

Drosophila melanogaster
Morfologia i manteniment



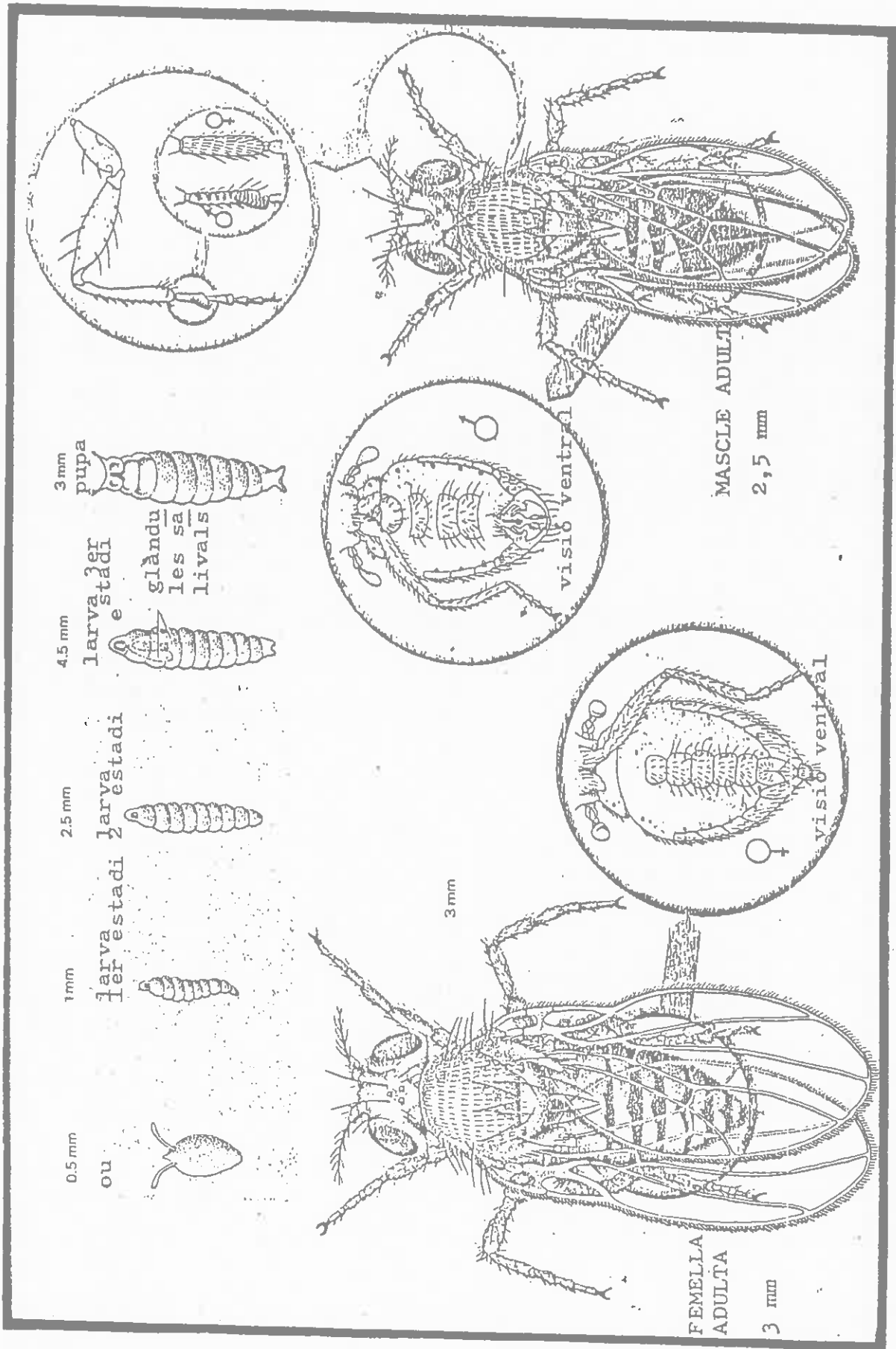
Autors: Josep Cuello
Montserrat Falcó
Olga Moreno
Àngel Rubio

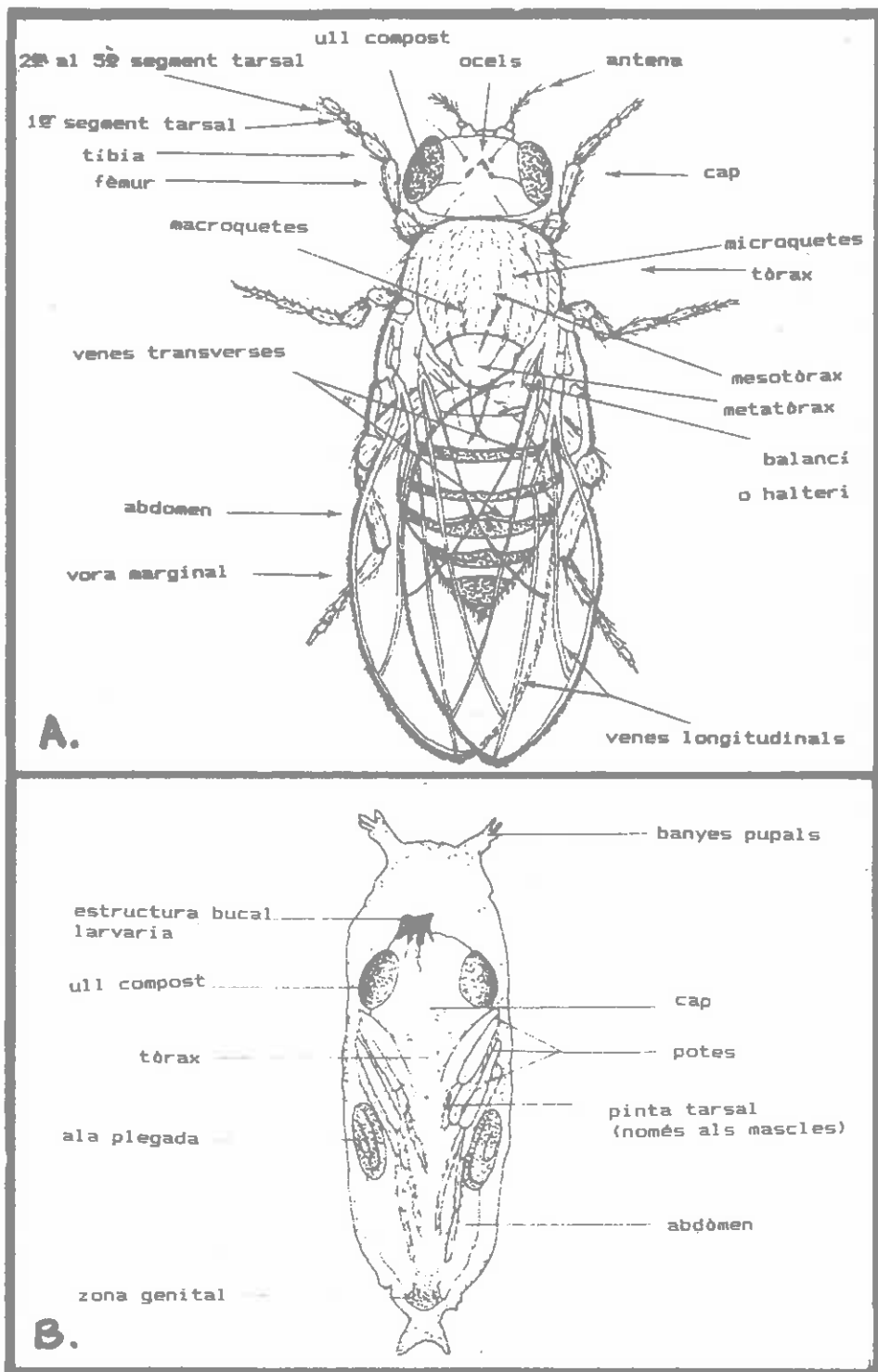
 Generalitat de Catalunya
Departament d'Ensenyament
Direcció General
d'Ordenació Educativa
Centre de Documentació
i Experimentació de Ciències

