

EFFECTOS DEL MOVIMIENTO EN LA PUESTA DE HUEVOS Y EL TIEMPO DE DESARROLLO EMBRIONARIO EN *Drosophila melanogaster* (MOSCA DE LA FRUTA)

Tania Setzer Espino, Berenice Muñoz Ledo Jiménez, Ariadna Paniagua Reyes

Resumen

Se trabajo con la mosca *Drosophila melanogaster* ya que es el insecto que más se utiliza para los trabajos de investigación. Primero se amplificó la línea ORER para tener una población abundante de moscas. Una vez obtenida, se utilizó para dos pruebas. La primera prueba (A), consistió en acostumar a las moscas a un alimento a base de uva. Una vez acostumbradas al medio de uva, se obtuvieron 6 frascos con 100 moscas hembra en cada uno. Tres de los frascos fue molestado cada 10 min durante hora y media, para después contar los huevos puestos. Obtuvimos que al momento de perturbar a las moscas, la puesta de huevos disminuye. La segunda prueba (B), consistió en tener cierto número de huevos en movimiento oscilatorio a 120 rpm. Se obtuvieron 4 placas, dos de las cuales, estuvieron en movimiento constante y después de 21 horas se observó cuantos huevos no habían eclosionado. Obtuvimos que el movimiento oscilatorio no afecta el desarrollo del huevo. Comprobamos que en las pruebas de control eclosionan menos huevos que en los experimentos.

Introducción

1.-La mosca de la fruta.

La *D. melanogaster*, conocida como la mosca de la fruta, es un modelo clásico para la investigación en biología ya que es pequeña (3 mm), dimorfa (fácil de reconocer hembras y machos), es manejable, barata, con un ciclo de vida corto, existen excelentes marcadores genéticos y una extensa variedad de mutantes. Es fácil de reproducir, almacenar y de conservar en grandes cantidades. El ciclo de vida es de 10 a 12 días (Arellano Cruz, N.A). Es la especie animal mejor conocida genéticamente, en la que se han desarrollado la tecnología mas sofisticada para el estudio de su genética que permiten estudiar problemas inabordables en otras especies como la propia especie humana (Crónica 2005).

Este insecto ha sido utilizado por casi un siglo para experimentos genéticos. Tiene 4 pares de cromosomas: los cromosomas sexuales X y Y, y 3 pares de autosomas. Su genoma ha sido totalmente secuenciado. Además, se ha descubierto que tiene mucho en común con el humano. El 61 % de una muestra de genes causantes de enfermedades humanas se identifican en el código genético de la mosca de fruta y el 50 % de las proteínas de las moscas tienen parentesco con los mamíferos. Por ejemplo, se han hecho investigaciones de que *D. melanogaster* puede padecer algunas enfermedades similares a las humanas, como cáncer, Alzheimer y otras (Bhattacharya, 2004).

Tenemos muchos genes en común con la mosca, esto tiene una consecuencia práctica muy importante ya que lo que se descubra será en gran medida aplicable a los seres humanos (Crónica 2005).

2.- El desarrollo de *Drosophila*

Un concepto central en el desarrollo de los animales, incluyendo a la mosca, es el del morfógeno que es una sustancia que especifica una identidad celular como función de su concentración. Un gradiente continuo de concentración de morfógeno puede provocar diferentes respuestas de una cierta célula en las concentraciones del umbral. Por ejemplo: si se encuentra arriba del umbral se obtiene una respuesta, pero abajo del umbral se obtiene una distinta (Harvey, 2000).

La hembra es cortejada y al tercer día está lista para la puesta o deposición de huevos. El desarrollo embrionario de *Drosophila* empieza cuando es huevo hasta que la larva eclosiona, esto es, cuando la metamorfosis esta completa y la mosca emerge de la pupa (capa protectora).

