

## EFFECTO DE LAS RADIACIONES GAMA EN ESPERMATOZOIDES MADUROS DE DROSOPHILA MELANOGASTER

Por: María Luisa Bravo A. (1)  
Margarita Zuleta B. (2)

### RESUMEN

Desde 1927 cuando Muller conoció que las radiaciones ionizantes causan cambios en el material genético, se han realizado numerosas investigaciones en todos los niveles utilizando estas radiaciones. En la actualidad tienen capital importancia no sólo en experimentos de genética básica, sino también porque gran parte de la población está expuesta a este tipo de radiaciones, por razones de radioterapia y principalmente por contaminación, en lugares de experimentación con energía nuclear.

En este trabajo se hizo un estudio sobre la frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo producidas con diferentes dosis de rayos gama en espermatozoides maduros de machos de *Drosophila melanogaster*. Machos vírgenes de 5 días de edad de la cepa Oregon-R se sometieron a la acción de los rayos gama de una bomba de Co <sup>60</sup>. Se utilizaron dosis de 4000, 3000, 2000 y 1000 Roentgen. Inmediatamente que recibieron la correspondiente dosis de irradiación los machos se cruzaron con hembras de la cepa F M 6, también de 5 días de edad. Para la detección de mutaciones letales recesivas se siguió en forma general el método originalmente ideado por Muller.

Se midió la frecuencia de mutaciones letales recesivas inducidas con cada dosis y la relación entre dosis aplicada y frecuencia de mutaciones producidas, se calculó en base al análisis de regresión standard por el método de los cuadrados mínimos.

Al hacer una curva que representa la relación entre dosis y efecto, se vió que los puntos experimentales se ajustan a la ecuación lineal  $y = 2.8 \times 10^{-5}$  que a su vez es la rata de mutación por gameto por unidades roentgen. Y se observó que la producción de mutaciones letales recesivas es directamente proporcional a la dosis de rayos gama.

### INTRODUCCION

Son ampliamente conocidos los efectos de las radiaciones ionizantes en el material genético, desde la ruptura de los puentes de hidrógeno del DNA hasta las más grandes aberraciones cromosómicas. Tales cambios producen alteraciones físicas, bioquímicas y fisiológicas en los organismos (Casa-rett, 1968).

El dominio de las radiaciones ionizantes ha permitido penetrar en los misterios de la estructura del gene, aunque en este momento, para análisis intracitrónicos y de finas estructuras se prefiere la utilización de mutágenos químicos por ser más específicos, sin embargo las radiaciones ionizantes no han disminuído su importancia capital, no solamente para los experimentos básicos de la genética, sino también porque gran parte de la población humana está expuesta a

(1), (2) Profesoras Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín.

radiaciones de diversa naturaleza por razones de radioterapia y principalmente por contaminación, las cuales constituyen el grupo de los más potentes mutágenos de los contaminantes de la biosfera.

Uno de los organismos más usados en este tipo de investigaciones es la *Drosophila melanogaster* y las radiaciones a las cuales es expuesta son los rayos X y  $\gamma$  (gama), por ser éstas muy efectivas en la inducción de toda clase de alteraciones genéticas usadas en los diferentes niveles de investigación.

En los estudios realizados en *Drosophila* y en otros organismos, se ha encontrado que el porcentaje de mutaciones puntuales se incrementa linealmente con la dosis (Wolff, 1968).

El propósito de este trabajo es hacer un estudio de la frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo producidas con diferentes dosis de rayos  $\gamma$  (gama) en espermatozoides maduros de machos de *Drosophila* de una edad determinada.

## MATERIALES Y METODOS

Todas las moscas necesarias para este experimento se obtuvieron de dos cepas: Oregon-R (tipo silvestre) como fuente de machos y la FM6 (First Multiple 6 Inversions) proporcionó las hembras. Esta última cepa es ideal para detectar mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, ya que posee cromosomas X de la siguiente forma: In (1) 15D-E; 20A-B superpuesta en In (1) 1B2-D1 + In (1) 3C; 4E-F + In (1) 4D-E1; 11F2-4. Las inversiones múltiples y complejas suprimen completamente toda recombinación en hembras (FM6/+) heterocigóticas, lo cual permite conservar intacto el cromosoma X en estudio. Además posee marcas en dicho cromosoma: Bar (B) dominante, y el yellow (y) y white (w) recesivas, las cuales permiten identificar las moscas que reciben este cromosoma (Lindsley and Grell 1968).

