Efecto de la β -ecdisterona en cultivos en competencia de *Drosophila melanogaster*

L. M. Botella* y J. L. Mésua

Departamento de Genética
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Valencia
Burjasot, Valencia (Spain)

(Recibido el 27 de enero de 1986)

L. M. BOTELLA and J. L. MENSUA. *Effect of β -Ecdysterone in Crowded Cultures of *Drosophila melanogaster**. Rev. esp. Fisiol. 43 (1), 63-68, 1987.

High levels of β -ecdysterone (more than 1 $\mu\text{g/ml}$) have been shown to decrease larva-adult viability and to speed up developmental times when supplied to the media in crowding cultures. The highest doses (100 $\mu\text{g/ml}$) of ecdysterone suppresses almost completely the phenomenon of larval stop in the third instar of development, first reported by our laboratory in overcrowded situations. Thus, one may deduce that stopped larvae could have low levels of ecdysone, and perhaps these are the ultimate physiological cause of their arrested development before the critical larva-pupa molt.

Key words: β -Ecdisterone, Crowding, *Drosophila*, Larval arrest.

Entre las respuestas comúnmente aceptadas como consecuencia de la competencia por el alimento en cultivos de *Drosophila melanogaster* se encuentra la disminución de la viabilidad y el aumento en el tiempo medio de desarrollo (1, 11). Además de estas dos características, también se ha descrito una detención en el desarrollo larvario en tercer estadio (10). La acumulación de productos de excreción procedentes de las larvas en condiciones de competencia por el espacio y alimento (entre estos productos merece destacarse el efecto del ácido úrico) parece ser, al menos en parte, responsable de las tres respuestas anteriormente mencionadas

(5). Sin embargo, la causa última de estas alteraciones en el desarrollo larvario debería atribuirse a cambios en los niveles hormonales que controlan el desarrollo en insectos.

El control de la metamorfosis y la diferenciación en los insectos depende de los niveles hormonales de ecdisona y hormona juvenil. BECKER (3) demostró la relación existente entre el patrón de «puffs» en los cromosomas gigantes de las glándulas salivales de *Drosophila* y los fenómenos de metamorfosis, y CLEVER (7) alteró en *Chironomus* el mencionado patrón «puffs» administrando ecdisona, hormona necesaria para la inducción de los procesos de muda (2, 15). Una deficiencia en el nivel de esta hormona en larvas que crecen en situaciones de competencia por el alimento podría explicar

* Correspondencia y dirección actual: Genetiska Institutionen, Sölvegatan 29, S-22 362 Lund (Suecia).

su retraso en el desarrollo. Por eso, nuestro principal objetivo ha sido el estudio de los efectos producidos por la β -ecdisterona sobre la supervivencia y el tiempo de desarrollo tanto en situaciones normales como de competencia por el alimento.

Material y Métodos

Larvas sincronizadas y recién eclosionadas (2 ± 2 h de edad) de la cepa isogénica Oregón-R de *Drosophila melanogaster* (tipo salvaje) se sembraron tanto en condiciones de competencia por el alimento como en condiciones alimentarias óptimas. Los cultivos en competencia consistían en 70 larvas en viales de $5 \times 2,5$ cm con 5 ml del mismo medio de Lewis.

Efecto de la β -ecdisterona. — Se añadió al medio de cultivo β -ecdisterona diluida en la solución de Beadle-Ephrussi a las siguientes concentraciones: 0 (blanco), 0,1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Se contabilizaron diariamente todos los adultos que emergían de cada vial hasta el agotamiento de los cultivos. Cada concentración se realizó por quintuplicado. Los cultivos se incubaron a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, con una humedad relativa del 70% e iluminación continua.