La producción de un huevo de *D. melanogaster* ocurre en los ovarios que son parte de los ovarios. En cada uno de los racimos de los ovarios, la célula se divide asimétricamente cuatro veces, generando 16 células. Una de éstas completa la meiosis y se convierte en ovocito (célula formada durante el proceso de ovogénesis¹). Las 15 restantes se convertirán en células nodrizas, que son las células que sintetizan mRNAs y las proteínas necesarias para la maduración del ovocito que crece considerablemente. Los mRNAs y las proteínas son moléculas necesarias para la maduración (Harvey, 2000). Desde hace varios años se sabe que estas moléculas son morfógenos, estos morfógenos se localizan específicamente dentro del huevo. Así, por ejemplo, algunos de ellos se localizan en la parte anterior y otros en la región posterior exclusivamente. Estos morfógenos determinan la identidad celular de cada región del embrión (Sean et al, 2001).

3.- Efectos de movimiento en *D. melanogaster*

La NASA ha comprobado que los seres vivos son afectados por perturbaciones tales como la gravedad y movimientos. La fisiología de los

¹Ovogénesis: proceso de formación de óvulos, células sexuales femeninas, a partir de las células germinativas, mediante divisiones sucesivas que tienen lugar en los ovarios.

seres cambia con dichas perturbaciones. Es por esto que la NASA ha iniciado desde hace varios años programas para financiar investigación sobre la vida en el espacio y se han utilizado diversos organismos modelo para realizar diversos experimentos. Por ejemplo: plantas, anfibios, insectos y pequeños mamíferos han sido sometidos a la microgravedad (gravedad 0) durante el desarrollo embrionario. Se ha comprobado que tarda más este proceso en el espacio que en la Tierra, o que no se completa del todo, ya que hay muchos factores que intervienen, por ejemplo, la radiación del espacio (Reproduction in Space, 2000).

Lo que hace a *D. melanogaster* un candidato ideal para los estudios de la gravedad, es que actualmente es el único modelo animal que tiene una respuesta a la gravedad fácilmente cuantificable (se han encontrado las primeras mutaciones que afectan la percepción de la gravedad (gravitaxis) de un organismo adulto) (Bhattacharya, 2004).

Nosotros nos preguntamos en uno de las pruebas que realizaremos si el movimiento oscilatorio pudiera alterar los gradientes dentro del huevo, modificando el tiempo en el que el embrión se desarrolla.

Nuestro trabajo consistió en averiguar si el movimiento oscilatorio afecta el tiempo de eclosión de los huevos. También investigamos si la perturbación manual afecta el número de huevos puestos por hembras de *D. melanogaster*.

Antecedentes

Algunos de los factores que han intervenido en los procesos de experimentación con la mosca son la radiación y la gravedad. Una de las personas que ha experimentado con el factor de gravedad es la Dra. Sharmila Bhattacharya (Bhattacharya, 2004). De los dos experimentos realizados por ella, uno llamó nuestra atención. La hipótesis planteada por la Dra. Bhattacharya fue que la agitación o perturbación afectaría la deposición de huevos, así como un decrecimiento en la población de mosca. La Dra. Bhattacharya acertó en su hipótesis y el experimento que ella realizó sirvió para comparar y probar que el hecho de vivir en el espacio, en movimiento continuo, causa problemas de reproducción. La Dra. Bhattacharya pone las moscas en una centrífuga, tratando de igualar la gravedad en el espacio. En nuestro caso, quisimos probar que el hecho de que sean molestadas va a afectar la cantidad de huevos puestos y al estar en movimiento constante (oscilatorio), los huevos tardarán más en eclosionar.

Hipótesis

En *D. melanogaster*, el movimiento oscilatorio afecta el tiempo de desarrollo embrionario y en el movimiento manual, la frecuencia de deposición de huevos.

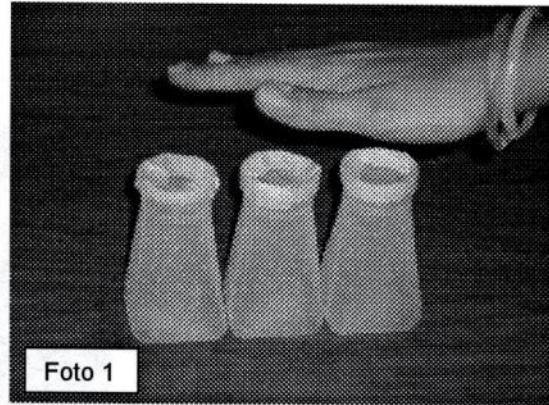
Objetivos

1. - Determinar si perturbar a la mosca manualmente afecta la deposición de huevos.

