



MX0500145

Congreso Internacional Conjunto Cancún 2004 LAS/ANS-SNM-SMSR/International Joint Meeting Cancun 2004 LAS/ANS-SNM-SMSR
XV Congreso Anual de la SNM y XXII Reunión Anual de la SMSR/XV SNM Annual Meeting and XXII SMSR Annual Meeting
Cancún, Q.R., México, 11-14 de Julio, 2004/Cancún, Q.R., Mexico, July 11-14, 2004

Efecto Sobre la Viabilidad en Poblaciones de *Drosophila melanogaster* Crónicamente Expuestas a Radón

Víctor M. Salceda

Departamento de Biología,

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Km.36.5 Carretera México-Toluca, Salazar, Edo. de México

vmss@nuclear.inin.mx.

Resumen

Se analizaron cuatro generaciones de una población de *Drosophila melanogaster* sometidas crónicamente a las siguientes concentraciones de radón: 30 ± 7 , 12 ± 2 , 43 ± 5 , 25 ± 7 , 14 ± 2 , 6 ± 2 , 78 ± 1 , 58 ± 5 y 74 ± 7 kB/m³ con dosis estimas de 1.209, 0.1, 2.088, 0.869, 0.156, 0.03, 3.18, 2.12 y 2.878 mGy por generación y sus respectivos testigos, a fin de determinar el efecto de la radiación en la inducción de genes detrimentales, midiendo además el efecto de la viabilidad con respecto a la fecundidad y la viabilidad diferencial en categorías de genes con efectos menores. Tanto la inducción de genes detrimentales como la distribución de la viabilidad con respecto a la fecundidad por categorías no mostraron efecto inductor debido al tratamiento con radón. Sin embargo, los cambios ocasionados por el tratamiento referentes a la fecundidad provocaron en tres de las cuatro comparaciones posibles resultados significativos en la producción de descendientes, mejorando la adecuación de las poblaciones, como ha sido demostrado por otros autores.

1. INTRODUCCIÓN

Es bien sabido que la exposición de organismos vivos a altas dosis de radiación produce mutaciones. También se sabe que la mayoría de las mutaciones son usualmente deletéreas para sus portadores al menos en condición homocigota y en ambientes donde las especies normalmente viven. Los procesos genéticos que ocurren en poblaciones irradiadas son, sin embargo, poco conocidos. Los trabajos pioneros de Wallace y King [1] y Wallace [2 y 3], han servido para enfatizar la necesidad de profundizar los estudios en este campo. Por otra parte los efectos de dosis bajas de radiación han provocado incertidumbre sobre todo al tratar de extrapolar la inducción de curvas de daño genético de altas a bajas dosis de radiación, pues existen evidencias acerca de que los efectos producidos por dosis bajas no son tan adversos de cómo inicialmente se pensaba [4].

También se sabe que los genes mutantes de poblaciones naturales de *Drosophila* se encuentran encubiertos por la heterocigosis cuando son recesivos y parcialmente ocultos si ellos son parcialmente recesivos, además, Crow [5] demostró en experimentos con *Drosophila* que las

mutaciones espontáneas causantes de disminuciones menores en viabilidad ocurren con mayor frecuencia que aquellos que causan efectos drásticos y que por otra parte aquellas mutaciones ligeras inducidas por radiación son menos frecuentes en relación con las letales. También se sabe que en los primeros intentos para analizar la distribución de frecuencias de mutaciones detrimentales estas se indujeron dos o tres veces mas frecuentemente que las letales, lo cual fue posteriormente demostrado por Friedman [6] analizando el cromosoma X de *D. melanogaster*.

Por lo anterior el presente trabajo tiene como propósito el contribuir al mejor entendimiento de los efectos genéticos de la radiación en poblaciones de *D. melanogaster*, mediante el análisis de la viabilidad diferencial entre individuos expuestos crónicamente a bajas dosis de radiación por emanaciones de radón en comparación con una población testigo y observar si las mutaciones recién inducidas, en condición heterocigota y homocigota pudieran incrementar la viabilidad de los homocigotos, así como la inducción de mutación de genes letales y semiletal portados en el segundo cromosoma de esta especie.

2. MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo es una extensión del realizado por Pimentel *et al.* [4] quienes establecieron dos poblaciones experimentales de *D. melanogaster* a partir de la cepa Canton-S, una que fungió como testigo, líneas T y la tratada, líneas R, sometidas crónicamente a emanaciones de una fuente de Pleschbenda en una cámara especialmente diseñada, en la cual según los autores [4] se produce gas radón a 41.4 kBq y las concentraciones de radón a que se sometieron las moscas corresponden a las medidas por dichos autores y contenidas en sus Tablas 1 y 2 y que corresponden a las concentraciones de radón: 30 ± 7 , 12 ± 2 , 43 ± 5 , 25 ± 7 , 14 ± 2 , 6 ± 2 , 78 ± 1 , 58 ± 5 y 74 ± 7 kBm³ y a las dosis estimadas de 1.209, 0.1, 2.088, 0.869, 1.56, 0.03, 3.18, 2.12 y 2.878 mGy respectivamente. De las generaciones por ellos generadas nosotros estudiamos las que corresponden a las generaciones 1, 3, 6 y 9 tanto testigos como tratadas, utilizando para ello machos adultos procedentes de sus conteos de viabilidad huevo adulto.