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

**Test para Detectar Mutaciones Recesivas Letales Ligadas al Cromosoma X.**

**Cruces Parentales:** De la cepa Oregon-R se colectaron machos de 8 horas de vida para asegurar la virginidad de ellos y se mantuvieron en alimento fresco hasta los 5 días de edad a fin de que almacenen alguna cantidad de espermatozoides móviles plenamente maduros (Lefevre 1965) (a), luego se sometieron a las radiaciones de la bomba de  $\text{Co}^{60}$  a 111r/min. a una distancia de 40 cm. de la fuente, en un campo de 20 x 20. Se utilizaron dosis de 4000, 3000, 2000 y 1000 roentgens. Para facilitar el manejo y quietud de las moscas se esterizaron y encerraron en pequeños tubos de vidrio de 2 cm. de longitud con un diámetro de 0.5 cm. Inmediatamente que recibieron la correspondiente dosis de irradiación los machos se cruzaron colectivamente (25 en cada cuarto de litro) con exceso de hembra vírgenes (2

hembras por cada macho), también de 5 días de edad de la variedad de FM6.

A las 24 horas de este primer cruce, se separaron los machos de las hembras para asegurar que éstas recibieron una muestra homogénea de espermatozoides que estuvieron plenamente maduros en el momento de la irradiación, ya que la utilización de células espermáticas de diferente edad hace variar el efecto de la radiación y como consecuencia dificulta la medida de relación entre la dosis y el efecto genético (Muller 1954). Las hembras FM6 fecundadas se trasladaron a un nuevo medio de cultivo con intervalos de 5 días hasta que agotaron las reservas espermáticas.

**Cruces  $F_1$ :** Del cruce anterior se obtuvo  $F_1$ , en la cual las hembras son heterocigóticas para el cromosoma irradiado (FM6/+), los machos son todos FM6. Las hembras de esta generación no necesitan ser vírgenes puesto que se cruzan individualmente con sus hermanos que son FM6 (Abrahamson 1971). Este cruce  $F_1 \times F_1$  se realizó en tubos pequeños, a los 14 días, a partir del momento en que las hembras parentales fueron puestas en el medio de cultivo. De esta forma se asegura que la  $F_2$  no haya eclosionado aún. A los 15 días de iniciado el cruce  $F_1 \times F_1$  se examinó  $F_2$  a través de un estereomicroscopio. La población de cada frasco fue esterizada con el fin de facilitar la detección de las mutaciones letales recesivas. El criterio para detectar tales mutaciones fue el diseñado originalmente por Muller (Spencer 1948). La ausencia de machos con fenotipo silvestre (Fig. 1) indica que los cromosomas irradiados son portadores de mutaciones letales recesivas. El promedio de la población de cada frasco fue de 50 individuos, cuando la población era pequeña de 12 o menos, la falta de machos de fenotipo silvestre no merece confiabilidad (Abrahamson 1971), en estos casos se sacaron las hembras (FM6/+) heterocigóticas portadoras del cromosoma X en estudio y se hicieron cruces individuales con machos FM6 para obtener en  $F_3$  evidencia de la mutación letal recesiva.

**Control:** Para el control se utilizaron machos Oregon-R y hembras FM6. La técnica seguida fue la misma que se empleó en el test para detectar mutaciones recesivas ligadas al sexo, con la sola excepción de que los machos no fueron irradiados.

## RESULTADOS

Con el fin de determinar la acción de las radiaciones en los espermatozoides maduros de machos vírgenes de *Drosophila melanogaster* de 5 días de edad, se midió la frecuencia de mutaciones recesivas letales inducidas con cada dosis. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla I.

El cálculo de la relación dosis-frecuencia de mutaciones letales recesivas se basó en el análisis de regresión standard por medio del método de los cuadrados mínimos con el coeficiente de corrección, aplicado según las modificaciones de Mather (1951).

