

EL CRECIMIENTO DE LAS ESPÍCULAS DE LA CUTÍCULA LARVAL DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)

JUAN C. ARANEDA S.¹ y RAÚL GODOY-HERRERA²

RESUMEN

Se estudió el crecimiento de las espículas cuticulares de las larvas de *Drosophila melanogaster*, entre las 24 y las 96 horas de edad. No se encontró correlación entre el ritmo de crecimiento de la larva y el desarrollo de las espículas de los cinturones espiculares 3°, 7° y 11° de estos individuos. Estos hallazgos sugieren que el proceso larval de la muda, está regulado de una manera distinta que el crecimiento del cuerpo larval. Las larvas de 24 y 96 horas tienen espículas proporcionalmente más largas que las de las larvas de 48 y 72 horas de edad. Se discute que el ritmo de crecimiento espicular, está en relación con el comportamiento propio de la larva de 24, 48, 72 o de 96 horas.

ABSTRACT

The growth of spicules of cuticle in *Drosophila melanogaster* larvae was studied between 24 to 96 hours of age. Not correlation was found between the rhythm of larval internal organs and the development of spicules of the 3°, 7° and 11° spicular belts of these individuals. These findings suggest that moulting process is regulated in a different way than the growth of body size. Larvae of 24 and 96 hours have spicules proportionally longer than larvae of 48 and 72 hours of age. It is proposed that the rhythm of spicular growth is in connection with the activities of larvae of different ages.

INTRODUCCION

El movimiento de las larvas ápodas de dípteros se produce por ondas peristálticas, originadas por la contracción de las paredes musculares de la larva (Carnevali, 1978). La energía producida, se trasmite de un segmento larval a otro a través de los movimientos del líquido de los vasos linfáticos actuando como un esqueleto hidrostático (Chapman, 1975). Utilizando este mecanismo, la larva de *Drosophila melanogaster* se mueve, excava sustratos, ingiere alimento o levanta verticalmente los segmentos cefálico y torácico cuando se desplaza sobre una superficie seca (Green *et al.*, 1983).

La larva de *D. melanogaster* pasa por tres estados del desarrollo; entre un estado y otro se produce la muda que implica pérdida de la

cutícula externa primitiva y la generación de una nueva (Bodestein, 1950). Una de las diferenciaciones más notables de la cutícula, son una serie de dientecillos (espículas) ubicados en la zona ventral de la larva de *D. melanogaster*. Estas estructuras son parte del aparato locomotor de la larva; ellas actúan como punto de apoyo y transmiten parte de la energía de la contracción muscular al sustrato (Lohs-Schardin *et al.*, 1979).

A pesar del aumento en el número de estudios sobre el comportamiento larval de *D. melanogaster* (Godoy-Herrera, 1986), no existe una descripción detallada de los ritmos de crecimiento de las espículas de la cutícula larval. Este conocimiento es básico para conocer la base morfológica de algunos comportamientos de larvas de diferentes edades, como son los mecanismos de orientación y respuestas migratorias típicas que exhiben larvas de *D. melanogaster* de 24, 48, 72 y 96 horas de desarrollo (Godoy-Herrera *et al.*, 1984; Sokolowski *et al.*, 1984). Un camino razonable para explorar el desarrollo de diferenciaciones cuticulares de la larva de *D. melanogaster*, sería descri-

¹Instituto Profesional de Chillán, Departamento de Ciencias Básicas, Casilla 848, Chillán-Chile.

²Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 70061, Santiago 7, Chile.

(Recibido: 22 de julio de 1986. Aceptado: 9 de septiembre de 1986).

bir las variaciones de crecimiento de las espículas de este tegumento en la larva normal (silvestre). Esta estrategia ofrece posibilidades futuras para una disección genética de estas diferenciaciones. Trabajos relativamente recientes confirman que esto es posible (Denell *et al.*, 1981). El objetivo de esta investigación es caracterizar el ritmo de crecimiento de las espículas de diferentes regiones de la larva de *D. melanogaster* y relacionar estos cambios con el crecimiento de los órganos internos y comportamiento de estos preadultos.