Interrupción de la situación de competencia: experiencias de sobreadición. — Los cultivos de competencia se interrumpieron en diferentes series al día décimo de cultivo desde el momento de la siembra. Se cultivaron un total de 5 series, cada una de ellas correspondiente a una de las concentraciones de ecdisterona mencionadas. Cada serie constaba de 5 viales de cultivo que se tomaron como réplicas. La interrupción de la situación de competencia se hizo mediante la introducción de los pequeños viales dentro de tubos de $10 \times 2,5$ cm que contenían 10 ml de medio en disposición inclina-

da, procedimiento descrito previamente como «técnica de sobreadición» (12). Las larvas migran espontáneamente desde el vial de competencia al de sobreadición. De esta manera, la población larvaria inicialmente en competencia queda dividida en dos subpoblaciones: una población interior (en los pequeños viales) formada por las pupas y las larvas a punto de pupar que no han migrado, y una población exterior (en los viales de sobreadición), constituida por las larvas recogidas en los viales de sobreadición. Los adultos que emergían en ambas poblaciones se contaron diariamente hasta el agotamiento de los cultivos.

Resultados

Efecto de la β -ecdisterona. — La tabla I muestra el efecto que las diferentes concentraciones de ecdisterona tienen sobre la viabilidad desde larva hasta adulto, sobre la mortalidad pupal y sobre el tiempo medio de desarrollo, tanto en cultivos en competencia por el alimento como en condiciones óptimas. Cuando los resultados obtenidos fueron significativos, se presenta también el test F correspondiente al ANOVA. En condiciones óptimas, la viabilidad larva-adulto no es significativamente afectada por un aumento en la concentración de ecdisona desde 0 a 100 $\mu\text{g/ml}$. Por el contrario, el tiempo medio de desarrollo disminuye, especialmente en las dos concentraciones de ecdisona más altas (10 y 100 $\mu\text{g/ml}$). En cultivos donde existe competencia por el alimento, la viabilidad tiende a disminuir a medida que la concentración de ecdisterona aumenta, incluso con la dosis más baja (0,1 $\mu\text{g/ml}$), dosis suficientemente alta como para inducir la evaginación de los discos imaginales de *Drosophila* en cultivos *in vitro* (15). La heterogeneidad en la viabilidad que se observa entre las réplicas hace que el ANOVA no sea significativo, incluso cuando una disminución en viabilidad es aparente. Sin em-

bargo, los datos concernientes a la mortalidad pupal en estos cultivos pueden proporcionar otra vía de estimar el efecto de la ecdisterona sobre la viabilidad desde larva hasta adulto, a medida que el nivel de ecdisterona aumenta desde 0 a 100 $\mu\text{g/ml}$ se observa una disminución progresiva en la mortalidad pupal. En este caso, el efecto es altamente significativo (tabla I, F). El tiempo medio de desarrollo sigue el mismo patrón previamente descrito en condiciones óptimas, es decir, disminuye con el aumento en la concentración de ecdisterona.

Los resultados demuestran que el efecto de la ecdisterona en cultivos tanto con, como sin competencia, radica fundamentalmente en un aumento de la tasa de desarrollo. En competencia este efecto se acompaña por una mortalidad pupal creciente con la dosis de ecdisterona y por lo tanto por una disminución de la viabilidad larva-adulto. Estos resultados contrastan con los obtenidos por SANG (14) y otros autores, que no encuentran ningún efecto sobre la viabilidad y el tiempo de desarrollo, ni con la α - ni con la β -ecdisterona adicionadas al medio de cultivo.

Interrupción de la competencia: experiencia de sobreadición (tabla II). — El número de adultos emergidos en las poblaciones del interior de los viales de competencia aumenta con la concentración de ecdisterona. Este aumento está correlacionado con una caída en el número de adultos emergidos en las poblaciones de fuera. Esta disminución es mucho más espectacular cuando la concentración de ecdisterona aumenta de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$. A la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ la ausencia de adultos en los viales de sobreadición es casi completa. Sin embargo, la disminución en estos viales no se ve completamente compensada por el aumento concomitante en el número de adultos recuperados en el interior de los viales de competencia. Por tanto, se debe

concluir que a medida que el nivel de ecdisterona aumenta en los cultivos hay también un aumento paralelo en la tasa de mortalidad larva-adulto. Este último efecto se debe en gran parte a la mortalidad en el estado pupal. Además, cuando se suma el número de pupas muertas con el número total de adultos supervivientes correspondiente, se observa que el número absoluto de individuos que alcanzan el estado pupal es constante para cualquier concentración de ecdisterona.

