PRÁCTICA 1

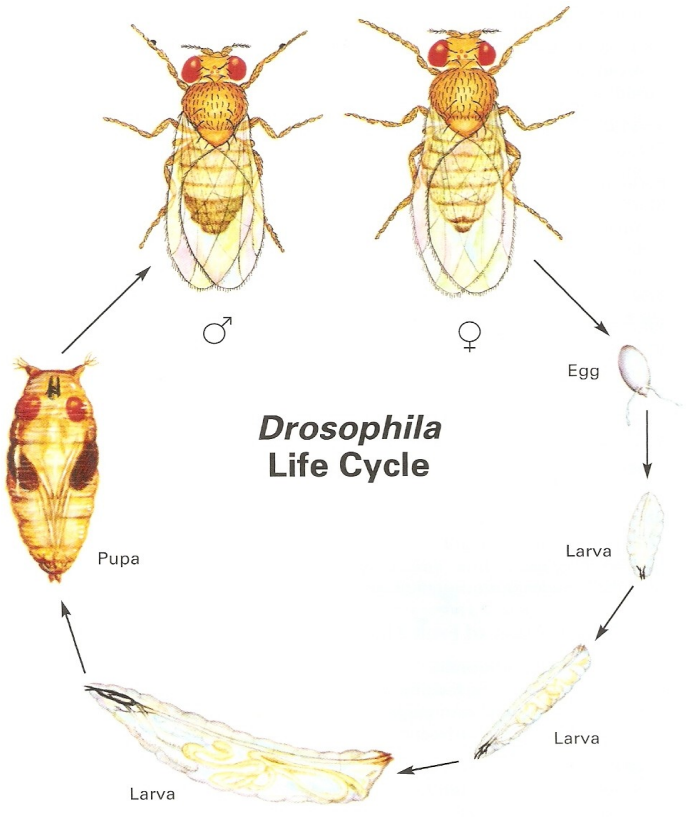
Drosophila melanogaster I. MANIPULACIÓN, DESCRIPCIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO Y DE LA MORFOLOGÍA. OBSERVACIÓN DE *Drosophila virilis*

INTRODUCCIÓN

Para llevar a cabo estudios de aspectos esenciales en Genética se utilizan organismos eucariotas como material de experimentación, como por ejemplo la mosca *Drosophila melanogaster*, ya que sus características biológicas, genéticas y citogenéticas, la hacen un material ideal para la investigación genética. *Drosophila* es una mosca de tamaño pequeño (de 2 a 3 mm y 0,8 a 1,5 mg, según sea macho o hembra respectivamente) ampliamente extendida por todo el mundo, encontrándose generalmente asociada a frutas, principalmente uvas, plátanos y ciruelas, especialmente si están en fermentación, ya que además de los jugos de las frutas, las levaduras constituyen una parte importante de su dieta. Por este motivo a *Drosophila* también se la conoce por "mosca de la fruta".
Algunas de las características de la mosca de la fruta son:

- Es muy abundante y fácil de capturar.
- Se mantiene fácilmente en el laboratorio y es de manejo sencillo.
- Produce una gran cantidad de descendientes, lo que facilita la comprobación estadística de los resultados cuando se realizan cruzamientos.
- A 25 ºC su ciclo biológico es corto, de 10 a 11 días aproximadamente.
- Tiene sólo cuatro pares de cromosomas, los cuales en las glándulas salivares de las larvas se encuentran en forma de cromosomas politénicos (que veremos en la Práctica 3 de la asignatura).

Ciclo biol



Drosophila mplicada. Su ciclo biológ sa por cuatro estados de (iv) imago o adulto.

La hembra después del apareamiento acumula el esperma en un receptáculo espermático y los huevos son fecundados posteriormente conforme pasan a través del oviducto hacia el orificio de salida (placa vaginal). La hembra puede poner huevos incluso sin estar fecundada. La ovoposición comienza en la hembra adulta al segundo día después de su emergencia, pudiendo llegar a poner hasta 50-75 huevos por día, llegando hasta 400-500 en diez días. Lógicamente solo aquéllos huevos que han sido fecundados se desarrollarán.