2.- Determinar si el movimiento oscilatorio afecta el tiempo de eclosión del huevo fertilizado de *D. melanogaster*.

Metodología

Prueba A: Se amplificó la línea ORER para tener una población abundante de moscas *D. melanogaster*. Una vez obtenida la población, se utiliza el microscopio para sexar (separa hembras y machos), ya que sólo se utilizarán hembras (Foto 3). Después, se vaciaron aproximadamente 100 moscas hembra en 6 botellas (3 botellas de control y 3 de experimento), cada botella se cubrió



con una placa de alimento. El alimento se dejó un día para que se adapten (en este caso medio de uva), cambiando las placas 2 veces durante el día. Una vez adaptadas al medio de uva, las tres botellas del experimento (Foto 1) fueron expuestas cada 10 min a ser molestadas durante 30 segundos. El experimento duró hora y media. Después, se quitaron las placas de alimento de las seis botellas, se llevaron al microscopio y se contaron los huevos puestos.

Prueba B: Se esperó 3 horas para que las hembras fecundaran huevos en las placas con medio de uva. Las placas se sometieron a movimiento oscilatorio a 120 rpm en un agitador (Foto 2) durante 21 horas. El experimento se llevó a cabo empezando a las 5:00pm y a las 8:00pm (inmediatamente después de que las hembras pusieron huevos). A las 7:00pm del día siguiente se observó cada media hora durante 3 horas cuantos huevos no eclosionaron en cada placa.



Material

- Moscas fértiles, machos y hembras, de la línea silvestre Oregon R (ORER)
- Alimento para mantenimiento: medio de levadura y piloncillo
- Autoclave
- Incubadora de 25°
- Placas para colección de huevos
- Medio de uva para colección de huevos
- Microscopio de disección
- Huevos fertilizados de la línea ORER
- Agitadores oscilatorios
- Agar

- Sacarosa
- Ácido Acético
- Ácido propiónico Fluka cat
- Grenetina
- Anestesiador de CO₂
- Pinceles

Resultados

Prueba A

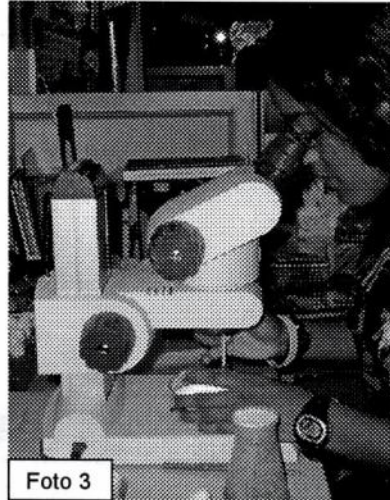


Foto 3

Nuestro resultado fue que la mosca molestada puso menos huevos que la mosca de control. Por lo tanto nuestra hipótesis fue comprobada. Nuestra tabla demuestra que se obtuvieron más huevos en los de control que en los de Experimento. El molestarlas causaba que las moscas fueran al fondo de la botella y al momento de parar, las moscas tomaban mucho tiempo en regresar al medio de uva.

Puesta de Huevos	Control (Xi)	Dmi (xi - x)	(xi-x) ²
	30	30-35= -5	25
	40	40-35= 5	25
	35	35-35= 0	0
Total	105	0	50

Tabla.1 Puesta de huevos en nuestra prueba de control

Promedio (X)	35
Varianza	25
Desviación estándar	5
Error estándar (SE)	2.88

Tabla.2 Medidas de Dispersión de Control

Puesta de Huevos	Experimento (Xi ₂)	Dmi (xi ₂ - x)	(xi ₂ -x) ²
	9	9-12.66= -3.66	13.39
	16	16-12.66= 3.34	11.15
	13	13-12.66= 0.34	0.11
Total	38	0	24.66

Tabla.3 Puesta de huevos en el experimento

Promedio (X₂)	12.66
Varianza	12.33
Desviación estándar	3.51
Error estándar (SE₂)	2.02