Nuestro método de prueba se basa en la técnica de detección de mutaciones letales en el segundo cromosoma de *D. melanogaster* descrita por Wallace [3]. Así en cada generación se tomaban machos y se cruzaban individualmente con hembras de la cepa CyL / Pm, con los marcadores genéticos específicos Cy (Curly = alas rizadas), L (Lobe = ojos con una escotadura) y Pm (Plum = ojos color ciruela), ampliamente usada por los genetistas.

De los descendientes de la primera generación de esta cruce se toma un macho de fenotipo CyL/+ el cual se cruza nuevamente con hembras vírgenes de la cepa Cy L / Pm y al emerger los adultos de esta segunda generación se seleccionan 5 parejas Cy L / + que se cruzan entre sí y se llevan a la tercera generación de prueba donde se obtienen descendientes, en proporción mendeliana, con los siguientes fenotipos: 2 Cy L / + : 1 + / + (silvestre), esta serie de cruces se esquematiza:

P macho +/+ X hembra Cy L /Pm
 F1 macho Cy L / + X hembra Cy L / Pm
 F2 machos Cy L / + X hembras Cy L / +
 F3 Cy L / Cy L (muere) 2 Cy l / +: 1 + / +

Los individuos de la tercera generación de prueba son contados por categoría en dos ocasiones a los 12 y 16 días después de que se inició el cultivo; aquellas líneas que no producen individuos silvestres (+ / +) son consideradas como portadoras de un gene letal recesivo que se mantiene en condición heterocigota en los individuos Cy L / +.

Al término de los conteos se hace la suma y se determina si el cromosoma extraído es o no portador de un gene letal y del total de la población se determina el por ciento de genes letales por generación y población.

De cada generación se tomó el número total de individuos producidos por cada cromosoma, se determinó el total y se obtuvo el promedio respectivo lo que constituye el promedio de fecundidad para esa generación. Esta información nos sirve para que de cada conjunto de datos una vez obtenido el promedio se calcule el por ciento de viabilidad con respecto a la fecundidad de cada cromosoma extraído y se determinan así categorías de viabilidad según la metodología descrita por Wallace y Madden [7] que define para este parámetro las categorías mostradas en la Tabla I.

Tabla I.- Diferentes categorías de viabilidad según Wallace y Madden [7].

Categoría	Por ciento de viabilidad
a- Letal	0 - 14
b- Semiletal	14.1 - 29
c- Subvital	29.1 - 49
d- Subnormal	49.1 - 69
e- Cuasinormal	69.1 - 85
f- Normal	85.1 - 114
g- Supernormal	114.1 o mas

Para determinar que tan significativas son las diferencias se aplicaron, según el caso, la prueba de "t " de Students o bien la de X^2 .

Todos los cultivos se incubaron a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ y se mantuvieron en frascos lecheros de 1/4 de litro con alimento a base de agar-harina de maíz-azúcar-levadura y antibióticos, para evitar contaminación, normalmente usado en el laboratorio.

3. RESULTADOS

3.1. Efecto Detrimental

Como resultado del procedimiento de prueba para detectar genes letales fue posible analizar un total de 1182 segundos cromosomas de los cuales 558 corresponden a las poblaciones testigo y 624 a las tratadas con emisiones de radón, de ellos se encontraron 102 cromosomas con efecto detrimental, suma de letales y semi-letales, en los testigos y 95 en los tratados, equivalentes al 18.28 % y 15.22 % respectivamente.

La Tabla II nos muestra en la primer columna la generación y población de que se trata; la segunda columna nos indica según Pimentel *et al* [4] las concentraciones de radón y las dosis estimadas por generación; incluyendo las correspondientes a las no analizadas por nosotros a fin de que se pueda conocer la dosis acumulada. Le sigue el número de cromosomas analizados, así como el número y frecuencia relativa de aquellos que demostraron ser normales, letales y semi-letales, también nos muestra el valor obtenido de las X^2 correspondientes a cada par de comparaciones según la categoría y su respectiva probabilidad $p \leq 0.001$. Pese a las diferentes fluctuaciones, según la generación probada, de las 16 comparaciones solo una demostró ser diferente significativamente, las comparaciones a que nos referimos son entre población testigo y tratada de cada generación.