(i) Huevo: son ovoides de 0,19 x 0,5 mm, blancos y recubiertos de una fuerte envoltura con dos apéndices delgados en el extremo anterior. En condiciones ambientales óptimas el huevo es puesto en el momento en que los dos pronúcleos se unen mediante un proceso denominado cariogamia. El desarrollo embrionario comienza inmediatamente después de la fertilización y, como en la mayoría de los insectos, se distinguen dos períodos: el período embrionario, que transcurre dentro del huevo y comprende desde la fertilización hasta que emerge la larva, y el período postembrionario, que se inicia con la eclosión del huevo y comprende las etapas de larva, pupa e imago (o insecto adulto). El núcleo diploide formado tras la cariogamia se divide mitóticamente al cabo de 20 minutos, y los núcleos originados se dividen periódica y sincronizadamente cada 10 minutos. Doscientos minutos después de la fertilización empieza la formación de la gástrula. Son visibles dos invaginaciones, una ventro-lateral en el límite posterior del primer tercio del cuerpo (surco cefálico) y otra a lo largo de la región ventral de los dos tercios posteriores (surco ventral). A partir de ellas se originan los procesos organo-genéticos que conducirán a la formación y emergencia de la larva al cabo de 22 horas.

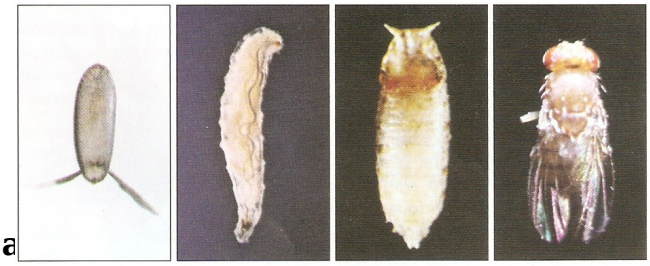
(ii) Larvas: al cabo de un día, el huevo eclosiona y de él sale una larva blanca, con mandíbulas negras y un par de espiráculos. Las larvas viven dentro del medio de cultivo, son muy activas y voraces, creciendo muy rápidamente. Pasan por tres estadíos larvarios con dos mudas, de manera que muda la cutícula, el gancho de la boca y los espiráculos. Durante el período de crecimiento antes y después de las mudas a la larva se le llama “instar”. Al final del tercer estadío

la cutícula se endurece y oscurece para formarse el puparium, y en ese momento la larva llega a alcanzar una longitud de 4,5 mm.

(iii) Pupa: Al cabo de cuatro días aproximadamente las larvas abandonan el medio de cultivo y se fijan comenzando el estado de "pupa". Los espiráculos se transforman en "antenas pupales", disminuye la longitud de su cuerpo y se vuelve más oscura para formar el "puparium". Esta "prepupa" puede considerarse como el cuarto estadio larvario que termina con una muda, comenzando a partir de entonces el período de "pupa" o "crisálida". El metabolismo pupal se centra en la sustitución de tejidos larvarios por los del adulto, utilizando los tejidos de desecho de la larva como materia de energía para esta función. Al cabo de cinco días de iniciada la pupación aparece el adulto (o imago).

(iv) Adulto: o imago. Aparece, una vez roto el puparium, con el cuerpo muy pálido y sin desplegar las alas. Éstas se despliegan al cabo de una hora, y tras otras pocas horas alcanzan la pigmentación corporal normal, un color amarillo pajizo. Loa adultos pueden llegar a vivir un mes o poco más.

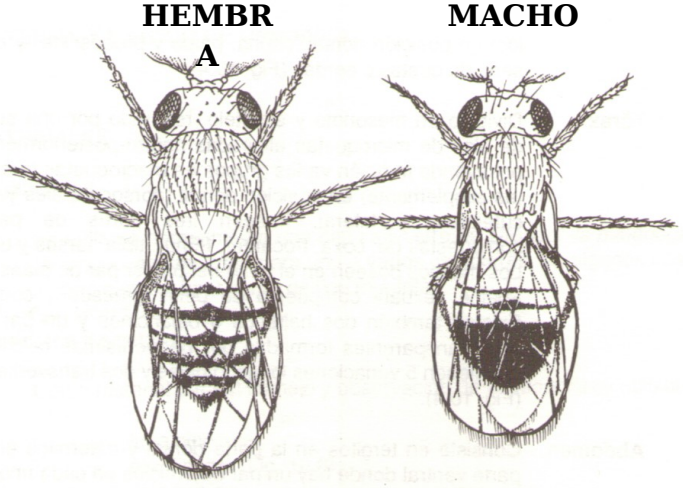
Estados del ciclo de vida de *D. melanogaster*