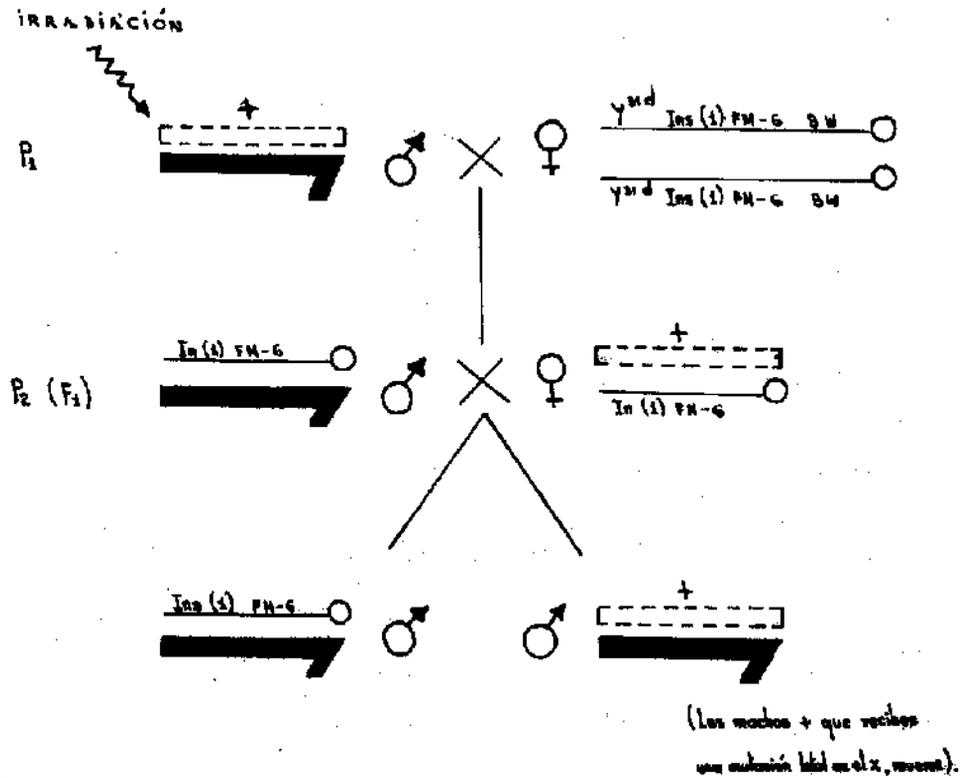


FIGURA 1. — Método para detectar mutaciones letales recesivas ligadas al sexo.

TABLA I

Frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo inducidas por radiaciones en machos Oregon-R de 5 días de edad.

Dosis en rads	Nº de organismos analizados	Nº de mutaciones letales	% de letales ± error standard	Rate observado (genotes/rads) frecuencia observada base	La p.m.c. esp se calculó con las ecuaciones
0	1027	1	0.10 ± 0.09		
1.000	362	12	3.31 ± 0.87	$3.31 \times 10^{-5}$	
2.000	464	24	5.17 ± 1.06	$5.17 \times 10^{-5}$	$\chi^2 = 2.8 \times 10^{-3}$
3.000	383	32	8.38 ± 1.41	$8.38 \times 10^{-5}$	$\chi^2 = 0.215$
4.000	406	46	11.36 ± 1.66	$11.36 \times 10^{-5}$	100% > P > 95%

La línea de regresión se determinó por medio de la fórmula  $Y = K + aD$ . Donde K representa el punto de intersección, a representa el incremento de mutaciones por Roentgen (siendo  $a = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$ ;  $y = \frac{\sum IXY - (\sum IX)(\sum IY)}{\sum I}$ ; D = dosis; Y = frecuencia esperada de mutaciones letales recesivas por dosis).

El error standard fue calculado aplicando la fórmula:

$$ES = \sqrt{\frac{pq}{n}}$$

En la curva que representa la relación entre dosis y efecto (Fig. 2) se ve claramente que los puntos experimentales se ajustan a la ecuación lineal.

$$Y = 2.8 \times 10^{-5} \times D,$$

donde Y = a la frecuencia de mutación/gameto/dosis.

La prueba de ji cuadrado dió el siguiente valor:  $X^2_3 = 0.213$  con una probabilidad de  $100\% > P > 95\%$ .

En el control se observó una frecuencia de mutación espontánea de 0.10/o la cual se tomó como punto de intersección con la ordenada.

## DISCUSION

Como puede observarse en la curva (Fig. 2), la producción de mutaciones letales recesivas es directamente proporcional a la dosis de rayos gama.