MATERIALES Y METODOS

Especie y cepa utilizada

Se utilizó la cepa silvestre Oregon R-C de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830. Las moscas se criaron por cultivo masivo en botellas de 250 ml de capacidad a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, en el Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Cada botella contenía alrededor de 50 cc de medio nutritivo sólido (Burdick, 1954).

Colecta de huevos y de larvas

Hembras fecundadas de 4 a 5 días se dejaron ayunando por 3 a 4 horas. En ausencia de un sustrato apropiado las hembras retienen sus huevos, oviponiendo en gran número al encontrar alguno disponible. Después de este período de ayuno, a las hembras se les permitió oviponer sobre medio nutritivo por 4 a 5 horas. Los huevos ovipuestos se incubaron a 24°C por 24 horas. Al cabo de este período, una muestra de las larvas que eclosionaron, se utilizaron en los experimentos descritos más abajo. Las larvas restantes se incubaron por otras 24 horas, tomándose una nueva muestra al cabo de este tiempo, las larvas remanentes se criaron, respectivamente, por otras 24 ó 48 horas. Este procedimiento permitió controlar el desarrollo larval de *D. melanogaster* entre las 24 y 96 horas de edad.

Preparaciones

Grupos de 100 larvas de 24, 48, 72 o de 96 horas de edad, se mataron depositándolas en vasos de pp conteniendo agua calentada a 70°C . Una vez muertas las larvas, se cogieron individualmente con ayuda de una pipeta Pas-

teur y se depositaron, de una a una, sobre un vidrio portaobjetos. Antes de cubrirlo con un vidrio cubreobjetos, cada espécimen examinado se adicionó con una o dos gotas de xilol. Esta sustancia aumenta el detalle de las estructuras cuticulares de la larva de *D. melanogaster*. Cada preparación se colocó entre dos hojas de papel filtro, presionando fuertemente con el pulgar. Como un resultado de esta presión, se eliminaban al exterior los órganos internos de cada espécimen, pero las diferenciaciones cuticulares permanecían intactas. Cada preparación se selló con cutex y se guardó a 4°C hasta el momento de observarse.

Estructuras cuticulares

En cada larva examinada de 24, 48, 72 ó 96 horas de edad, se contó el número de cinturones de espículas comenzando por la región larval anterior (cefálica). En cada cinturón se registró el número de filas de espículas. A las espículas de los cinturones 3° , 7° y 11° (anteroposterior) se les midió el largo desde la base al extremo distal y el ancho basal máximo. Se eligieron las espículas de los cinturones 3° , 7° y 11° de la larva de *D. melanogaster* porque parecían mostrar diferencias marcadas en sus patrones de desarrollo (ver Resultados).

Para cada grupo de edad larval (24, 48, 72 y 96 horas), se examinaron 10 preparaciones y se midió, en cada una, el ancho y el largo de 10 espículas de cada uno de los cinturones 3° , 7° y 11° . Las espículas elegidas para medirlas fueron aquellas que no mostraron alguna alteración morfológica obvia, producto de la presión ejercida al hacer salir el contenido de las larvas examinadas (ver Fig. 1).



Figura 1. Esquemas de las espículas de la cutícula de la larva de 72 horas de desarrollo de *D. melanogaster* (cinturón 7°). Se aprecia la forma de estas estructuras y su disposición en filas. Esquema realizado con un aumento de 1000x.

Las mediciones se realizaron utilizando un ocular milimetrado Bausch and Lomb. Todas las observaciones se efectuaron con un microscopio de luz transmitida Nikon utilizando un aumento de 1000x.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra el largo promedio de larvas de *D. melanogaster* de 24, 48, 72 y de 96 horas de desarrollo. Entre las 24 y 72 horas, el crecimiento larval es paulatino, pero después de este último período la larva crece notablemente.