Huevo Larva Pupa Adulto

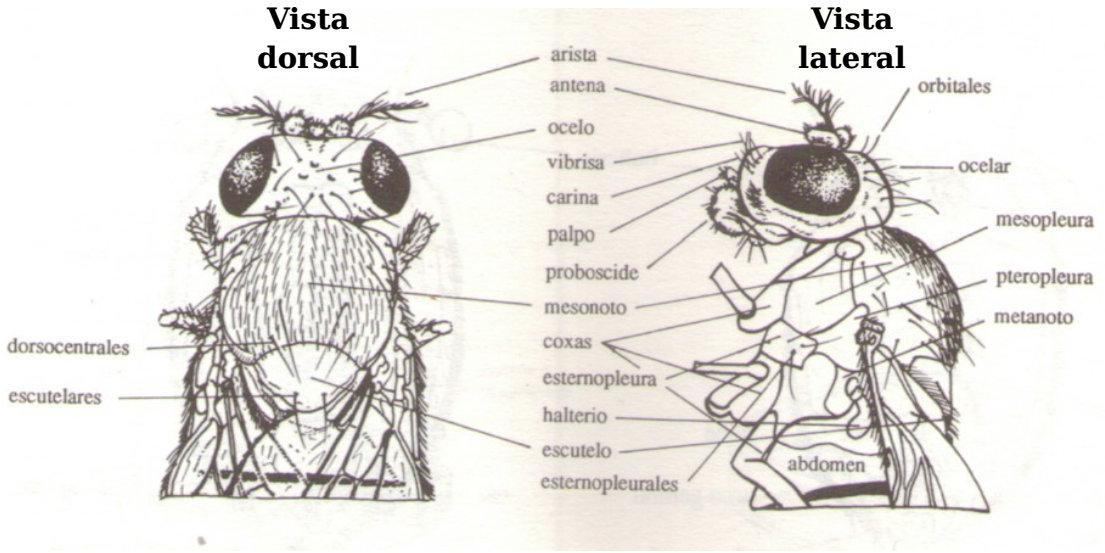
Partes de un a

En general el tamaño de la hembra es mayor que el de los machos. El cuerpo está dividido en: cabeza, tórax y abdomen.

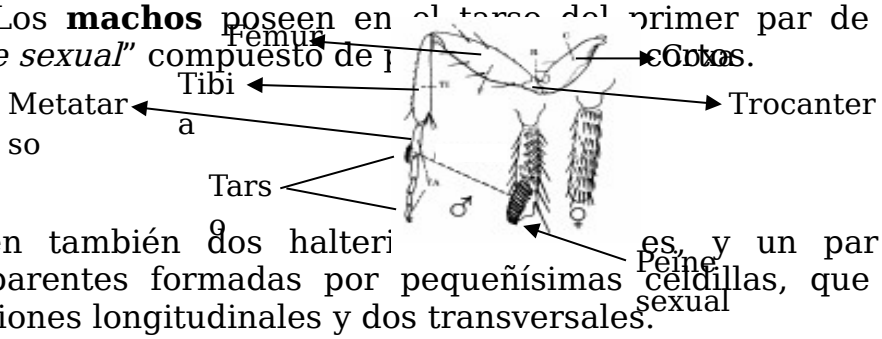


-Cabeza: presenta antenas; dos grande ojos compuestos y de forma redondeada, formados por cientos de omatidios de color rojo mate, situados en posición lateral; tres ojos simples (ocelos) en posición