Tabla.4 Medidas de Dispersión del Experimento

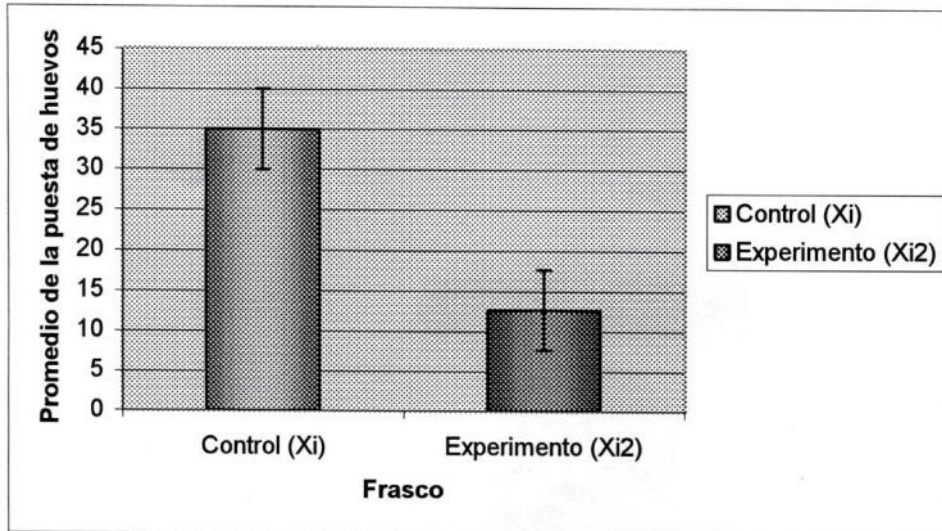


Fig. 1 Gráfica de los promedios de la puesta de huevos. Promedio de 3 pruebas de Control y 3 de experimento, presentando la Desviación estándar de las Tablas 1 y 4.

Al tener todos nuestros datos de la prueba A, nos dedicamos a sacar el Two-sample t test, para comprobar si nuestra hipótesis nula es rechazada. Decidimos realizar el 2-sample-test-t ya que las medidas hechas en las dos poblaciones (control y experimento) son diferentes una de la otra.

- Two-Sample-t-test

1.- Hipótesis nula: No hay diferencia entre el número de huevos puestos de la prueba de control y el experimento. Las dos poblaciones deberán tener la misma medida.

2.- $SEd = \sqrt{(SE)^2 + (SE2)^2} = \sqrt{(2.88)^2 + (2.027)^2} = 3.52$

Examen estadístico (t) = $X - X_2 / SEd = 35 - 12.66 / 3.52 = 6.34$

3.- $NA + NB - 2$ 5% de 4 = 2.77
 $3 + 3 - 2 = 4$

4.- Como t (6.3433) es diferente al valor crítico que es 2.776 en el nivel significativo, entonces $6.34 > 2.77$ y por lo tanto rechazaremos la hipótesis nula.

5.- 95% CI (Diferencia) = $X - X_2 \pm (t_{NA + NB - 2} (5\%) * SEd)$
 $= 35 - 12.66 \pm (2.77 * 3.52)$
 $= 12.56$
 $= \underline{32.11}$

Prueba B

En la Tabla.5 se puede observar los huevos que eclosionaron. Como se puede observar, eclosionaron más huevos de los experimentos que de los controles. Por lo tanto nuestra hipótesis es refutada, el movimiento no afecta el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. EL movimiento oscilatorio a 120 rpm no afecta el tiempo de eclosión del huevo fertilizado de *D. melanogaster*. El movimiento oscilatorio constante (120 rpm) no afecta este (eclosión del huevo) proceso biológico.

Hora	Control 1 (Xi)	Control 1 (%)	Dmi (Xi - X)	(Xi - X) ²
8:00pm 11 Mayo	80	100	52	2704
7:00pm 12 Mayo	14	17.5	-14	196
8:00pm 12 Mayo	10	12.5	-18	324
9:00pm 12 Mayo	8	10	-20	400
Total	112		0	3624

Tabla.5 En esta tabla se muestran los huevos que no habían eclosionado mientras se hacía el chequeo de cada hora del Control 1.