Pg. de la Vall d'Hebron, 64-70
08023 BARCELONA
Tel. 417.68.75/417 67 70

INDEX

	pag.
Morfologia.....	1
Identificació de sexes.....	3
Fases del cicle vital.....	4
Temps de desenvolupament de les diferents fases.....	5
Manipulació i tècniques d'eterització.....	7
Mutants del C.D.E. Ciències.....	13
Localització cromosòmica dels mutants.....	14
Mutants aconsellables per diferents encreuaments....	15
Medis de cultiu.....	17
Adreces útils.....	19
Bibliografia.....	20





A. Morfologia externa d'una femella de Drosophila melanogaster.

B. Estructura de la pupa.

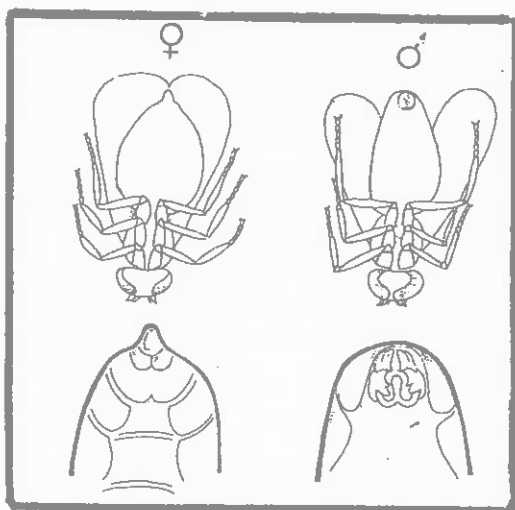
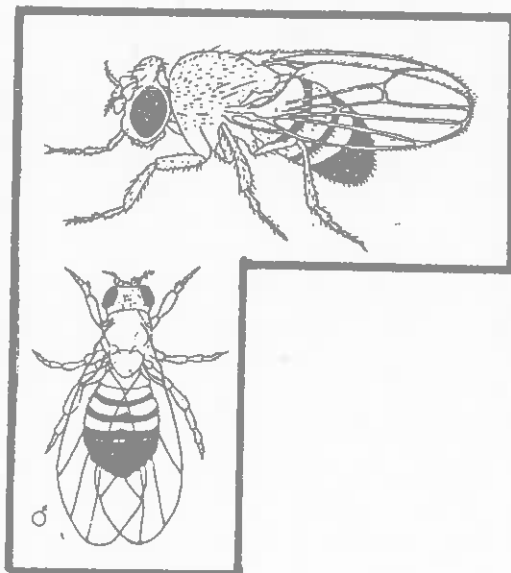
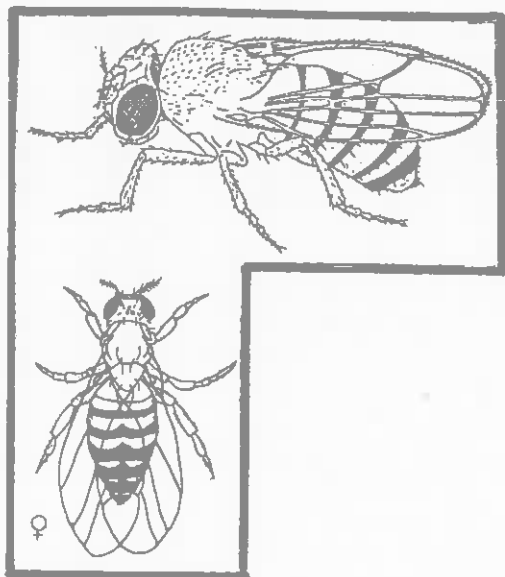
Pel que fa a la identificació dels sexes els criteris diferencials són:

Fase larvària: Els testicles dels mascles són molt més grans que els ovaris de les femelles; al binocular, per transparència, és fàcil d'observar aquesta diferència al tercer estadi larvari.

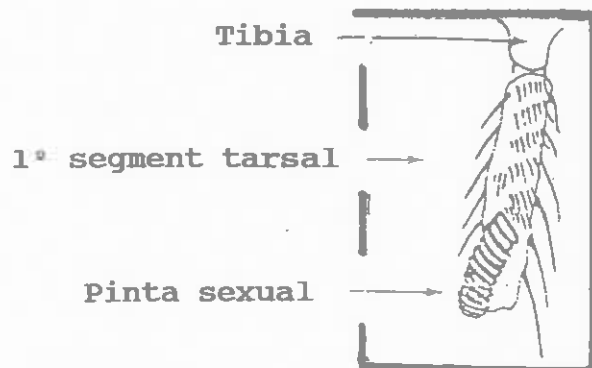
Fase de pupa: Per transparència, a través de la coberta de la pupa es pot veure la presència de les pintes sexuals (només als mascles), una a cada primer artell del tars del primer parell de potes. Pel diagnòstic s'han d'utilitzar pupes madures (pigmentades) observades per la seva cara ventral.

Fase d'imago: Les diferències entre mascles i femelles adults, són vàries, entre elles:

La pigmentació de la part distal de l'abdomen (cara dorsal) és contínua -una taca fosca que s'estén sobre els últims segments abdominals- al mascle, i discontinua a la femella, formada per anells foscos que alternen amb bandes clares.



ARCS GENITALS DIFERENCIATS EN EL ♂



MORFOLOGIA EXTERNA DEL 1º SEGMENT TARSAL EN UN ♂ DE DROSOFILA.



FASES DEL CICLE VITAL DE DROSOPHILA (x 7).