Tabla 1
LONGITUD PROMEDIO* DE LARVAS DE 24,
48, 72 Y DE 96 HORAS DE DESARROLLO
DE *D. MELANOGASTER*.
LAS LARVAS ESTUDIADAS ERAN
DE LA CEPA OREGON R-C

Tamaño (mm)	Horas de Desarrollo			
	24	48	72	96
\bar{X}	0.94	1.19	1.38	2.31
S^2	0.03	0.01	0.06	0.06

*Para cada edad se midieron 60 larvas.

Las espículas corresponden a diferenciaciones de la cutícula larval de *D. melanogaster*, son de color café-oscuro, con una inclinación antero-posterior y con una forma que recuerda a una espina de rosa (Bodenstein, 1950). La Figura 1 muestra un esquema de algunas espículas de la cutícula de la larva de *D. melanogaster* y la Figura 2 muestra un esquema de los cinturones de espículas tal como se observan después de aplastada la larva. Estas diferenciaciones cuticulares se disponen en filas. La larva de esta especie tiene 11 cinturones de espículas. El primero (1°) corresponde a la región anterior (cefálica) de la larva. Los cinturones 2°, 3° y 4° se describen como "torácicos" y del 5° al 11° se denominan "abdominales". La región más posterior de la larva (anal) posee un grupo de 15 a 21 espículas dispuestas radialmente. Cada cinturón de espículas continúa lateral y dorsalmente en estructuras cuticulares que recuerdan a pelos o cerdas finas. Estas diferenciaciones larvales parecen corresponder a receptores sensoriales.

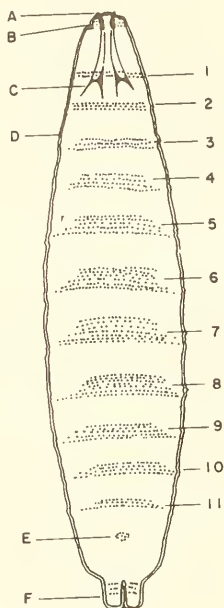


Figura 2. Esquema de una larva de *D. melanogaster* (vista ventral) mostrando los 11 cinturones de espículas característicos de esta especie: (A), mandíbulas; (B), complejo anteno-maxilar; (C), esqueleto céfalo faríngeo; (D), cutícula; (E), grupos de espículas; (F), espículas de la zona traqueal.

La Figura 3 (a y b) y la Tabla 2 muestran el crecimiento en longitud de las espículas de los cinturones 3°, 7° y 11°, entre las 24 y las 96 horas de desarrollo larval. Las espículas del cinturón 3° de las larvas de 24 horas son significativamente más largas que las de las larvas de 48 y 72 horas, pero más cortas que las espículas de las larvas de 96 horas (prueba de Student). Las espículas del cinturón 7° de las larvas de 24 horas son más largas que las de las larvas de 48, pero más cortas que las de las larvas de 72 y de 96 horas. En contraste, las larvas de 24 y de 48 horas de edad presentan en el cinturón 11° espículas de una longitud similar, pero comparadas con las espículas de las larvas de 72 y de 96 horas son significativamente más cortas (Fig. 3(a) y Tabla 2).

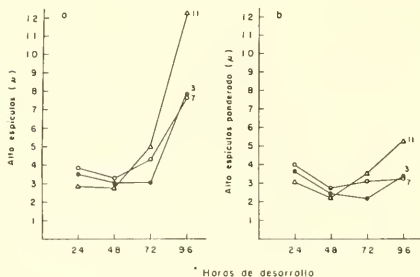


Figura 3. Crecimiento en longitud de las espículas de la cutícula larval de *D. melanogaster* (cinturones 3º (●), 7º (○) y 11º (△)), entre las 24 y las 96 horas de edad: a) crecimiento en longitud versus tiempo de desarrollo; b) longitud espicular/longitud de las larvas (Tabla 1) a las 24, 48, 72 y 96 horas de edad.

