pela simples presença de espermatóforos marcados dentro das espermátecas das fêmeas. A detecção do ^{32}P neste caso foi feita por meio de autoradiografia.

Outros pesquisadores, como *ROAN (1952), CUISANCE & ITARD (1970) e NOORDINK (1970)*, trabalhando com ^{32}P em contador Geiger Mueller em pragas de plantas, estudaram principalmente a sua ecologia, observando a distância de vôo e a competitividade de machos esterilizados e normais, através de esperma radioativo.

No Brasil, *NASCIMENTO FO & WIENDL (1972)* trabalhando com abelhas (*Apis mellifera*), conseguiram marcá-las com ^{32}P, utilizando-se de detecção por cintilação líquida, o que veio sobremaneira facilitar trabalhos ecológicos aumentando a eficiência da detecção.

Também *AMARAL (1972)* utilizando-se de ^{32}P em trabalho com abelhas *Apis mellifera* fez estudos de raio de vôo, preferindo a detecção por cintilação líquida.

WIENDL et alii, em *1973*, verificou a possibilidade de detectar a locomoção de gorgulhos (*Sitophilus zeamais*) em meio denso, como o arroz e o milho, mergulhando-os em uma solução contendo ^{59}Fe, gama emissor, de alta energia, detectando as radiações atra-

vés de um sistema acoplado a um cristal cintilador de NaI(Tl).

Todos estes pesquisadores conseguiram marcar os insetos por meio da alimentação ou mesmo imersão em uma solução, que continha o isótopo radioativo, diferindo portanto o tipo de marcação apenas pelos hábitos do inseto em questão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os insetos utilizados foram provenientes da criação massal do laboratório de Radioentomologia do CENA. São insetos geneticamente selecionados, sendo criados há 35 gerações sob condições controladas de temperatura entre 26 e 27°C e umidade relativa entre 65 e 75%.

Utilizaram-se 100 machos e 100 fêmeas virgens, recém emergidas. Para se assegurar a sua virgindade se fez a separação individual das pupas em caixinhas plásticas, de modo que somente havia necessidade de sexagem posterior. Os machos foram postos em uma gaiola de criação, medindo 25 cm de comprimento por 10cm de largura e 10 cm de altura, coberta de tela de malhas finas. As fêmeas foram mantidas em gaiolas de postura, conforme preconiza o trabalho de *WIENDL e PACHECO (1975)*.

Os machos e as fêmeas ficaram isoladas durante dois dias, recebendo alimento e água. Apenas os machos recebiam dieta marcada, já desde o primeiro dia, constituída de açúcar, água e proteína hidrolizada*. Esta dieta foi feita da seguinte maneira: ao xarope feito com 5 gramas de açúcar refinado e 4 ml de água destilada foi adicionado 343,9 µCi de ^{32}P, na forma de Na_2HPO_4, livre de carregador. Após a homogeneização, esta mistura foi levada a uma estufa, regulada a 60°C, por 12 horas, afim de permitir a evaporação do excesso de água e melhor adsorção do fósforo ao açúcar. Agora adicionaram-se mais 1,66 gramas de proteína hidrolizada, misturando-se até nova homogeneização.

---

* "Yeast Hydrolizate Enzimatic", da Nutritional Biochemicals Co., Cleveland, Ohio, U.S.A.

CENA
Biblioteca

Com uma espera de três dias, permitiu-se uma ação enzimática dando consistência pastosa à dieta, quando finalmente foi administrada aos machos da mosca do Mediterrâneo. O acasalamento dos insetos deu-se após o terceiro dia, durante três dias, em gaiolas de mantença, conforme *WIENDL e PACHECO (1975)*, alimentando-se os insetos com dieta não marcada. Depois os insetos foram sexados novamente, os machos retirados, e as fêmeas postas em uma gaiola de postura, junto com 100 machos não marcados, de mesma idade. Os ovos postos pelas fêmeas foram coletados durante nove dias, a cada 24 horas, sobre uma folha de papel de filtro umidecida conforme a técnica preconizada por *WIENDL & PACHECO (1975)*.

Considerou-se como sendo o primeiro dia o da primeira coleta de ovos, correspondendo assim ao 7º dia de vida dos insetos ou ao 4º após o início do acasalamento das fêmeas com os machos marcados.