A. OU

Els ous són posats sobre el medi de cultiu en grups. Les dos banyetes primes que sobresurten de l'ou actuen com a "flotadors" per evitar que l'ou es submergeixi en un medi líquid. Això, però, és molt difícil de veure a través del flascó, pràcticament impossible. Caldria preparar petits recipients amb poc medi, per tal de facilitar l'observació.

B-F. LARVES

Fan galeries al medi de cultiu del qual s'alimenten. La larva va creixent i ha de mudar ja que la pell externa no s'estira. En el desenvolupament de les drosòfiles hi ha tres mudes. El període entre mudes s'anomena fase nimfal. Les larves es poden observar en el seu moviment per dins el medi, ja que es veu l'estructura bucal que és de color negre. Això moltes vegades es confon amb un parell d'ulls. I també s'observen quan pugen pel paper de filtre amb forma de zig-zag que posem dins el flascó.

F. Es la fase en que la larva es transforma en pupa.

G. PUPES

Aquesta pupa està completament formada. Al seu interior es destrueixen els teixits de la larva i, a partir d'alguns d'ells es construeixen els nous òrgans i teixits de l'adult. Les pupes resten enganxades al paper zig-zag fins que, passat el temps necessari sortirà l'adult.

El cicle vital de Drosophila serà més llarg o més curt depenent en gran mesura de la temperatura. Nosaltres ho hem investigat a 23°C, però altres estudis ens mostren que, per exemple a 25°C, el cicle és d'uns 10 dies aproximadament.

GUIA DE DESENVOLUPAMENT DE DROSOPHILA MELANOGASTER A 25°C

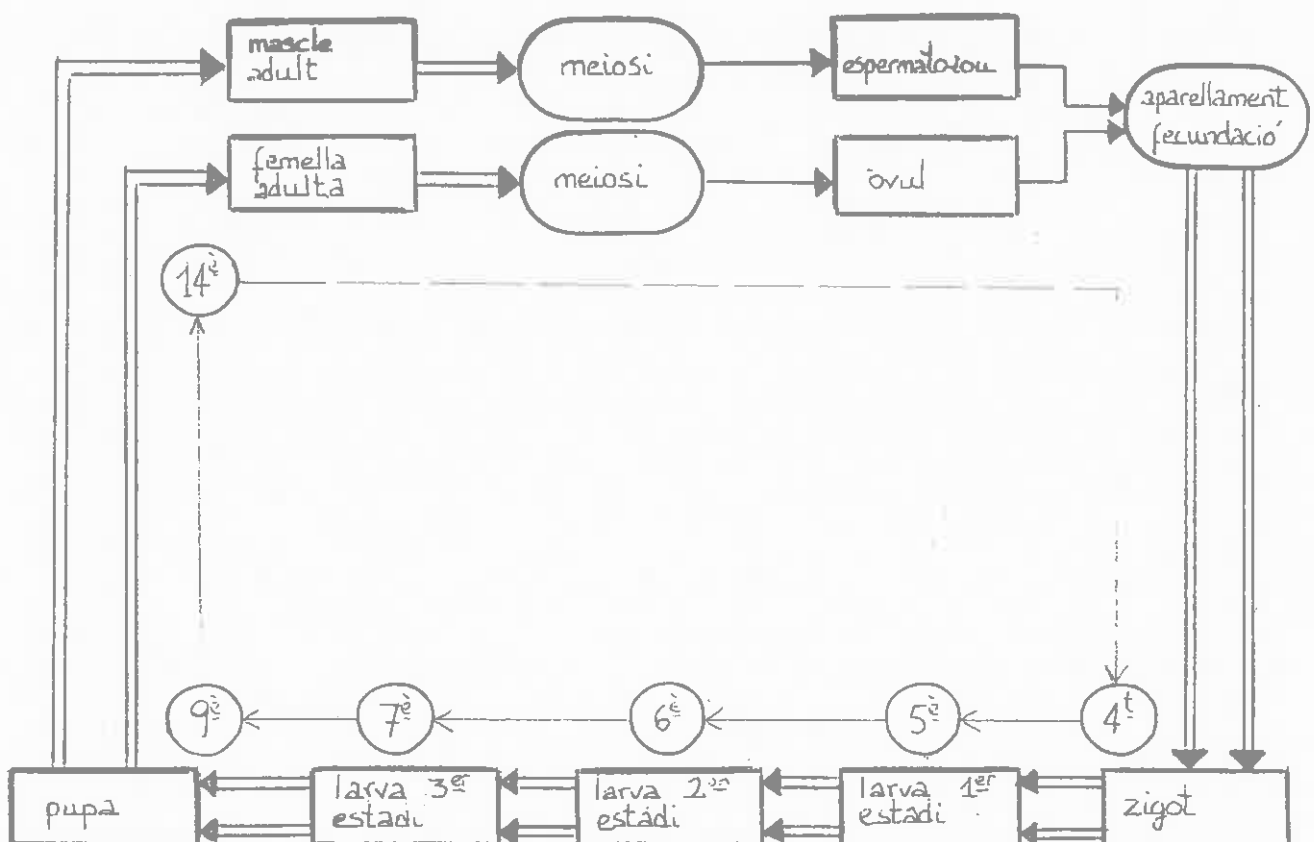
HORES	DIES	FASE
0	0	Posta d'ous
0-22	0-1	Embrió
22	1	Sortida d'ous (primera fase)
47	2	Primera muda (segona fase)
70	3	Segona muda (tercera fase)
118	5	Formació del pupari
122	5	Muda "prepupal" (quarta fase)
130	5½	Pupa: eversió del cap, les ales i les potes.
167	7	Pigmentació ulls de la pupa.
214	9-10	Els adults surten del pupari (en aquest moment és difícil distingir les ales vestigials de les normals)
215	9-10	Ales desplegadas de mida normal.

(Segons Strickberger, M.W.)

TEMPS APROXIMAT DE DESENVOLUPAMENT DE DROSOPHILA MELANOGASTER A 23°C (Segons el C.D.E. Ciències).

<u>Hores</u>	<u>Dies</u>	<u>Fase</u>
0	0	Posta d'ous.
48	2	Larves petites, visibles amb dificultat.
96	4	Larves mitjanes ja ben visibles.
168	7	Larves molt grosses i potser alguna pupa.
182	8	Vàries pupes enganxades al paper.
240	10	Ja apareix algun adult.

Com bé diem, aquest control és aproximat però, comparat amb la guia segons Strickberger, es comprova que la variació de dos graus centígrads de temperatura, ja afecta a la velocitat de desenvolupament de les drosòfiles.



MANIPULACIO DE LES MOSQUES. (Generalitats).

Per passar mosques d'una soca pura d'un flascó a un altre o per recollir les mosques d'un flascó en un eteritzador, n'hi ha prou amb encarar dos flascons del mateix diàmetre de boca i, d'un cop sec però no massa fort, fer caure les mosques d'un flascó a l'altre.