La Figura 3(b) muestra una relación entre la edad larval (24 a 96 horas de desarrollo) y el largo de las espículas de los cinturones 3º, 7º y 11º, ponderado por la longitud larval respectiva (ver Tabla 1). Las espículas de los cinturones 3º y 7º de las larvas de 24 horas, son proporcionalmente más grandes que las de las

larvas de 48 y de 72 horas. Las espículas del cinturón 11º de las larvas de 24 horas, son proporcionalmente más largas que las de las larvas de 48, pero más cortas que las de las larvas de 72 y de 96 horas.

La Figura 4 (a y b) y la Tabla 2 muestran cómo varía el ancho de las espículas entre las 24 y las 96 horas de desarrollo larval de *D. melanogaster*. Las espículas del cinturón 3º de las larvas de 24 horas son más anchas que las

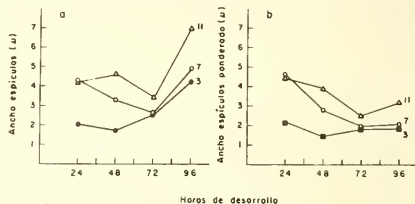


Figura 4. Crecimiento de ancho basal de las espículas de la cutícula larval de *D. melanogaster* (cinturones 3º (●), 7º (○) y 11º (△)), entre las 24 y las 96 horas de edad: a) crecimiento en ancho basal versus tiempo de desarrollo; b) ancho espicular/longitud de las larvas (Tabla 1), a las 24, 48, 72 y 96 horas de edad.

Tabla 2

PROMEDIO DE LARGO Y DE ANCHO DE LAS ESPÍCULAS DE LOS CINTURONES 3º, 7º Y 11º DE LARVAS DE 24, 48, 72 Y 96 HORAS DE DESARROLLO DE *D. MELANOGASTER* (CEPA OREGON R-C). SE REGISTRO EL LARGO Y EL ANCHO DE 10 ESPÍCULAS POR CINTURÓN PARA CADA LARVA DE UN GRUPO DE 10 EN CADA PERIODO DE EDAD

Edad larval (horas)	Cinturón	Largo Promedio (micrómetros)	Ancho Promedio (micrómetros)	t respecto a Espículas de 24 horas						
				Alto			Ancho			
				3	7	11	3	7	11	
24	3	3.42 ± 0.06	2.07 ± 0.08	—	—	—	—	—	—	—
	7	3.78 ± 0.07	4.35 ± 0.03	—	—	—	—	—	—	—
	11	2.88 ± 0.02	4.26 ± 0.06	—	—	—	—	—	—	—
48	3	2.88 ± 0.06	1.68 ± 0.02	6.136*	—	—	—	4.730*	—	—
	7	3.20 ± 0.06	3.30 ± 0.03	—	6.444*	—	—	—	24.764*	—
	11	2.80 ± 0.04	4.64 ± 0.06	—	—	1.789	—	—	—	4.470*
72	3	3.02 ± 0.03	2.50 ± 0.05	5.714*	—	—	—	4.669*	—	—
	7	4.30 ± 0.11	2.63 ± 0.07	—	3.221*	—	—	—	22.572*	—
	11	4.90 ± 0.15	3.44 ± 0.09	—	—	13.015*	—	—	—	7.578*
96	3	7.80 ± 0.13	4.16 ± 0.17	30.888*	—	—	—	11.850*	—	—
	7	7.60 ± 0.15	4.86 ± 0.02	—	26.630*	—	—	—	14.170*	—
	11	12.24 ± 0.20	7.00 ± 0.13	—	—	14.976*	—	—	—	19.134*

*p < 0.05; gl = 198.

de las larvas de 48, pero presentan un ancho menor al de las espículas de las larvas de 72 y 96 horas (prueba del *t*, Tabla 2). Una situación comparable ocurre con el cinturón 7°; en este caso las espículas de las larvas de 24 horas son significativamente más anchas que las de las larvas de 48 y 72 horas, pero de un ancho menor al de las espículas de larvas de 96 horas. En contraste, las espículas del cinturón 11° de las larvas de 24 horas, son más anchas que las de las larvas de 72, pero de un ancho menor al de las larvas de 48 y de 96 horas de desarrollo.