Como consecuencia de los resultados comentados hasta el momento, el porcentaje de larvas paradas en su desarrollo disminuye a medida que aumenta la concentración de ecdisterona.

Los tiempos medios de desarrollo larva-adulto se ven progresivamente acortados tanto en las poblaciones del interior de los viales de competencia como en las poblaciones recuperadas en los viales de sobreadición, a medida que aumenta la concentración de ecdisterona. Por tanto, se puede afirmar que el efecto principal de la ecdisterona parece ser la aceleración de las tasas de desarrollo. Es notorio, sin embargo, que el efecto de la ecdisterona persiste incluso después de que las larvas han abandonado el medio tratado con la hormona (recuérdese que los viales de competencia son los portadores de la hormona). En efecto, las larvas de las poblaciones recuperadas por sobreadición (en un medio libre de ecdisterona) pupan antes cuando proceden de un medio con una concentración mayor de hormonas.

Todos los efectos descritos son estadísticamente significativos como queda comprobado por los ANOVAS de la última columna de la tabla II.

Discusión

El papel que desempeña la β -ecdisterona, la hormona de la muda en *Drosophila melanogaster* es decisivo en el desarrollo larvario y pupal. Se ha demos-

Tabla I. Efecto de diferentes concentraciones de β -ecdisterona sobre la viabilidad larva-adulto (V), mortalidad pupal (Pm) y tiempo medio de desarrollo (MDT) en cultivos con y sin competencia de *Drosophila melanogaster*.

Nivel de ecdisterona ($\mu\text{g/ml}$)	Sin competencia			Competencia				
	V $\pm$ s.e. (%)	Pm $\pm$ s.e. (%)	MDT $\pm$ s.e. (%)	F α	V $\pm$ s.e. ($\mu\text{g/ml}$)	Pm $\pm$ s.e. (%)	MDT $\pm$ s.e. (%)	F α
0,0	84,7 $\pm$ 3,4	1,4 $\pm$ 0,4	11,7 $\pm$ 0,1	F(MDT) = 6,40**	50,3 $\pm$ 3,0	16,0 $\pm$ 3,0	14,9 $\pm$ 0,2	F(Pm) = 2,48*
0,1	84,0 $\pm$ 2,1	1,1 $\pm$ 0,8	11,2 $\pm$ 0,7		43,7 $\pm$ 3,0	11,1 $\pm$ 3,4	14,6 $\pm$ 0,3	F(MDT) = 5,65**
1,0	85,1 $\pm$ 1,1	3,1 $\pm$ 0,6	11,6 $\pm$ 0,1		40,0 $\pm$ 2,8	21,4 $\pm$ 2,3	14,7 $\pm$ 0,4	
10,0	85,7 $\pm$ 2,7	2,3 $\pm$ 0,7	10,8 $\pm$ 0,1		38,3 $\pm$ 4,3	20,0 $\pm$ 1,6	14,3 $\pm$ 0,1	
100,0	90,6 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 1,0	10,7 $\pm$ 0,1		39,7 $\pm$ 3,1	24,9 $\pm$ 4,0	13,3 $\pm$ 0,2	

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. α . Todas las F se dan con 4 y 19 grados de libertad. s.e. = errores estándar.

Tabla II. Experimentos de sobreadición de cultivos en competencia con diferentes dosis de ecdisterona en *Drosophila melanogaster* (medias $\pm$ error estándar).