As contagens eram feitas em sistema de cintilação líquida Beckman LS-230, em ampolas de cintilação (Nuclear Chicago Co., tipo TT5, 27-28 mm de diâmetro com capacidade para 20 mililitros). A solução cintiladora, num volume de 8 ml por ampola, era constituída de 4 gramas de PPO mais 50 miligramas de POPOP diluídos em um litro de tolueno comercial.

Cada ampola continha 0,2 ml de ovos, ou aproximadamente 1200 ovos, constituindo-se assim em uma repetição. Como havia variação na quantidade de posturas, variava o número de repetições, mas não o de ovos por repetição.

A radiação de fundo foi avaliada usando-se uma ampola contendo 1200 ovos, postos por fêmeas que permaneceram com machos normais, não marcados.

4. DADOS OBTIDOS

Encontram-se no Quadro 1 as médias das contagens, assim como o desvio padrão, o coeficiente de variação em porcentagens, assim como ainda a sua respectiva significância.

Afim de se poder calcular as médias, corresponderam ao primeiro dia, 8 repetições, ao segundo dia, 6 repetições, ao terceiro dia, 7 repetições, ao quarto dia, 6 repetições, ao quinto dia, 4 repetições, ao sexto e sétimo dias, 7 repetições, ao oitavo dia, 1 repetição e ao nono dia, 5 repetições.

Quadro 1 - Número de contagens por minuto de 1200 ovos da mosca do Mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wied.) marcados por intermédio de esperma radioativo, seus respectivos desvios padrão e coeficientes de variação e significância, em relação aos dias de oviposição, e ao número de repetições (vide texto).

DIAS DE OVIPOSIÇÃO	CPM (Média)	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	NÚMERO DE REPETIÇÕES
1	216,5**	11,62	5,37	8
2	325,2**	18,63	5,53	6
3	99,8**	9,98	7,80	7
4	160,7**	13,52	7,90	6
5	61,0**	4,60	6,12	4
6	11,0*	3,22	24,31	7
7	9,9*	2,89	23,17	7
8	4,5	2,75	47,94	1
9	2,4	2,55	78,50	5

CENA 3631 Biblioteca

5. DISCUSSÃO

Pelos dados obtidos e seus respectivos graus de confiança, pode-se dizer que a marcação de ovos de *Ceratitis capitata* através de esperma radioativo é eficiente até o quinto dia após o acasalamento com machos radioativos.

A partir deste tempo as contagens reduzem-se muito, possivelmente por causa da eliminação dos espermatozóides marcados por intermédio das posturas e sua substituição por outros não marcados, provenientes dos machos não radioativos. Segue-se que, ao contrário do geralmente aceito, deve haver mais de uma cópula nesta espécie, uma vez que as fêmeas põe ovos normalmente durante mais de 20 dias.

Pode-se dizer ainda que os resultados obtidos devem inspirar maiores cuidados aos pesquisadores que trabalham com moscas marcadas por radiofósforo no campo, uma vez que a radioatividade dos insetos de laboratório soltos sobre os naturais no campo é transferida para estes. Poderia haver portanto confusão entre insetos normais e liberados, mas por outro lado poderia haver certeza da ocorrência de cópula entre machos soltos e fêmeas naturais.

Sugerem ainda os resultados obtidos (Figura 1) que, uma correlação entre logaritmo da taxa de contagem em relação ao tempo, o ^{32}P presente na oviposição das fêmeas de *C. capitata* tem uma meia vida biológica de apenas 1 dia, em comparação com 14,3 dias da meia vida física deste isótopo.

Permite ainda o método avaliar se há ou não aspermia dos machos estéreis soltos em um campo, de modo que por aí se poderia avaliar nitidamente a eficiência destes sobre a população natural.