La ponderación del ancho de las espículas de los cinturones 3°, 7° y 11° por el tamaño larval respectivo (ver Tabla 1), indica que las larvas de 24 horas exhiben espículas proporcionalmente más anchas que las larvas de 48 a 96 horas de edad (Fig. 4 (b)).

DISCUSION

El crecimiento de las espículas de los cinturones 3°, 7° y 11° de la larva de *D. melanogaster*, se produce con un ritmo diferente al del cuerpo larval (Tablas 1 y 2 y Fig. 3 y 4). Estos resultados parecían constituir un ejemplo de crecimiento alométrico (Thompson, 1977). Sin embargo, el logaritmo de la longitud espicular entre las 24 y las 96 horas de desarrollo larval no es proporcional al logaritmo del largo de estos individuos en este período de tiempo, como se esperaría en un caso de crecimiento alométrico clásico (Wigglesworth, 1977). Comparado con el crecimiento continuo en longitud de las larvas, el tamaño de las espículas puede no variar o aun disminuir con la edad (Fig. 3 y 4). En *D. melanogaster* el aumento de tamaño larval está ligado a la pérdida de la cutícula durante el proceso de la muda. En el siguiente estado larval, la cutícula y sus derivados se reconstruyen a partir de la epidermis celular interna de la larva (Wigglesworth *op. cit.*). Bodenstein (1950) ha sugerido que, en *D. melanogaster*, el crecimiento larval se produce por un aumento en tamaño celular y que este proceso es independiente de la muda. Los resultados de este estudio apoyan la sugerencia de este autor, en el sentido que los mecanismos celulares envueltos en la formación de una nueva cutícula y la formación de sus estructuras concomitantes (espículas, por ejemplo), parecen ser distintos a los que regulan el

crecimiento de los órganos internos de la larva de *D. melanogaster*.

El presente estudio también indica que las espículas crecen en longitud con un ritmo distinto al crecimiento en ancho (Tabla 2). En general, las espículas tienden a ser más largas que anchas, con excepción de las de los cinturones 7° y 11° de las larvas de 24 y de 48 horas. En este caso, el ancho es similar al largo o predomina ligeramente aquél sobre éste. En las espículas de los cinturones 3°, 7° y 11° de las larvas de 72 y de 96 horas, el largo predomina sobre el ancho (Tabla 2). Las espículas son estructuras cuticulares aptas para servir de apoyo, facilitando la contracción de los diferentes segmentos larvales que impulsan a la larva hacia adelante o hacia atrás y que la ayudan a cambiar de dirección (Sewel *et al.*, 1975; Green *et al.*, 1983). Esta inferencia se basa también en la observación del desplazamiento larval de *D. melanogaster*, sobre una superficie de agar (Godoy-Herrera, 1986). La larva deja una erosión característica en este sustrato, provocada por la incrustación de las espículas en él. Además, el hecho que las espículas de un determinado cinturón sean de un tamaño distinto al de otro, sugiere una utilización cuantitativamente diferente durante la locomoción larval, o durante otras actividades tales como la excavación de sustratos (Godoy-Herrera, 1982).

Al ponderar el largo y el ancho de las espículas por el tamaño larval respectivo, se encuentra que las larvas de 24 y de 96 horas tienden a presentar espículas proporcionalmente más grandes (Figs. 3(b) y 4(b)). La mayor parte de las actividades de las larvas de 24 horas se producen sobre la superficie de los sustratos donde se desarrollan; las larvas de 48 y de 72 horas penetran en esos sustratos (Godoy-Herrera, 1986). Las larvas de 96 horas están interesadas en buscar un lugar donde pupar, exhibiendo comportamientos exploratorios, abandonando los sustratos donde se criaron (Godoy-Herrera *et al.*, 1984). Es posible que las espículas proporcionalmente más grandes de las larvas de 24 y 96 horas ayuden al desplazamiento sobre superficies, ya sea sobre la de los sustratos de crianza (larvas de 24 horas) o sobre la de aquellos lugares en que las larvas de 96 horas se transformarán en pupas. Las espículas más pequeñas de las larvas de 48

y 72 horas, podrían servir como puntos de apoyo, ayudando a realizar los movimientos peristálticos asociados con la excavación de sustratos (Chapman, 1975).