Dosis de ecdisterona ($\mu\text{g/ml}$)	Supervivencia absoluta		Total	% pupas muertas	Supervivencia total más pupas muertas	% larvas paradas	Tiempo desarrollo (días)	
	Dentro	Fuera					Dentro	Fuera
0,0	19,2 $\pm$ 2,2	28,8 $\pm$ 3,8	48,8 $\pm$ 3,7	4,9 $\pm$ 0,8	51,4 $\pm$ 3,6	43,4 $\pm$ 3,8	14,4 $\pm$ 0,2	18,6 $\pm$ 0,1
0,1	21,0 $\pm$ 1,3	23,8 $\pm$ 3,8	44,4 $\pm$ 2,8	4,0 $\pm$ 0,7	48,4 $\pm$ 2,4	36,0 $\pm$ 4,7	13,4 $\pm$ 0,3	18,5 $\pm$ 0,1
1,0	19,6 $\pm$ 2,7	29,2 $\pm$ 3,9	48,8 $\pm$ 4,2	7,4 $\pm$ 1,6	54,0 $\pm$ 4,4	45,4 $\pm$ 4,1	13,9 $\pm$ 0,2	19,2 $\pm$ 0,2
10,0	23,2 $\pm$ 3,5	17,8 $\pm$ 1,9	41,0 $\pm$ 4,2	15,9 $\pm$ 3,6	52,0 $\pm$ 4,6	28,3 $\pm$ 2,7	13,9 $\pm$ 0,1	18,0 $\pm$ 0,1
100,0	30,2 $\pm$ 1,4	2,6 $\pm$ 2,1	32,8 $\pm$ 1,7	28,0 $\pm$ 1,9	52,4 $\pm$ 2,8	8,8 $\pm$ 2,6	13,1 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,1
F (ANOVA) 4,19 d.f.	3,37*	15,4***	20,7***	20,7***	13,29***	5,74***	32,9***	

* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$

trado *in vitro* que la ecdisterona afecta a los procesos de metamorfosis y diferenciación (6), induciendo la morfogénesis en los discos imaginales mediante una acción directa en el genoma (15). Por lo tanto, se podría pensar que cualquier alteración en los niveles hormonales normales que condujera a una deficiencia en el último estadio larvario podría promover un alargamiento en el desarrollo de *Drosophila*. En este sentido, el efecto de los residuos larvarios de excreción, especialmente ácido úrico, en los cultivos de competencia (donde el espacio es reducido) podrían estar implicados en la alteración del cambio hormonal que controla la muda larva-pupa (5).

Un modo de probar este supuesto sería la determinación directa de los niveles de ecdisona en las larvas bajo condiciones normales y de estrés competitivo; sin embargo, existen dificultades de orden técnico (9, 13) especialmente derivadas del pequeño tamaño de las larvas de *Drosophila* que dificulta este tipo de aproximación experimental. Un modo alternativo, que debe considerarse como un estudio preliminar, es el estudio de los efectos producidos por la adición de un exceso de hormona, que puede llevarse a cabo bien por inyección de las larvas (6), o bien mediante la inclusión de la hormona en el medio de cultivo. Este último método presenta la ventaja de que no introduce ningún tipo de daño físico directo en las larvas. Algunos autores no han obtenido respuesta alguna tras la aplicación de la hormona a los medios de cultivo. En particular, SANG (14) explica que la falta de respuesta se debería a que la hormona sería destruida en parte en el tubo digestivo. Sin embargo, según nuestros experimentos, la adición de elevadas concentraciones de ecdisterona (más de 1 $\mu\text{g/ml}$) produce efectos significativos en el desarrollo larvario de *Drosophila melanogaster*. Los resultados (aumento en mortalidad pupal y aceleración de las tasas de desarrollo) son especialmente significati-

vos a dosis de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$). Si la hipótesis de SANG es cierta, debe concluirse que la ecdisterona se debe administrar en dosis lo suficientemente altas como para compensar la destrucción de la hormona en el tracto digestivo.

En los cultivos sometidos a competencia alimentaria todos los efectos dependientes de la adición de ecdisona parecen tener su origen en una pupación más temprana. La ecdisterona actuaría por lo tanto induciendo la pupación tan pronto como las larvas alcanzan el último estadio larvario. En cultivos sin competencia las larvas, que han crecido en condiciones óptimas, pueden estar perfectamente preparadas para pupar tan pronto como alcanzan el tercer estadio. Por el contrario, en competencia, las larvas sufren deficiencias nutritivas parciales (4) y se ven obligadas a ingerir sus propios residuos de excreción dado el reducido espacio en que se desarrollan (5), por lo que es obvio que no estarán fisiológicamente preparadas para sufrir una metamorfosis normal tan pronto como alcancen la última fase larvaria aun cuando el nivel de ecdisona las induzca a pupar. El aumento en la mortalidad pupal con el aumento en la concentración de ecdisona reflejaría este efecto.