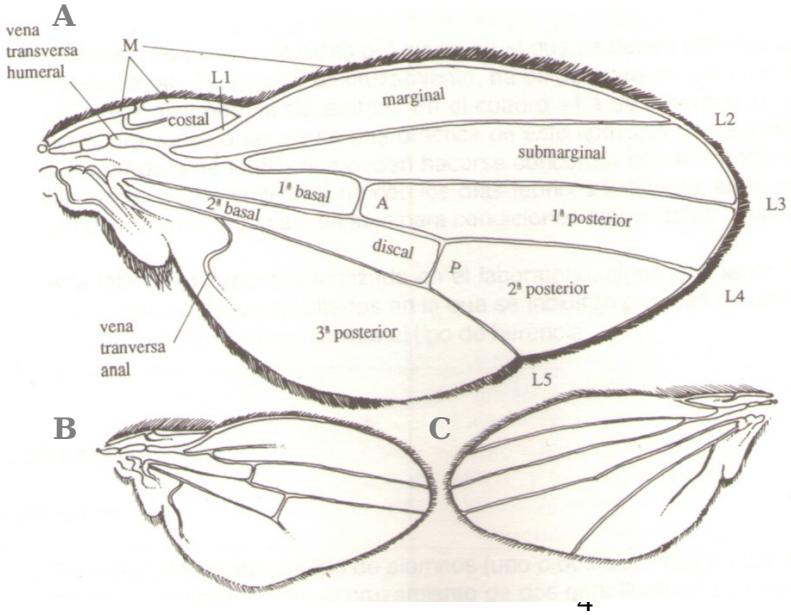
dorsal; carina, palpo y proboscide y una serie de quetas o cerdas que sirven como órganos de los sentidos.



-Tórax: Se divide en mesonoto y escutelo, recorrido por una serie de filas de microquetas alineadas antero-posteriormente, poseyendo también varios grupos de macroquetas (o quetas simplemente) en posición dorsal (dorsocentrales y escutelares) y lateral. Poseen tres pares de patas compuestas de: coxa, trocanter, fémur, tibia, tarsos y uña. Los **machos** poseen en el tarso del primer par de patas un "*peine sexual*" compuesto de l

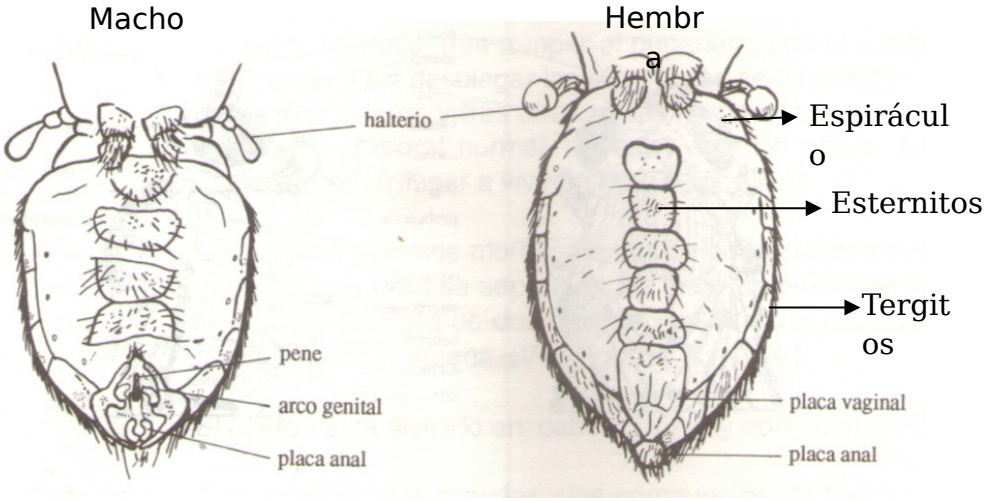


Existen también dos halteri es, y un par de alas transparentes formadas por pequeñísimas celdillas, que tienen 5 venaciones longitudinales y dos transversales.



normal de *D. melanogaster*; **B:** aspecto del mutante radius incompletus; y **C:** mutante crossveinless. Están indicados los nombres de las celdillas del ala. L1 a L5 y M señalan respectivamente las venas longitudinales 1

-Abdomen: Está formado por tergitos en la parte dorsal y esternitos en la parte ventral donde hay un par de orificios en cada uno de ellos: espiráculos. La parte final del abdomen es diferente en machos y hembras.
A continuación se representa la parte ventral del abdomen de *D. melanogaster*:



En los machos, el abdomen es de forma redondeada con la parte dorsal completamente oscura (negra) y la ventral portando el pene y el arco genital. En las hembras termina en forma más puntiaguda, menos amplia la franja oscura dorsal y la parte ventral con la placa vaginal.