Però si hom ha de posar mosques eteritzades en un flascó, cal posar-les primer en una paperineta i, dins d'aquesta, ficar-les al flascó: així no hi ha perill que quedin enganxades a la massa del medi.

Per manipular mosques eteritzades convé fer servir un pinzell fi (del 0).

TECNQUES D'ETERITZACIO

Hi ha dos maneres d'eteritzar les mosques d'un flascó. En farem una breu descripció d'ambdues, tot i que al C.D.E. Ciències només n'utilitzem una que pensem que és la més pràctica i senzilla.

A- Tècnica del tap de cotó fluix.

Tenim les drosòfiles al seu flascó, que en aquest cas porta un tap d'espuma de la mida de la boca. Per tal d'anestesiari-les, construïm un nou tap amb una bola de cotó fluix que emboliquem en una gassa. Cargolem els quatre extrems d'aquesta de manera que puguem agafar aquest nou tap amb facilitat.

Seguidament saturem amb èter el cotó i tapem una ampolla buida. Donem uns quants cops a la base del flascó on hi ha les mosques (és preferible picar sobre una superfície tova que no pugui trencar el vidre, per exemple sobre suro), de manera que aquestes caiguin al fons.

Destapem l'ampolla de les mosques i la de l'èter i, molt ràpidament, invertim la de les drosòfiles sobre la de l'anestèsia, procurant que les boques coincideixin perfectament per que no se'ns escapi cap mosca.

Colpegem el flascó de les mosques fins que totes hagin caigut al de l'anestèsia. No és aconsellable picar massa fort ja que es podria desprendre el medi de cultiu i caure al damunt de les mosques, les quals hi quedarien enganxades.

Separem les ampolles i les tapem immediatament.

Les mosques acostumen a dormir-se de seguida i, per tant, no convé tenir el tap amb èter massa estona ja que poden morir. Una vegada totes estiguin anestesiades, podem treure-les del flascó i manipular-les com sigui necessari segons l'experiment que vulguem fer.

B- Tècnica de l'eteritzador.

Degut a que al C.D.E de Ciències no fem servir aquesta tècnica, tampoc no disposem d'eteritzadors. De totes maneres explicarem una mica de què es tracta.

Un eteritzador consta del següent: un tub amb el fons pla, un tap de suro foradat pel mig, on hi ha fixat un embut i un tap pel tub de vidre. A l'extrem de l'embut que queda dins el tub, hi ha enganxat un tros de cotó fluix, i és aquí on afegim unes quantes gotes d'èter, de manera que quedi ben amarat però que no escorri líquid. (Cal anar amb compte amb aquesta substància perquè és un fort anestèsic i molt inflamable).

Igual que en la tècnica anterior, ara donem uns copets a la base del flascó on tenim les mosques, de manera que caigui al fons. Destapem aquesta ampolla i, ràpidament situem la boca del flascó sobre l'embut de l'eteritzador. Si tot això ho ha de fer una sola persona, seria convenient que abans practiquéssim una mica, per evitar que se'ns escapin les drosòfiles.

Tan aviat hagin sortit totes les mosques del flascó de cultiu (ens podem ajudar amb uns lleugers copets a la base d'aquest quan està cap per avall), i estiguin immòbils al tub de l'eteritzador, traiem l'embut i hi posem el tap.

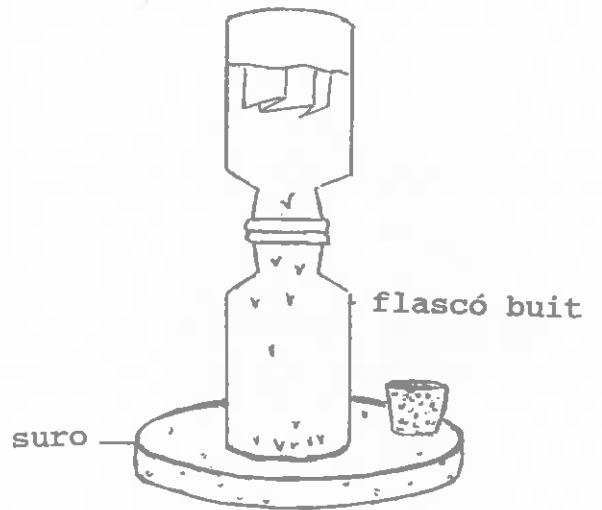
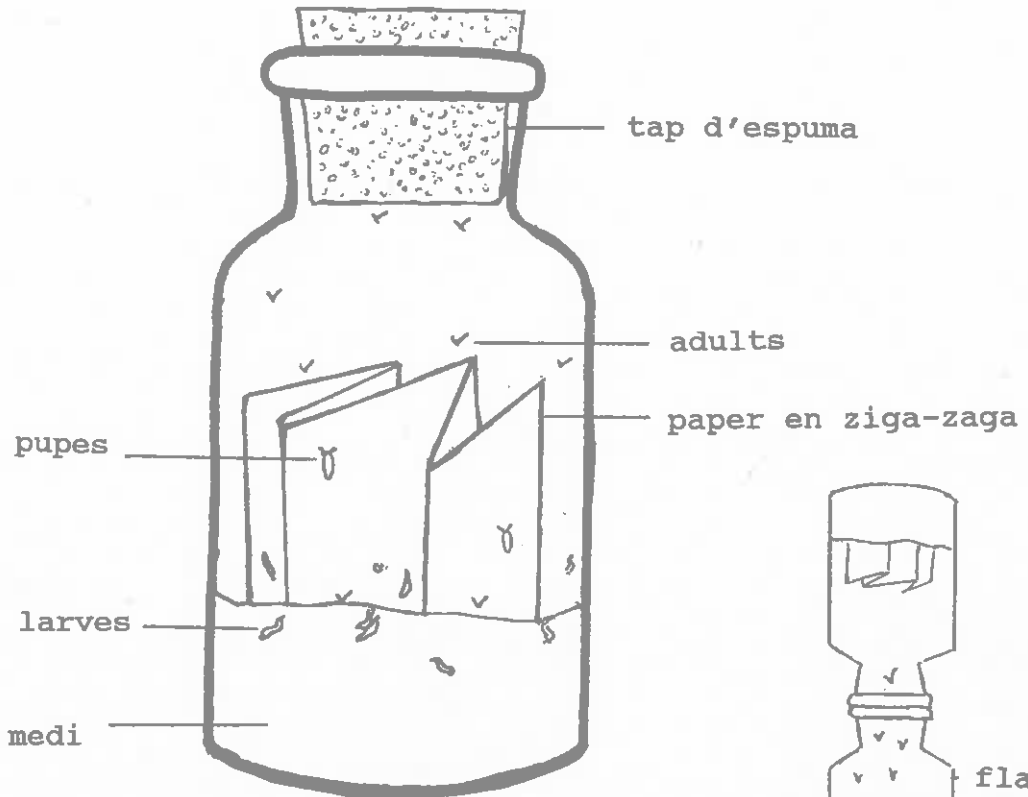
Ara ja podem utilitzar-les com ens calgui.