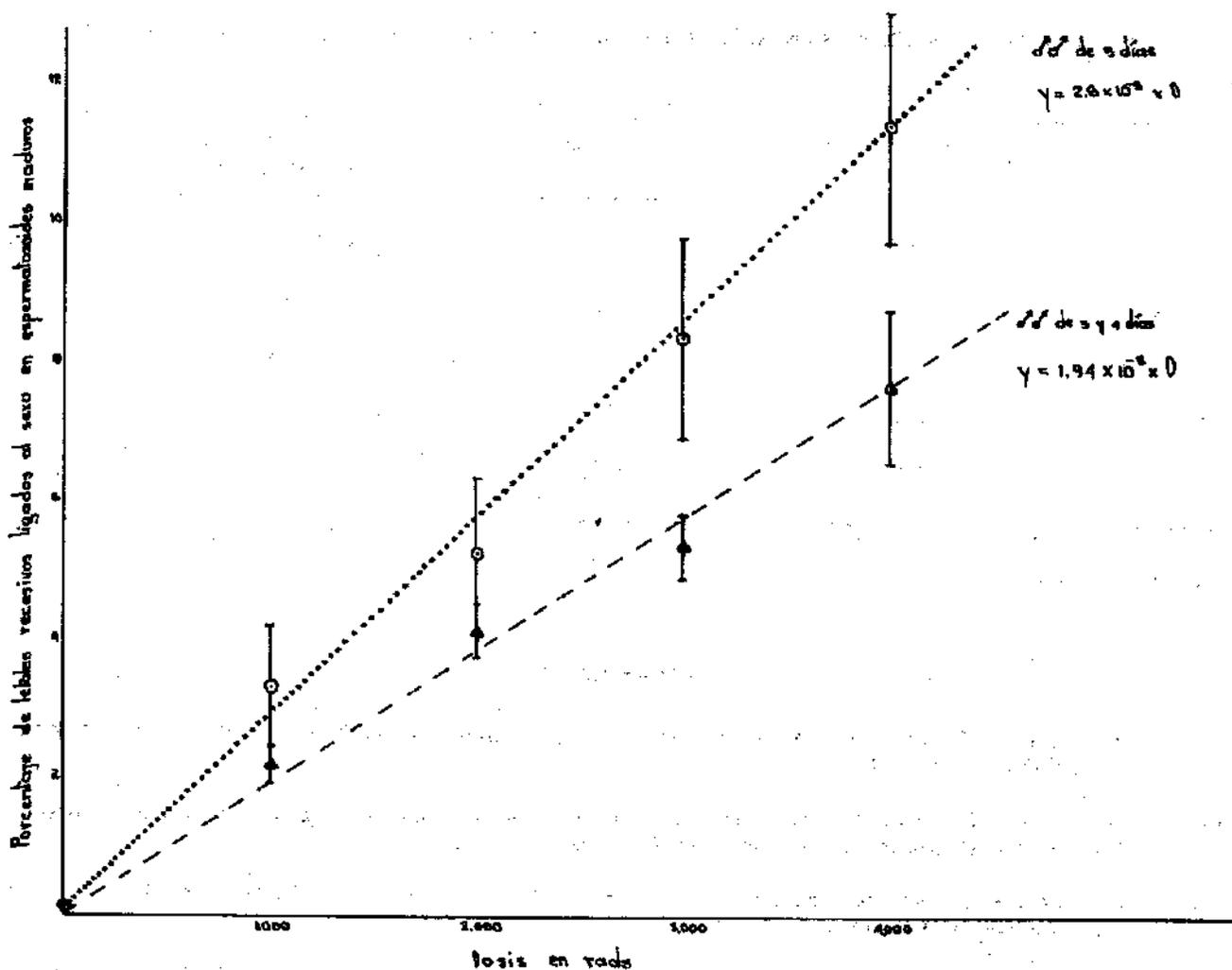


FIGURA 2. — Porcentaje de letales recesivos ligados al cromosoma X, inducidos por rayos  $\gamma$  en  $\sigma^6$  de 3 días de edad (O). En  $\sigma^6$  de 3 y 4 días de edad ( $\Delta$ ) (Edington 1964). (Las líneas verticales representan los límites de Error Standard).

Un gran número de investigadores, entre ellos Muller (1939), Edington (1956 y 1958), Abrahamson (1964), Zuleta (1968), etc., también han encontrado que la relación entre dosis de radiaciones ionizantes y la frecuencia de mutaciones es lineal.