En general el tamaño de la hembra es mayor que el de los machos.

OBJETIVO DE LA PRÁCTICA

La práctica estará dedicada al adiestramiento en el manejo experimental de *Drosophila melanogaster* para reconocer sus principales características genéticas y biológicas. Se observarán las etapas del ciclo biológico así como la morfología de los adultos, determinando si son machos ó hembras. Además se analizará la morfología de *Drosophila virilis*.

MATERIALES

Organismos

Se utilizará una cepa silvestre de *Drosophila virilis* y otra de *Drosophila melanogaster*.

Medio de cultivo
Las cepas de *Drosophila* se cultivan en el laboratorio en botellas de cristal blanco de cuello ancho o en tubos de 50 mL. Ambos recipientes se cierran con tapones de goma-espuma o de algodón envuelto en grasa. En ambos recipientes se vierte una capa de 2 a 3 mL de papilla cuya composición es la siguiente:

100 g de levadura fresca panadera
100 g de sacarosa (o azúcar normal)
1 g de NaCl
25 g de agar
1 L de agua (del grifo)

Para preparar la palilla se adicionan todos los ingredientes a 1 litro de agua utilizando un erlenmeyer de 2 L. Se tapa con un algodón graso y se esteriliza en autoclave durante 18 minutos a 120 ºC y 1 kg/cm^2 de presión. Después se deja enfriar la papilla hasta los 65 ºC y a continuación se añaden 5 mL de ácido propiónico (antifúngico) agitándose para que se distribuya uniformemente. Por último, se distribuye el medio en las botellas cuando esté caliente.
Antes de introducir las moscas en las botellas conviene dejar pasar un día o dos para que el exceso de agua se evapore. Los cultivos deben estar en una estufa con control de temperatura para mantenerlos a 25 ºC.

Productos y equipos
Como material para el manejo y observación de *Drosophila* se utilizará:
-Lupa binocular
-Eterificador
-Eter
-Reeterificador, placa petri de cristal
-Botellas con moscas
-Pincel pequeño y suave para mover las moscas
-Papel de filtro esterilizado
-Frasco “cementerio” con tapa, de boca ancha, conteniendo alcohol al 70 % para introducir las moscas desechadas

PROCEDIMIENTO

Eterificación y examen de las moscas

Para la observación, clasificación y recuento de las moscas es preciso anestesiarlas previamente con éter, a esta operación se le denomina “eterificación” o “eterización”. Se procede de la siguiente forma:

1. Golpear la botella de cultivo sobre una almohadilla de algodón, papel, corcho o goma-espuma para que caigan las moscas al fondo del medio de cultivo.

2. Quitar el tapón de la botella, y en su lugar colocar el eterificador. Invertir las posiciones de modo que la botella de cultivo quede arriba.

3. Sacudir los lados de la botella de modo que todas las moscas caigan dentro del frasco eterificador. Tapar el frasco.

4. Mantener las moscas expuestas a los vapores del éter hasta que se duerman. El tiempo que tardan las moscas en dormirse es variable y depende de la edad (alrededor de un minuto). Hay que tener cuidado pues una exposición prolongada al éter puede producir su muerte, lo que se notará porque las alas aparecerán perpendiculares al cuerpo.

5. Una vez anestesiadas, sacar las moscas y alinearlas sobre una cartulina blanca y llevarlas a la lupa binocular para su observación.

Tener en cuenta:

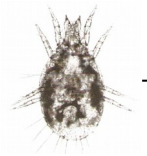
- Normalmente una mosca anestesiada permanece inmóvil durante 5 ó 10 minutos. Si empiezan a moverse mientras se las está observando se pueden volver a anestesiar utilizando el reeterificador, pulverizando suavemente con éter en la cámara formada por una placa petri invertida colocada sobre las moscas, o bien adosando un pequeño algodón impregnado de éter en la cara interna de la placa.
- Para mover las moscas de un lado a otro se utiliza un pincel fino con el que se puedan empujar y trasladar.
- Una vez finalizada la observación, si hay que pasar las moscas a la botella con el medio de cultivo, se colocarán dentro de un pequeño cucurucho de papel que se depositará sobre la papilla, o tumbar la botella y colocar las moscas sobre su pared hasta que se despierten (hay que tener cuidado de que la pared esté seca). Si se han de desechar las moscas, introducirlas en el frasco “cementerio”.
- No mantener abiertas las botellas de cultivo para evitar que las moscas se escapen o entren otras y el cultivo se contamine

- No dejar abierto el eterificador ni la botella de éter, ya que el éter es muy volátil e inflamable

¡¡PRECAUCIONES!!