Són moltes les coses que podem fer amb les drosòfiles: encreuaments, observació morfològica, separació de femelles verges, etc.

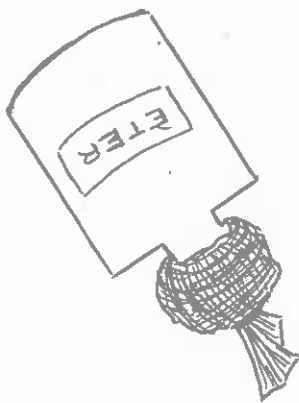
MANIPULACIO DE LES MOSQUES. SUGGERIMENTS I PRECAUCIONS PELS ENCREUAMENTS

- El primer que cal tenir en compte a l'hora de fer encreuaments, és el nombre de flascons amb papilla que necessitarem. Això dependrà del tipus de pràctica que vulguem fer.
- Quan ja tingueu larves al flascó, retireu-ne tots els progenitors.
- Les femelles fecundades comencen a posar ous uns dos dies després de sortir de la pupa (si prèviament no se les ha aïllat dels mascles).
- Per tant, per obtenir una F2, cal retirar les mosques de la F1 del flascó on són i passar-les a un de nou, abans de dos dies de sortides de la pupa per tal de que no ponguin ous al flascó de la F1.
- En altres cassos ens pot interessar, per exemple, fer un encreuament retrògrad. Llavors caldrà separar les noves mosques femelles dels mascles abans de que hagin copulat, això és, abans de les 6-8 hores després d'haver sortit de la pupa. (Veure explicació més detallada en l'apartat següent).

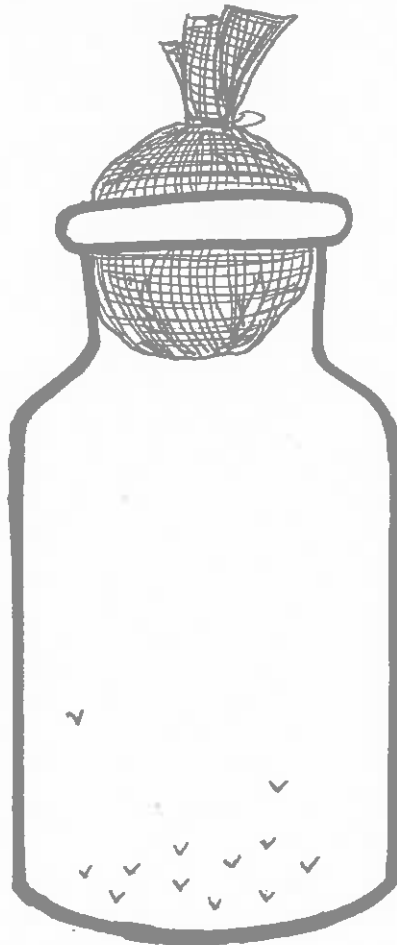
1. FLASCO AMB DROSOPHILA (3 ESTADIS).



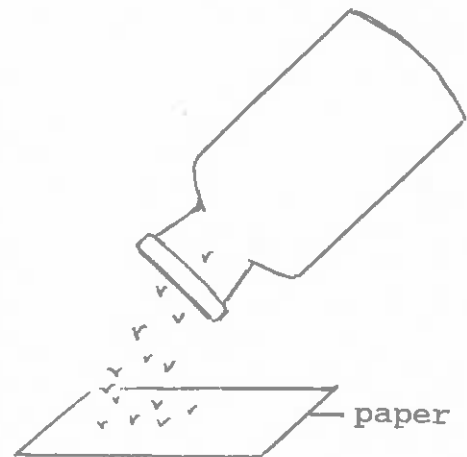
2. COLPEJAR SUAUMENT SOBRE EL SURO.



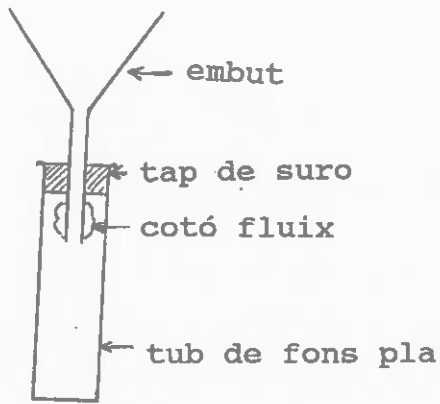
3. MULLAR UN TAP DE COTO FLUIX I GASA, AMB ETER.



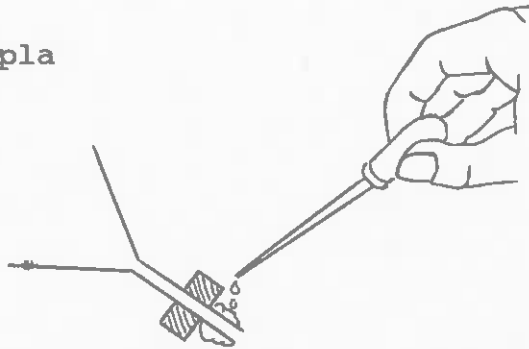
4. FLASCO ON S'ETERITZEN LES MOSQUES.