En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que entre las 24 y las 96 horas de desarrollo, las espículas de las larvas de *D. melanogaster* crecen con un ritmo distinto al de los órganos internos de estos preadultos. Las diferencias de tamaño de las espículas de larvas de diferentes edades, parecen reflejar adaptaciones ontogenéticas, asociadas con los diferentes ambientes que utilizan estos preadultos a medida que progresa su desarrollo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por el Departamento de Investigación y Bibliotecas de la Universidad de Chile (Proyecto B-2309-8615) y por el Instituto Profesional de Chillán (Proyecto 086/12). Estamos en deuda con Humberto Martínez cuyos comentarios mejoraron este manuscrito. Este trabajo es parte del Seminario para optar al Título de Profesor de Estado en Biología y Ciencias Naturales de J.C.A.S. Agradecemos también a Lilya Milla por mecanografiar el manuscrito.

LITERATURA CITADA

BODENSTEIN, D. 1950. The Postembryonic Development of *Drosophila*. En: *Biology of Drosophila* (M. Demerec, ed.), John Wiley and Sons, Inc. New York, pp. 275-367.

- BURDICK, A.B. 1954. New medium of reproductive quality stable at room temperature. *Drosoph. Inf. Serv.*, 28: 170.
- CARNEVALI, M.D.C. 1978. Z-line and supercontraction in the hydraulic muscular system of insect larvae. *J. Exp. Zool.*, 203: 15-30.
- CHAPMAN, G. 1975. Versatility of hydraulic systems. *J. Exp. Zool.*, 194: 249-270.
- DENELL, R.E.; HUMMELS, K.R.; WAKIMOTO, B.T., y T.C. KAUFMAN. 1981. Developmental studies of lethality associated with the antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 81: 43-50.
- GODOY-HERRERA, R. 1982. Estudios genéticos-etológicos y evolutivos de la conducta excavatoria de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- GODOY-HERRERA, R. 1986. The development and genetics of digging behaviour in *Drosophila* larvae. *Heredity*, 56: 33-41.
- GODOY-HERRERA, R.; BURNET, B.; CONNOLLY, K.J. y J. GOGARTY. 1984. The development of locomotor activity in *Drosophila melanogaster* larvae. *Heredity*, 52: 63-75.
- GREEN, C.H.; BURNET, B. y K.J. CONNOLLY. 1983. Organization and patterns of inter- and intraspecific variation in the behaviour of *Drosophila* larvae. *Anim. Behav.*, 31: 282-291.
- LOHS-SCHARDIN, M.; CREMER, C. y C. NUSSLEIN-VOLHARD. 1979. A fate map for the larval epidermis of *Drosophila melanogaster*: localized cuticle defects following irradiation of the blastoderm with an ultraviolet laser microbeam. *Dév. Biol.*, 73: 239-255.
- SEWELL, D.; BURNET, B. y K.J. CONNOLLY. 1975. Genetic analysis of larval feeding behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.*, 24: 163-173.
- SOKOLOWSKI, M.B., KENT, C. y J. WONG. 1984. *Drosophila* larval foraging behaviour: Developmental stages. *Anim. Behav.*, 32: 645-651.
- THOMPSON, D'ARCY. 1977. *On Growth and form* (an abridged edition edited by J.T. Bonner), Cambridge University Press, Cambridge.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1977. *The Principles of insect Physiology* Chapman and Hall, London.