Por comparación de los datos obtenidos en este experimento (Tabla I) con los reportados por Edington (1956), quien también trabajó con radiaciones gama para inducir mutaciones letales recesivas en espermatozoides maduros (Tabla II y Fig. 2) se observa que ambos resultados son similares en el incremento lineal de las mutaciones en función de la dosis. Sin embargo, la rata de mutaciones/gameto/roentgen del presente trabajo,  $2.8 \times 10^{-5}$ , es mayor que la reportada por Edington (1956), quien obtuvo una rata de  $1.94 \times 10^{-5}$  (Figura 2).

Un análisis de las variables de los dos experimentos muestra que son iguales, excepto en dos aspectos: en la edad de los machos irradiados y en el tamaño de la muestra.

En el presente experimento se utilizó machos de 5 días de edad, mientras que Edington (1956) empleó machos de 3 y 4 días. La diferencia de las edades podría influir sobre el efecto genético de las radiaciones debido a que los espermatozoides plenamente maduros exhiben mutabilidad mas elevada que las células germinales en estadios más tempranos de maduración (Timofeeff 1937) y los machos vírgenes de mayor edad almacenan más cantidad de espermatozoides maduros (Lefevre 1968a y 1968b) en el momento de ser sometidos a irradiación, por lo tanto se aumenta la probabilidad de mutación.

TABLA II

Frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, inducidas por radiaciones gama en machos Oregon-R de 3 a 4 días de edad.

Dosis (r)	No. de cromosomas analizados	No. de letales	Porcentaje de letales $\pm$ 1 error standard
0	1875	1	0.053 $\pm$ 0.05
1000	2799	61	2.18 $\pm$ 0.28
2000	2764	117	4.23 $\pm$ 0.38
3000	2322	123	5.30 $\pm$ 0.47
4000	1801	137	7.61 $\pm$ 1.11

(Edington 1956)

## BIBLIOGRAFIA

- Abrahamson, S. and L. D. Friedman, 1964. X Ray induced mutations in spermatogonial cells of *Drosophila* and their dose-frequency relationship. *Genetics* 49:357-361.
- Abrahamson, S. and E. B. Lewis, 1971. The detection of mutations in *Drosophila melanogaster*. In: *Chemical mutagens*, 461-487 Alexander Hollander, Ed. O Plenum Press, New York - London, 610 pp.
- Casarett, A. P., 1968. Radiations effects on nucleic acids. 83-86. In: *Radiation Biology*. Ed. United States Atomic Energy Commission, Washington D. C. 368 pp.
- Edington, C. W. 1956. The induction of recessive lethals in *Drosophila melanogaster* by radiations of differentiation density. *Genetics* 41:814-821.
- and M. L. Randolph, 1958. A comparison of the relative effectiveness of radiations of different average linear energy transfer on the induction of dominant and recessive lethals in *Drosophila*. *Genetics* 43:715-721.

- Lefevre, G. JR., 1965. (a) The mutability of mature sperm of *Drosophila melanogaster* irradiated in the female and in the male, *Genetics* 51:381-390.
- .(b) Factors modifying mutation frequency patterns detected after irradiations of *Drosophila melanogaster* males. *Mutation Research* 2:22-28.
- . and U-B. Jonsson, 1964. X Ray induced mutability in male germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 1: 231-246.
- Lindsley, D. L. and E. H. Grell, 1968, Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. of Washington Publ. 627.
- Mather, K., 1951. Statistical analysis in biology. 249-252. University Paperbacks, Matthuen: London.
- Muller, M. J., 1939. Biography on the genetics of *Drosophila*, Part. 1. Oliver and Boyd, London.
- Muller, M. H., I. Herskowitz, S. Abrahamson and I. I. Oster, 1954. A non linear relation between X-ray dose and recovered lethal mutation in *Drosophila*. *Genetics* 39:741-749.
- Spencer, W. P. and Stern, 1948, Experiments to test the validity of the linear r-dose/mutation frequency relation in *Drosophila* at low dosage. *Genetics* 33: 43-74.
- Timofeeff-Ressousky, N. M., 1937. Uber mutations raten in reifenspermien von *Drosophila melanogaster*. *Biol. Zentr.* 57: 309-315.
- Wolff, S., 1967. Radiation genetics. *Annual Review of Genetics.* 1:221-244.
- Zuleta, M., 1968. Comparative genetic studies in *Drosophila melanogaster*. Tesis para la obtención de Master of Science in Genetics at the University of Wisconsin.