5. ABOCAR LES MOSQUES SOBRE EL PAPER PER A COMPTAR-LES.

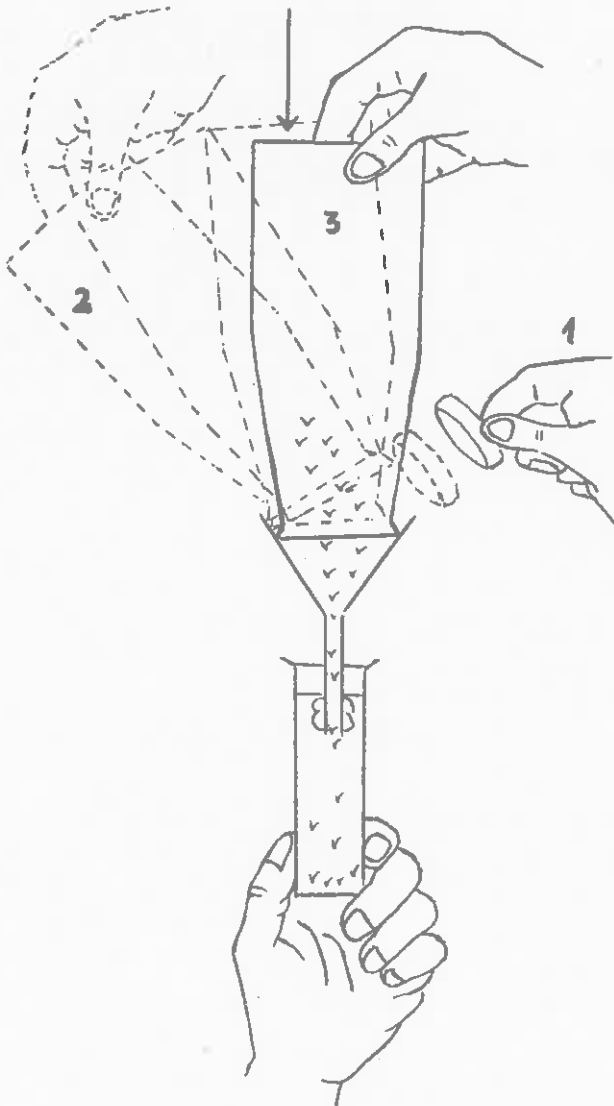


eteritzador

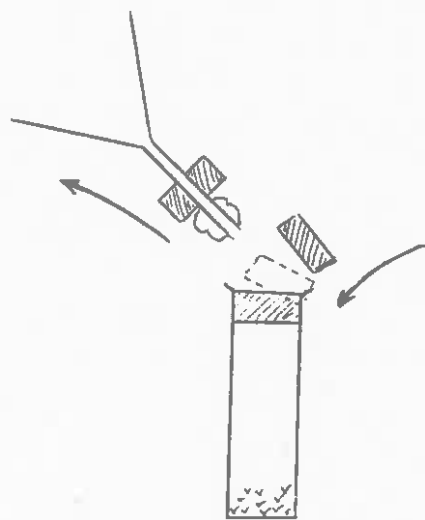


posició final del
flascó de cultiu

com posar èter al cotó
fluix de l'eteritzador



com posar les mosques
a l'eteritzador



com treure l'embut
de l'eteritzador

OBTENCIO DE FEMELLES VERGES.

En primer lloc, per a portat millor el control en aquest procés cal tenir en compte una sèrie de coses:

a) Una temperatura cap els 17° C, que farà més lent el desenvolupament. (Cap els 25° C s'accelera, i cap els 30° C es provoca l'esterilitat).

b) Al començament neixen més pupes femenines que masculines: com a norma general, les femelles tenen un desenvolupament més ràpid que els mascles.

c) Les mosques joves són més allargades, poc pigmentades (quasi blanques) i amb les ales plegades. Les adultes són més robustes, pigmentades i amb les ales normals.

d) Per a confirmar si són mascles o femelles cal observar les pintes sexuals o bé la coloració dels arcs genitals, totes dues coses existents als mascles però no a les femelles.

Procediment.

Aproximadament cap a les 8 hores d'haver nascut, les femelles són ja fèrtils. Per tant, si en volem obtenir de verges, caldrà que les separem dels mascles abans d'aquest temps, (o com a molt al cap de 9-10 hores). Si estem treballant a l'escola, un procediment adequat seria el següent:

Quan arribem a les 9h. del matí, separem els adults. A l'hora de dinar fem una altra recollida d'adults, i cap a les 5h. de la tarda, abans de marxar, separem les femelles dels mascles, amb la certesa de que encara són verges. El procediment cal repetir-lo durant alguns dies o bé, si és convenient, fins que tot el cultiu hagi nascut.

OBSERVACIO I SEPARACIO DE LES MOSQUES

Per a fer encreuaments amb drosòfila, convé tenir una organització acurada del treball. En primer lloc, cal que tot el que s'utilitzi en el maneig de les mosques estigui ben net, per tal d'evitar contaminacions.

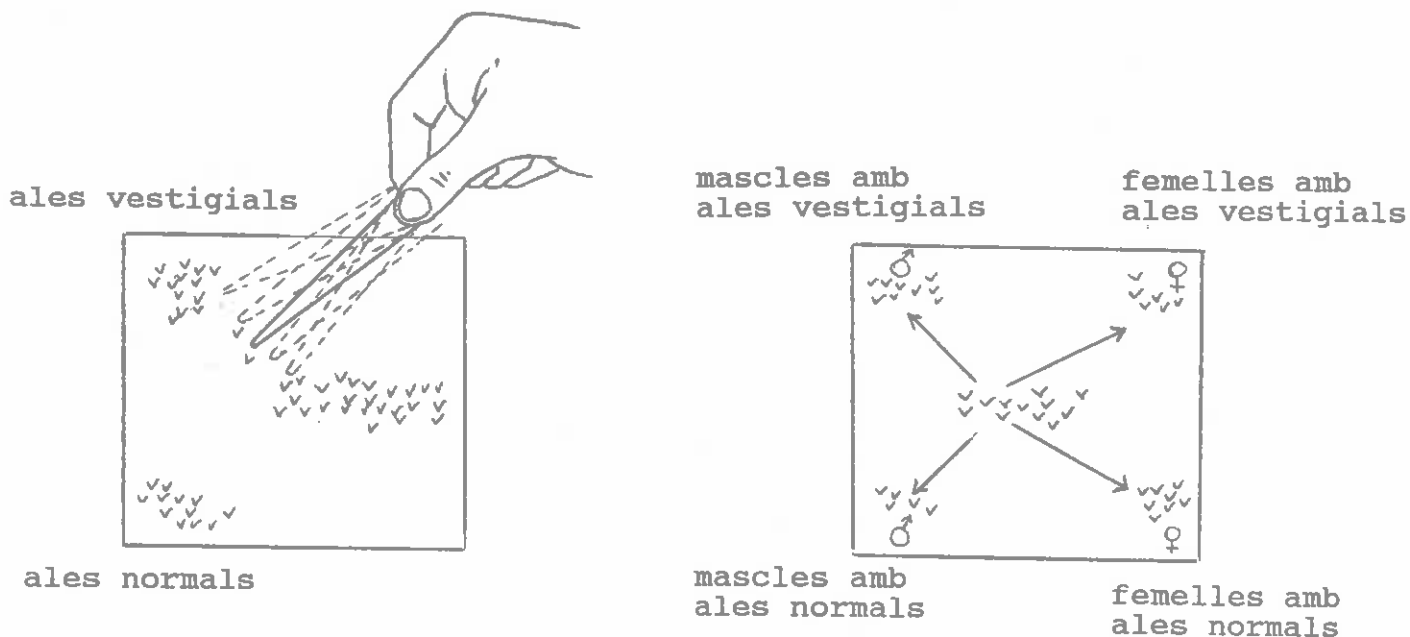
Per a comptar-les, el més pràctic és col·locar les mosques anestesiades al damunt d'un paper blanc, i amb el pinzellet les separem segons les característiques que ens interessin, per exemple, mascles i femelles, ales vestigials i ales normals, etc.