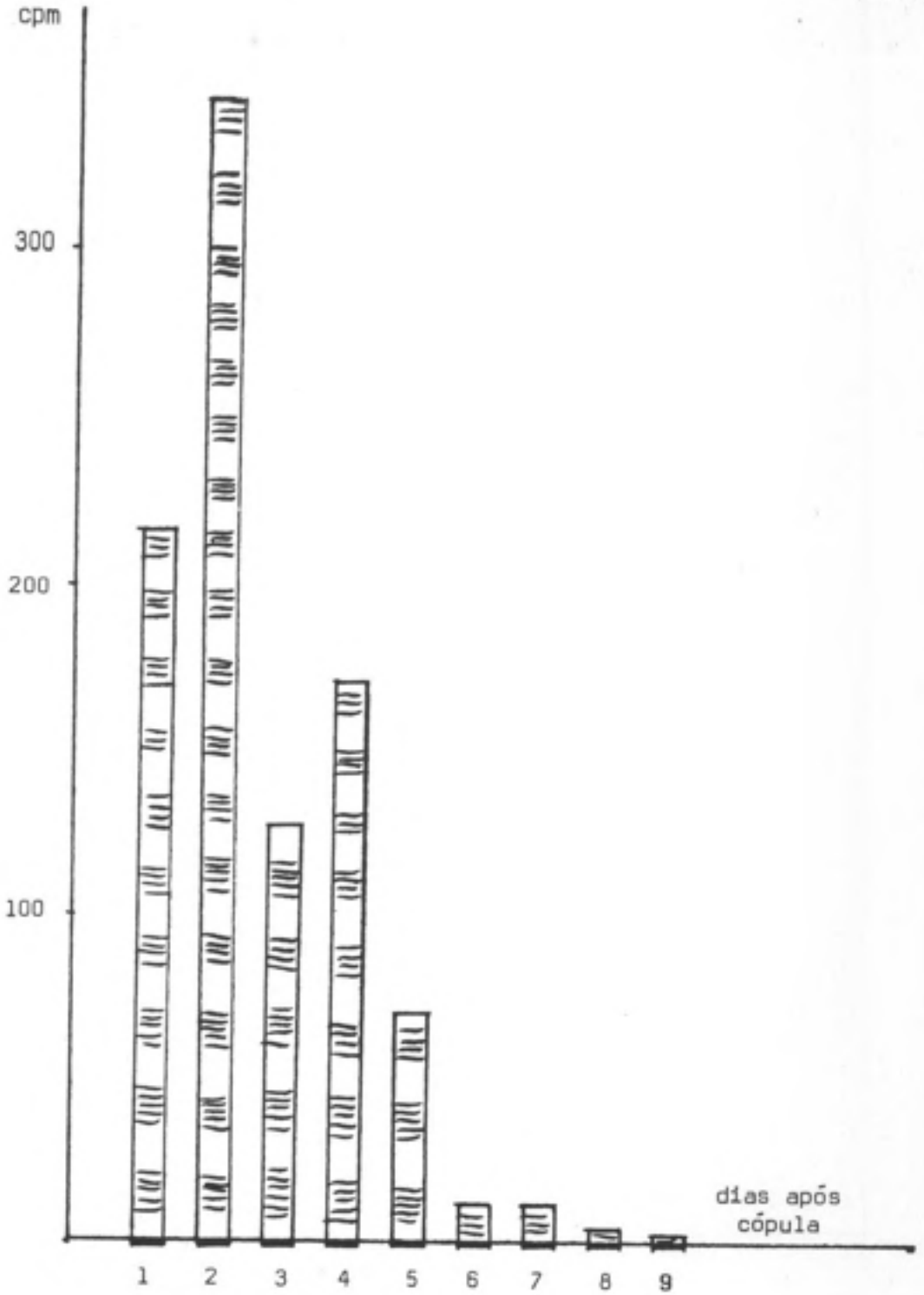

Figura 1 - Número de contagens por minuto em cintilador líquido, durante vários dias, de ovos de *Ceratitis capitata* (Wied.) marcados através de esperma com fósforo radioativo.

6. CONCLUSÕES

Pela análise dos resultados obtidos assim como da sua discussão, pode-se concluir que:

1. O radioisótopo ^{32}P transmite-se do alimento ao esperma e deste ao ovo.

2. As contagens por minuto por 1200 ovos postos no primeiro dia são aproximadamente 30% menores que as do segundo dia.

3. A atividade de 1200 ovos decai a partir do segundo dia, tornando-se insignificante a partir do sexto dia.

7. BIBLIOGRAFIA

AMARAL, E. - 1972. Polinização entomófila de *Coffea arabica* L., raio de ação e coleta de pólen pela *Apis mellifera* L. 1758, (Hymenoptera Apidae) em cafezal florido. Piracicaba, 1972, 82 pag. (Tese de Livre Docente, ESALQ, USP).