Puesto que una dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$ de ecdisterona suprime casi completamente la existencia de larvas paradas, y el porcentaje de estas larvas decrece con el aumento de la concentración de ecdisona añadida al medio de cultivo, se podría especular que la parada larvaria es una consecuencia más o menos directa de deficiencia en ecdisona en larvas sometidas a competencia. En este caso, la detención del desarrollo larvario antes de la pupación sería obligatorio en situaciones de competencia por el alimento porque vendría impuesto por los bajos niveles de ecdisona. Por otra parte, esta detención podría tener también un significado adaptativo porque permite a la población que compite por el alimento esperar la eventual llegada de nuevos recursos tras un

cambio en las condiciones ambientales. En este último caso podrían completar su desarrollo normalmente sin sufrir merma alguna en su eficacia biológica. Esta idea es similar al mecanismo de escape en el tiempo propuesto por GILL (8), como respuesta poblacional frente a situaciones de competencia. Una inducción artificial de la pupación (por aporte de ecdisona del exterior) comprometería seriamente la supervivencia de la población larvaria como un todo por el concomitante aumento de mortalidad en una fase para la que no estaba fisiológicamente preparada (pupación).

Resumen

Dosis mayores de 1 $\mu\text{g/ml}$ de β -ecdisterona disminuyen la viabilidad desde la fase larvaria hasta adulto en *Drosophila melanogaster* y aumentan las tasas de desarrollo cuando se suministran al medio de cultivo en condiciones de competencia por el alimento. Además de este efecto, parece que a las dosis ensayadas más altas (100 $\mu\text{g/ml}$), suprime completamente el fenómeno de detención en el desarrollo larvario demostrado que ocurre en el tercer estadio larvario cuando hay competencia por el alimento. Por lo tanto, se puede deducir que las larvas que normalmente detienen su desarrollo en estas condiciones lo hacen por tener bajos niveles de ecdisona, y que quizás es éste el origen fisiológico de su detención en el desarrollo antes de llegar al punto de muda de larva a pupa.

Palabras clave: β -Ecdisterona, *Drosophila*, Desarrollo larval.

Bibliografía

1. Barker, J. S. F. y Podger, R. N.: *Ecology*, 51, 170-189, 1970.
2. Barrington, E. J. W.: In «An Introduction to General and Comparative Endocrinology». Clarendon Press. Oxford, 1975.
3. Becker, H. J.: *Chromosoma*, 10, 654-678, 1959.
4. Botella, L. M. y Mésua, J. L.: 9th European *Drosophila* Research Conference. Hungary, 1985, pp. 25.
5. Botella, L. M., Moya, A., González, C. y Mésua, J. L.: *J. Insect Physiol.*, 31, 179-185, 1985.
6. Burdette, W. y Anderson, R.: *Genetics*, 51, 625-633, 1965.
7. Clever, V.: *Develop. Biol.*, 6, 73-98, 1963.
8. Gill, D. E.: *Ecology*, 59, 1289-1291, 1978.
9. Mauchamp, B., Lafont, R. y Krien, P.: En «Juvenil Hormone Biochemistry». (G. E. Pratts y G. T. Brooks, eds.). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1981, pp. 168-172.
10. Mésua, J. L. y Moya, A.: *Heredity*, 51, 347-352, 1983.
11. Miller, R. S.: *Ecology*, 45, 132-148, 1964.
12. Moya, A. y Mésua, J. L.: *Dros. Inf. Serv.*, 59, 91-92, 1983.
13. Rembold, H.: En «Juvenile Hormone Biochemistry». (G. E. Pratts y G. T. Brooks, eds.). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1981, pp. 354-358.
14. Sang, J. H.: *Dross. Inf. Serv.*, 49, 111-112, 1972.
15. Siegel, J. G. y Fristrom, J. W.: En «The Genetics and Biology of *Drosophila*» (M. Ashburner y T. R. F. Wright, eds.). Vol. 2a. Academic Press. Londres. 1978.