Promedio (X)	28
Varianza	1208
Desviación estándar	34.75
Error estándar	17.375

Tabla.6 Medidas de dispersión de la prueba de control 1

Hora	Control 2 (Xi ₂)	Control 2 (%)	Dmi (Xi ₂ - X ₂)	(Xi ₂ - X ₂) ²
8:00pm 11 Mayo	90	100	61.25	3751.56
7:00pm 12 Mayo	10	11.11	-18.75	351.56
8:00pm 12 Mayo	8	8.88	-20.75	430.56
9:00pm 12 Mayo	7	7.77	-21.75	473.06
Total	115		0	5006.74

Tabla.7 Huevos no eclosionados en el Control 2.

Promedio (X₂)	28.75
Varianza	1668.91
Desviación estándar	40.8
Error estándar	20.42

Tabla.8 Medidas de dispersión del Control 2

Hora	Exp. 1 (Xi ₃)	Exp. 1 (%)	Dmi (Xi ₃ - X ₃)	(Xi ₃ - X ₃) ²
8:00pm 11 Mayo	160	100	100	10,000
7:00pm 12 Mayo	35	21.87	-25	625
8:00pm 12 Mayo	23	14.37	-37	1,369
9:00pm 12 Mayo	22	13.75	-38	1,444
Total	240		0	13,438

Tabla.9 Huevos no eclosionados en el Experimento 1.

Promedio (X₃)	60
Varianza	4,479.33
Desviación estándar	66.92
Error estándar	33.46

Tabla.10 Medidas de dispersión del Experimento 1.

Hora	Exp. 2 (X_{i4})	Exp. 2 (%)	Dmi (X_{i4} - X₄)	(X_{i4} - X₄)²
8:00pm 11 Mayo	200	100	128.5	16,512
7:00pm 12 Mayo	45	22.5	-26.5	702.25
8:00pm 12 Mayo	21	10.5	-50.5	2,550
9:00pm 12 Mayo	20	10	-51.5	2,652
Total	286		0	22,417

Tabla.11 Huevos no eclosionados en el Experimento 2.

Promedio (X₄)	71.5
Varianza	7,472.33
Desviación estándar	86.44
Error estándar	43.22

Tabla.12 Medidas de dispersión del Experimento 2.

Control 1 y Exp. 1

$$t = 60 - 28 / 66.21 = 0.48$$

$$SEd = \sqrt{(60)^2 + (28)^2} = 66.21$$

Control 1 y Exp. 2

$$t = 71.5 - 28 / 76.78 = 0.56$$

$$SEd = \sqrt{(71.5)^2 + (28)^2} = 76.78$$

Control 2 y Exp. 1

$$t = 60 - 28.75 / 66.53 = 0.46$$

$$SEd = \sqrt{(60)^2 + (28.75)^2} = 66.53$$

Control 2 y Exp. 2

$$t = 71.5 - 28.75 / 77.06 = 0.55$$

$$SEd = \sqrt{(71.5)^2 + (28.75)^2} = 77.06$$

- Two-sample-t-test

1.- Hipótesis nula: No habrá diferencia entre la eclosión de los huevos de control y la de los experimentos. Los que están sometidos a movimiento oscilatorio eclosionaran al mismo tiempo que los de control.

2.- Valores de t

$$\text{Control 1 y Exp. 1} = .48$$

$$\text{Control 1 y Exp. 2} = 0.56$$

$$\text{Control 2 y Exp. 1} = 0.46$$

$$\text{Control 2 y Exp. 2} = 0.55$$

3.- Para todos NA + NB $-2 = 4+4-2 = 6$
 5% de 6 = 2.44

4.- Control 1 y Exp. 1 0.48 > 2.44
 Control 1 y Exp. 2 0.56 > 2.44
 Control 2 y Exp. 1 0.46 > 2.44
 Control 2 y Exp. 2 0.55 > 2.44