Podem dibuixar una línia recta al paper, i posar les d'un tipus a un costat i les de l'altre al costat oposat. Ara ja les podem comptar amb facilitat.

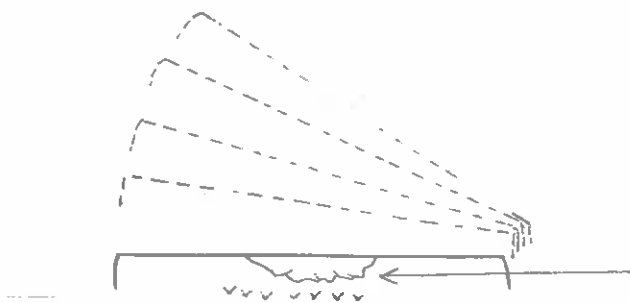
Si hem de comptar i separar segons quatre característiques diferents podem utilitzar el que s'anomena taula de 2 x 2: a cada marge del paper hi situarem les mosques d'una característica determinada. (Veure figures).

Es possible que en el transcurs d'aquestes operacions, se'ns desperti alguna mosca. Per això, és recomanable tenir preparat un eteritzador d'emergència, que pot consistir simplement en una càpsula de Petri amb un tros de cotó fluix enganxat i mullat amb èter. Aquesta càpsula la posarem damunt les mosques que s'estiguin despertant, fins que tornin a quedar immòbils.

Les drosòfiles restes eteritzades generalment uns 7 minuts.



utilització del mètode 2 x 2 per a separar quatre caràcters



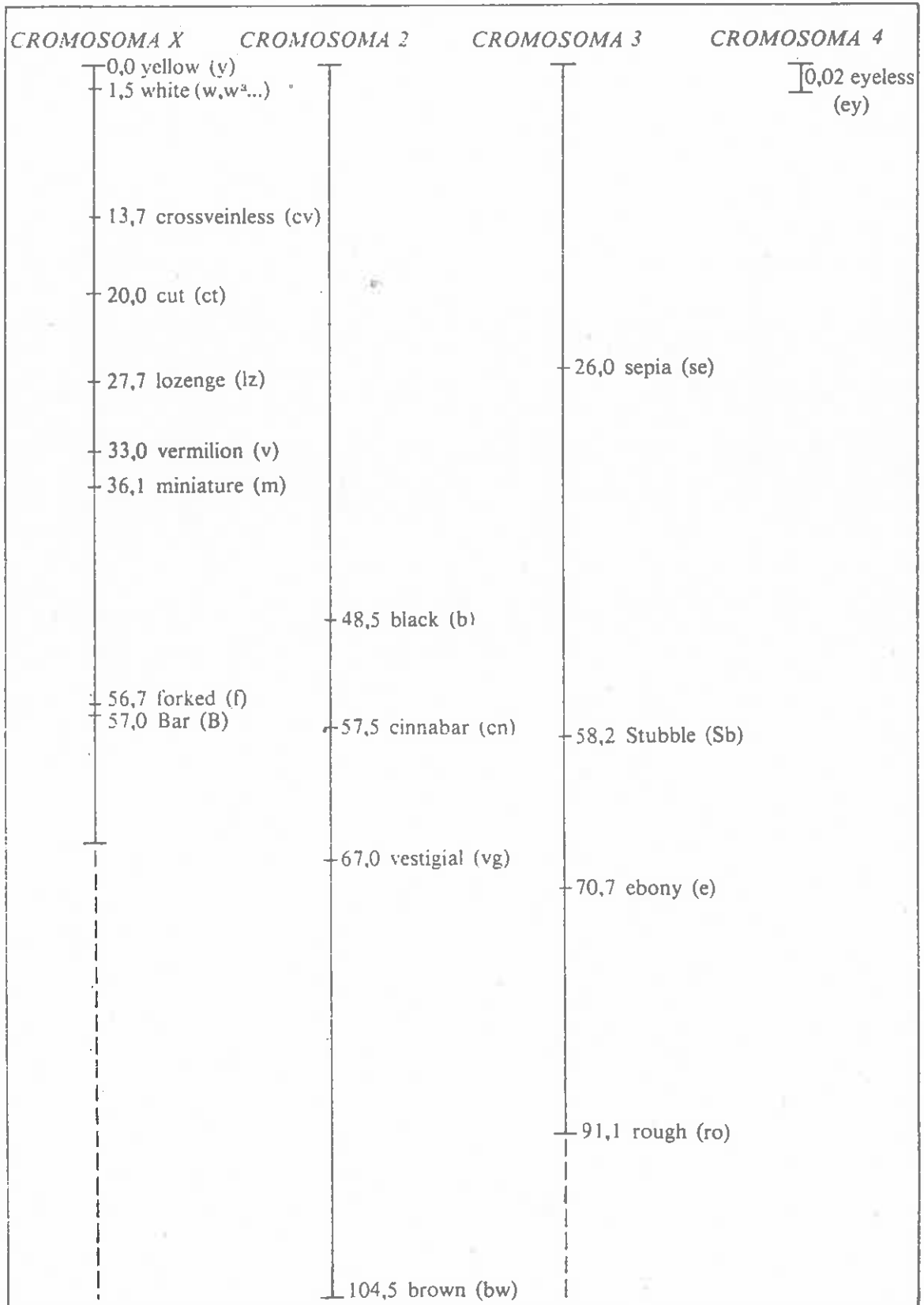
eteritzador d'emergència

cotó fluix amb èter

DROSOPHILA MELANOGASTER. La relació de soques mutants de que disposa el C.D.E. Ciències és la següent:

- 1- Drosophila melanogaster "salvatge" o tipus silvestre.
- 2- Drosophila melanogaster "yellow" (y) (I,0,I). Cos, quetes i venes alars de color groc.
- 3- Drosophila melanogaster "white" (w) (I,I,5). Ulls de color blanc.
- 4- Drosophila melanogaster "white apricot" (w^a) (I,I,5). Ulls de color ataronjat.
- 5- Drosophila melanogaster "brown" (bw) (II,104,5). Ulls de color més fosc, de color de vi en les mosques més joves i púrpura en les de més edat. En combinació amb "cinnabar"(cn) i "vermilion" (v) interacciona i produeix un fenotip d'ulls blancs.
- 6- Drosophila melanogaster "sepia" (se) (III,26,0). Ulls de color sèpia.
- 7- Drosophila melanogaster "ebony" (e) (III,70,7). Cos fosc, progressivament més pigmentat amb l'edat de la mosca.
- 8- Drosophila melanogaster "spap1" (sp) (IV,0,05). Ulls més petits i de superfície rugosa i irregular.

LOCALITZACIO CROMOSOMICA DELS MUTANTS.



Mutants de Drosophila melanogaster aconsellables per a:

- MONOHIBRIDISME

NORMAL amb qualsevol dels següents:

SEPIA o bé

EBONY o bé

ROUGH o bé

EYELESS o bé

SPAPOL.