⚠ Las botellas con moscas deberán permanecer siempre con el tapón puesto para evitar que se contaminen con otras moscas en "vuelo libre"

⚠ Mantener el puesto de trabajo y el material utilizado limpios para evitar contaminaciones por ácaros



→ Ácaro

⚠ Mantener el laboratorio ventilado para evitar la acumulación de los vapores de éter, ya que puede producir dolores de cabeza

⚠ No encender mecheros ya que el éter es muy inflamable

CUESTIONARIO 1

Nombre y Apellidos: _____

_____

_____

_____

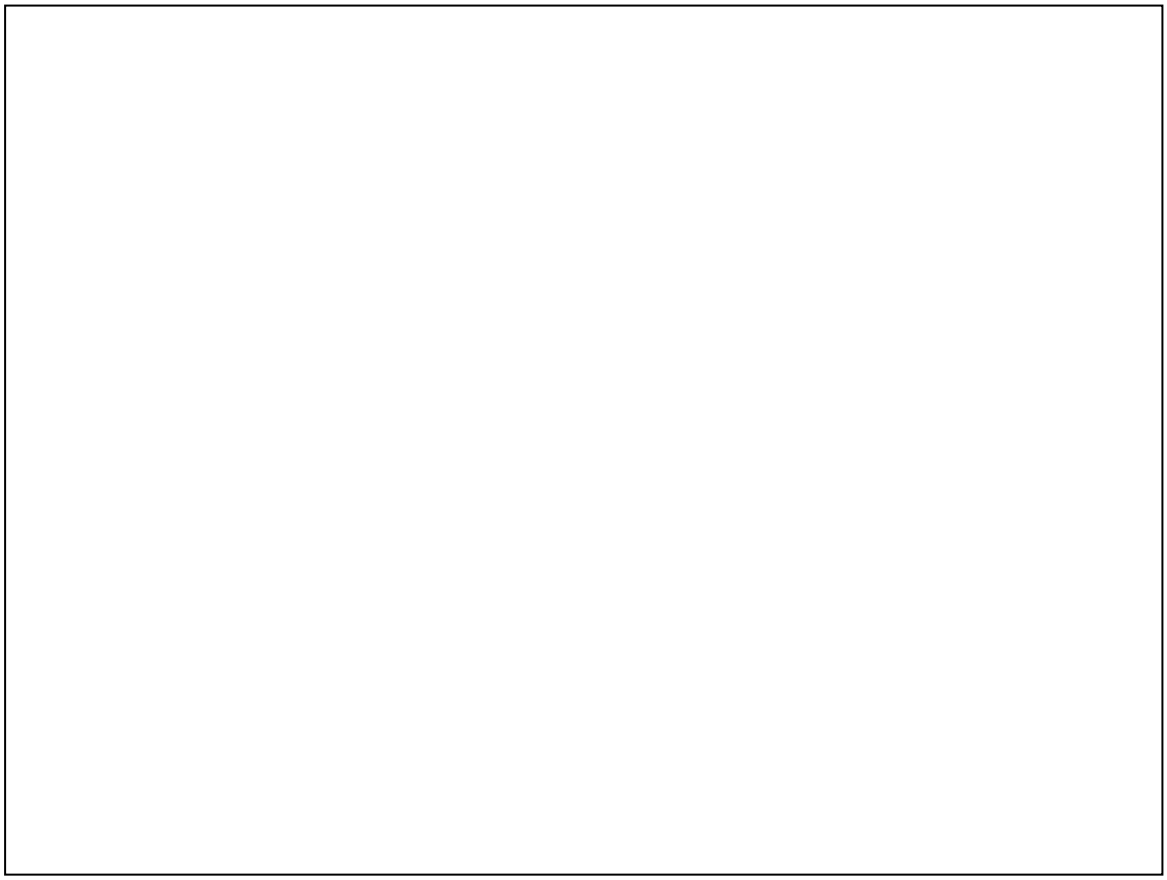
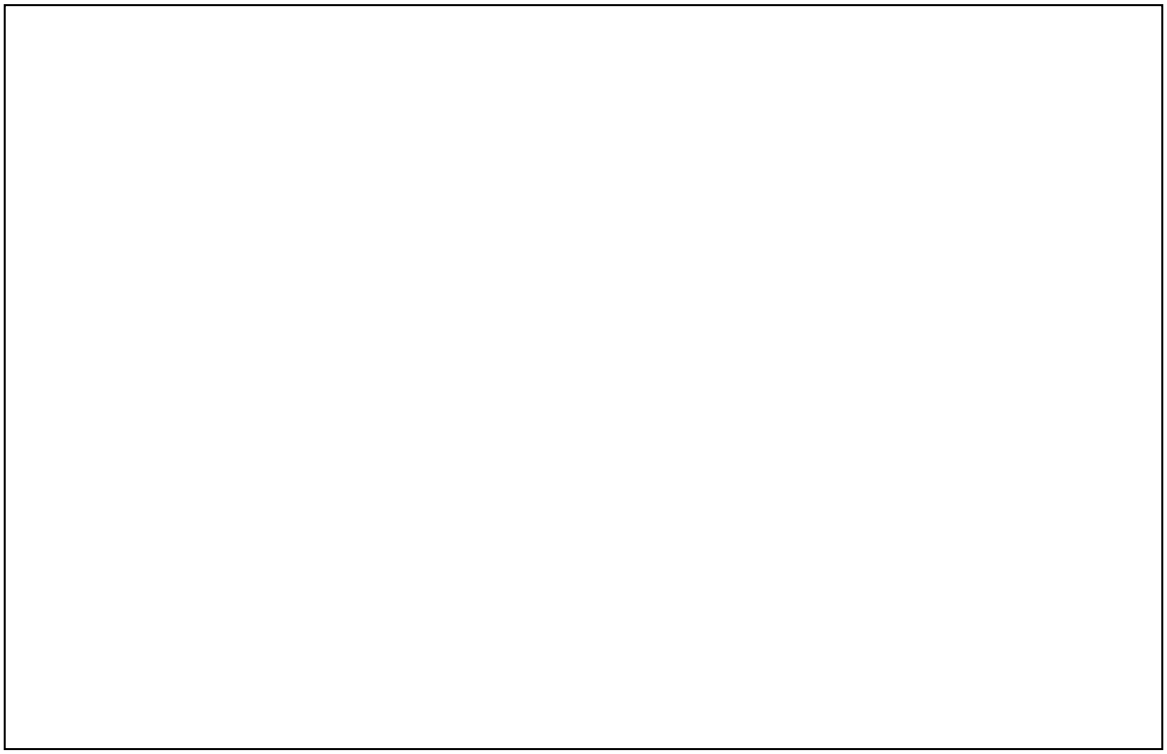
Para realizar la práctica, primero es conveniente familiarizarse con el **ciclo biológco** de *Drosophila melanogaster*, describiendo las distintas etapas que se observen. Además también manipularemos experimentalmente el **fenotipo silvestre** de *Drosophila melanogaster* y *Drosophila virilis*, normal para todos sus caracteres, por lo que habrá que describir las partes del cuerpo que se mencionan abajo, diferenciando si se trata de machos ó hembras en el caso de *D. melanogaster*.

Los caracteres de las partes del cuerpo de *Drosophila* que habrá que tener en cuenta son los siguientes:

-Alas: Describir la longitud de las alas y si sobrepasan del abdomen y cuánto. Tipo de borde, si es redondeado o no, y cómo es la terminación. Tipo de superficie (si es plana o no) y color.
-Cuerpo: Describir el color.
-Ojos: Describir la textura de la superficie de los ojos, si es mate o no, color, tamaño y forma
-Tamaño del adulto: Según el tamaño el cuerpo se puede determinar si se trata de machos o hembras de *D. melanogaster*

1. Observación de la morfología de las diferentes etapas del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Anotar las observaciones

2. Anotar la descripción del tipo silvestre de *D. melanogaster*, distinguiendo entre machos y hembras (citar las diferencias)



3. Anotar la descripción del tipo silvestre de *D. virilis*