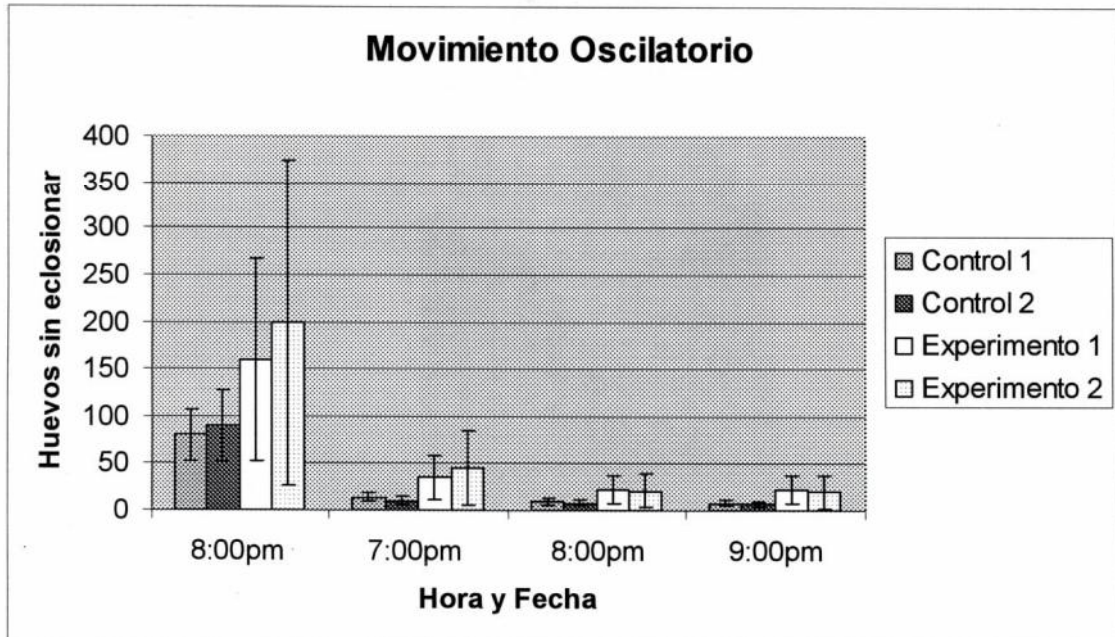
No tenemos evidencia para rechazar la hipótesis nula ya que los valores de t son menores que el valor tabulado en el nivel significativo de 5%.

5.- Control 1 y Exp. 1
 95% CI = $60 - 28 \pm (2.44 * 66.21) = \frac{194.01}{-130.01}$

Control 1 y Exp. 2 = 0.56
 95% CI = $71.5 - 28 \pm (2.44 * 76.78) = \frac{231.38}{-144.38}$

Control 2 y Exp. 1 = 0.46
 95% CI = $60 - 28.75 \pm (2.44 * 66.53) = \frac{194.04}{-131.54}$

Control 2 y Exp. 2 = 0.55
 95% CI = $71.5 - 28.75 \pm (2.44 * 77.06) = \frac{231.31}{-145.81}$



F.2 La grafica representa a la Tabla.5, que se muestra la cantidad de huevos que no eclosionaron. Esta gráfica muestra que los experimentos a pesar de tener una gran cantidad de huevos, al pasar la primera hora, el numero de eclosiones es mayor que en las de control.

ANEXO

Desarrollo de *D. Melanogaster*

La *Drosophila* tiene un ciclo de vida que dura aproximadamente 15 días y consiste en:

- Día 0: La hembra pone los huevos- el macho tiene que cortejar a la hembra. Los huevos que deja la hembra miden aproximadamente unos 5 mm, y son puestos por la hembra en su tercer día de adulta.
- Día 1: Desarrollo embrionario (duración: 1 día)- la madre deposita los huevos que dentro llevan grupos de células precursoras.
- Día 2: Primer Instar larval (duración:1 día)
- Día 3: Segundo Instar larval (duración: 1 día)
- Día 4-5: Tercer Instar larval (duración 2 días)- podemos observar a la larva de la mosca trepar las paredes, preparándose para la pupación.
- Formación de la pupa (después de 5 días que se ponen los huevos)- se forma la capa protectora llamada pupa, es clara y dura. En esta fase se lleva a cabo la metamorfosis, los tejidos larvales se degradan (excepto los cerebrales y unos cuantos otros). Ya hay unos grupos de sacos de células que formaran cada parte del cuerpo como: las patas, ojos, antena...
- Día 11-12: Eclosión (cuando la mosca sale de la pupa)- al final el organismo esta listo para emerger de la pupa a su estado adulto.
- Adulto (15-20 días)- cuando la metamorfosis esta completada, las moscas emergen de su pupa. Son frágiles, tienen un color claro, y sus alas todavía no están extendidas. Las moscas adquieren color en unas cuantas horas y toman la apariencia de una mosca adulta.