- DIHIBRIDISME

Cadascuna de les següents parelles de soques:

EYELESS x EBONY

EYELESS (o bé SPAPOL) x BLACK

- LLIGAT AL SEXE

NORMAL amb qualsevol dels següents:

YELLOW o bé

WHITE o bé

WHITE APRICOT o bé

MINIATURE.

- INTERACCIO

CINNABAR x BROWN

- AL.LELIFORMISME MULTIPLE

WHITE x WHITE APRICOT

- DIHIBRIDISME AMB UN DELS DOS GENS LIGAT AL SEXE

Cadascuna de les següents parelles:

YELLOW x EBONY o bé

YELLOW x SEPIA o bé

MINIATURE x SEPIA.

- GENS LETALS

NORMAL x STUBBLE-ULTRABHITORAX

- GENS LIGATS

Distància aproximada d'1 centimorgan.

YELLOW x WHITE (ambdós lligats al sexe).

Distància aproximada de 10 centimorgans.

BLACK x CINNABAR o bé

WHITE x CROSSVENINLESS (ambdós lligats al sexe).

Distància aproximada de 20 centimorgans.

EBONY x ROUGH

- INTERACCIO EN GENS LIGATS

BROWN x CINNABAR (gairebé, però, a 50 cm.).

MEDI DE CULTIU N° 1 PER A DROSOPHILA MELANOGASTER.

Recepta facilitada pel Departament de Genètica de la facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

flascons	10
agar-agar	5,6 grams
sucres	1 cullerada
aigua	375 cm ³
<hr/>	
farina de blat de moro.	91 grams
aigua	250 cm ³
nipagin	0,9 grams
alcohol etílic	10,3 cm ³

PREPARACIO

1. Desfeu l'agar-agar i el sucre en els 375 cm³ d'aigua, escalfant fins que bulli, evitant la formació de grumolls.
2. Quan bulli, afegiu-hi la farina de blat de moro prèviament desfeta en els 250 cm³ d'aigua i deixeu-ho coure tot durant 10-15 minuts. Cal remenar per evitar l'agrumollament.
3. Retireu-ho del foc, afegiu-hi el nipagin dissolt en alcohol. Remeneu i poseu el medi en els flascons abans que arribi a quallar.
4. Quan estigui fred i calgui fer servir els flascons, eixugueu la humitat que pugui haver-hi, introduïu-hi una tira de paper plegat fent ziga-zaga (per a que puguin enfilar-s'hi les larves per passar a pupes) i una mica de llevat esmicolat.

MEDI DE CULTIU N° 2 PER A DROSOPHILA MELANOGASTER.

Recepta facilitada pel Departament de Genètica de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

flascons	10
agar-agar	2,5 grams
sal comú	0,5 grams
aigua	200 cm ³
<hr/>	
llevat fresc	30 grams
aigua	100 cm ³
<hr/>	
farina de blat de moro	50 grams
aigua	175 cm ³
<hr/>	
nipagin	0.63 grams
alcohol	5 cm ³
àc. propiònic	0,63 cm ³

PREPARACIO

1. 25 grams d'agar-agar i 0,5 grams de sal comú en 200 cm³ d'aigua. 30 grams de llevat fresc en 100 cm³ d'aigua. Poseu-ho al foc i deixeu-ho bullir 20 minuts.
2. 50 grams de farina de blat de moro en 175 cm³ d'aigua. Deixeu-ho coure durant uns 10 minuts.
3. Retireu-ho del foc i afegiu-hi 0.63 grams de nipagin en 5 cm³ d'alcohol i 0,63 cm³ d'àcid propiònic.

ADRECES UTILS

Actualment els diferents productes i estris per al cultiu de les drosòfiles poden aconseguir-se, entre d'altres establiments, en els següents:

- flascons de cultiu: Torrero i Mas.
c/ Entença 58 Tf. 423 95 10
- taps: Servicio Estación (els tallen a mida)
c/ Aragó 270 Tf. 216 02 12
També poden ésser substituïts per cotó fluix.
- nipagin: Lemmel.
Avgda. Diagonal 309 Tf. 258 22 05 (i també Escuder).
Torrero i Mas.
- farina de blat de moro. Nosaltres ho comprem en una botiga del carrer del Comerç, però se'n pot trobar en qualsevol altre magatzem del ram.
- agar-agar. Magatzems de productes químics i, fins i tot, distribuïdors de productes dietètics.
Actualment ho comprem a EDOSA, carrer Villarroel n. 184. Tf. 430 74 04.
- llevat. Cal emprar llevat fresc, que es pot encarregar al forn de pa.
- àcid propiònic. Torrero i Mas o altre distribuïdors de productes químics.

BIBLIOGRAFIA PER A LES PRACTIQUES AMB DROSOFILA

- NELSON I LATINA, Conceptos fundamentales de Biología.- Manual de laboratorio. Ed. Limusa. 1977. 2ª ed. pp. 133-137. Dibuix de les glàndules salivals i de les diferències de coloració segons el sexe.
- PROGRAMA NUFFIELD DE BIOLOGIA, Text V i Guía del Profesor V, pp. 15-19 i 20-26 respectivament. Ed. Omega, Barcelona. 1972. Descriu la forma de procedir, ofereix tota mena d'informacions i dibuixos.
- CUELLO, J. i altres, Prácticas de Biología, pp. 147-187 i 13-15. Ed. Fontalba. Barcelona. 1978. Ofereix un resum de les informacions més rellevants referents a drosòfila. Principals pràctiques possibles i models per a disposar les dades obtingudes. Bibliografia.
- CUELLO, J. Didáctica de la Genética, pp. 85-89. ICE Universitat de Barcelona. Col.lecció Documents A-63. Barcelona, 1983. La informació sobre drosòfila és només una part, i resumida de la que figura a Prácticas de Biología de Cuello i altres. Conté, però, informacions sobre moltes altres pràctiques amb organismes diversos. Bibliografia i adresses útils.
- SHORROCKS, B. Drosophila. Ginn and company limited, London. 1972. Monografia completa i breu sobre les drosòfiles.
- ESPINOS, A. Manual de laboratorio. -Genética general-, apéndice. E.T.S.de Ingenieros Agrónomos.

Cátedra de Genética, Universidad de
Valencia.
Descripció de mutants.

MONCLUS, M. Genética Ibérica. Distribución y
ecología de drosofilidos en España.
C.S.I.C. Vol.16, 1964.
Entre d'altres coses hi ha claus de
classificació de drosòfiles.

LINDSLEY, D.L. and GRELL, E.H. Genetic variations of
Drosophila melanogaster.
Carnegie Institution of Washington
Publication N. 627.
Descripció de mutants. Mapes
cromosòmics de les glàndules salivals.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

La mateixa que la recomanada.