AZEVEDO, J.F. & R.C. PINHÃO - 1967. Prospects offered by the Laboratory Breeding of *Glossina morsitans* in Lisbon. Control of Livestock pests by Sterile Male Technique. IAEA - Vienna, 23/27 jan. pp.5.

ROAN, C.C. - 1952. Tagging Oriental Fruit Flies with Radioactive Phosphorus for field movement Studies. J. Econ. Entomol. *45*, pp. 826.

CUISANCE, D. & J. ITARD - 1970. Techniques de marquage des Glossines au moyen de Radioisotopes - Sterility Principle for Insect Control or Eradication - IAEA, Vienna, 14/18 Sept. pp. 111.

NASCIMENTO FO, V.F. & F.M. WIENDL - 1972. Possibilidades da substituição do sistema Geiger Mueller pelo Cintilador Líquido na medida da radioatividade da abelha africana *Apis mellifera adansoni* (L) marcada com ^{32}P. Piracicaba, CENA, 1972, 38p. Boletim Técnico nº 1.

NOORDINK, J.P.W. - 1970. Irradiation, Competitiveness and the Use of Radioisotopes in Sterile Male Studies with the Onion Fly *Hylemya antiqua* (Meigen) - Sterility Principle for Insect Control or Eradication - IAEA, Vienna, 14/18 Sept. pp.323.

7. BIBLIOGRAFIA

AMARAL, E. - 1972. Polinização entomófila de *Coffea arabica* L., raio de ação e coleta de pólen pela *Apis mellifera* L. 1758, (Hymenoptera Apidae) em cafezal florido. Piracicaba, 1972, 82 pag. (Tese de Livre Docente, ESALQ, USP).

AZEVEDO, J.F. & R.C. PINHÃO - 1967. Prospects offered by the Laboratory Breeding of *Glossina morsitans* in Lisbon. Control of Livestock pests by Sterile Male Technique. IAEA - Vienna, 23/27 jan. pp.5.

ROAN, C.C. - 1952. Tagging Oriental Fruit Flies with Radioactive Phosphorus for field movement Studies. J. Econ. Entomol. *45*, pp. 826.

CUISANCE, D. & J. ITARD - 1970. Techniques de marquage des Glossines au moyen de Radioisotopes - Sterility Principle for Insect Control or Eradication - IAEA, Vienna, 14/18 Sept. pp. 111.

NASCIMENTO FQ, V.F. & F.M. WIENDL - 1972. Possibilidades da substituição do sistema Geiger Mueller pelo Cintilador Líquido na medida da radioatividade da abelha africana *Apis mellifera adansoni* (L) marcada com ^{32}P. Piracicaba, CENA, 1972, 38p. Boletim Técnico nº 1.

NOORDINK, J.P.W. - 1970. Irradiation, Competitiveness and the Use of Radioisotopes in Sterile Male Studies with the Onion Fly *Hylemya antiqua* (Meigen) - Sterility Principle for Insect Control or Eradication - IAEA, Vienna, 14/18 Sept. pp.323.

WIENDL, F.M. & J.M. PACHECO - 1975. Técnicas de criação de *Ceratitis capitata* (Wied.) em laboratório. Enviado para publicação ao 2º Congresso Anual da Soc. Entomológica do Brasil. Pelotas, 2/7 Fev.

WIENDL, F.M.; J.M.M. WALDER; J.M. PACHECO; R.B. SGRILLO - 1973. Locomoção de *Sitophilus zeamais* Mots. detectada por meio de traçador radioativo. 1º Congresso Anual da Soc. Entomológica do Brasil, Viçosa, 1/7 de junho.

AGRADECIMENTOS

O autores agradecem aos Srs. Yukio Fukushiro, Valdemar Luiz Tornisielo e Valter Arthur pela ajuda nas criações, ao Sr. José O. Bertoli pelo trabalho no cintilador líquido e ao colega Virgílio F. do Nascimento Fº pela revisão do texto.

CENA
Biblioteca