3.2. Efecto de la Viabilidad con Respecto a la Fecundidad

Aparte de la información acerca de la frecuencia de genes detrimentales se obtuvo para cada cromosoma un número determinado de descendientes, producto de dos conteos, esta progenie es la que se procesa de manera tal que se tiene por generación para cada población el número total de individuos derivados del total de cromosomas extraídos, a ese valor se le saca el promedio de descendientes se calculó su error estándar al que se aplicó la prueba "t" de Students, así se determinó con ese valor para cada generación la existencia o no de diferencia significativa.

La Tabla III muestra estos valores así como las respectivas concentraciones de radón calculadas por generación incluyendo aquellas no probadas.

Tabla II.- Efecto detrimental en poblaciones experimentales de *Drosophila melanogaster*.

Población	kB/m ³	mGy	N	Normales		Letales		Semiletals	
T1		1.209	143	81.12	0.3935	11.19	1.2768	6.69	0.4547
R1	30±7		189	86.77		7.41		5.82	
		0.1							
	12±2								
T3		2.088	119	85.71	0.0660	10.92	0.6142	3.36	
								7.3514**	
R3	43±5		144	83.33		8.33		8.33	
		0.869							
	25±7								
		1.56							
	14±2								
T6		0.03	168	77.98	0.0458	9.52	0.0306	12.50	0.4762
R6	6±2		159	79.87		10.06		10.06	
		3.18							
	78±1								
		2.12							
	58±5								
T9		2.878	128	83.59	0.4136	9.38	1.8096	7.03	0.4456
R9	74± 7		133	89.47		5.26		5.26	

Esta tabla nos indica como varia durante el experimento el promedio de descendientes así como los casos en que la prueba estadística demostró la existencia de diferencias significativas, lo cual ocurrió en tres de cuatro generaciones.

Tabla III Efecto de la viabilidad con respecto a la fecundidad en poblaciones experimentales de *Drosophila melanogaster*.

Población	kB/m ³	mGy	Total	Promedio	Error estándar	Valor de "t"	p ≤ 0.001
T1		1.209	37705	263.67	11.04	0.0009224	**
R1	30±7		58712	310.65	10.28		
		0.1					
	12±2						
T3		2.088	28288	149.67	8.40	0.0807371	
R3	43±5		31787	196.44	8.76		
		0.869					
	25±7						
		0.156					
	14±2						
T6		0.03	32954	196.15	6.20	2.833e-06	***
R6	6±2		39452	248.13	9.41		
		3.18					
	78±1						
		2.12					
	58±5						
T9		2.878	22606	176.61	7.56	0.000798	**
R9	74±7		27765	208.76	6.72		

3.3. Distribución de la Viabilidad Diferencial con Respecto a la Fecundidad

Los efectos de genes menores con efecto débil, se analizan basándose en el porcentaje de descendientes por cromosoma con respecto al promedio poblacional por generación y con ellos se constituyen 7 diferentes categorías (a-g), el resultado de lo anterior se muestra en la Tabla IV. La tabla muestra las generaciones y tratamientos, el número de cromosomas analizados, el promedio poblacional, las frecuencias relativas de cromosomas de cada categoría, las concentraciones de radón a que fueron sometidas las moscas en cada generación incluyendo las generaciones no probadas así como los resultados de las diferentes comparaciones por pares de las diferentes categorías cuando se les aplicó la prueba X^2 y la indicación de cuales fueron diferentes significativamente a una $p \pm 0.001$.

4. DISCUSIÓN

4.1. Efecto Detrimental

Los efectos genéticos aquí mostrados, debido a la técnica empleada, se refieren exclusivamente a aquellos detectados en el segundo cromosoma y los daños que estos cromosomas ocasionan a sus

portadores cuando son transmitidos de generación en generación. Los análisis acerca de genes letales dominantes y efectos somáticos causados por la radiación quedan excluidos. Según nuestras consideraciones en la prueba de homocigosis solo se toman en cuenta las frecuencias de genes letales y semiletalales recesivos del segundo cromosoma.

Dado que la administración de emanaciones de radón consisten en bajas dosis de radiación los efectos letales detectados no fueron de consideración pues a lo largo del estudio los efectos producidos en cuanto a inducción de este tipo de daño no mostraron ser significativos, ya que en ambas poblaciones las frecuencias de este tipo de genes solo presentaron pequeñas fluctuaciones, como se menciona mas adelante, las que aparentemente no alteran el equilibrio en lo que a las frecuencias de este tipo de genes se refiere.

Los ligeros cambios ocurridos de generación en generación parecen indicar que los daños producidos permitieron el efecto de la selección natural y así, en la siguiente generación no se manifestó una acumulación de daño. Esto también ha sido observado en poblaciones expuestas a altas dosis de radiación, en las cuales una vez producida una frecuencia alta de genes letales, esta se mantiene en su límite superior aún cuando la irradiación se mantenga y solo al cesar esta la población entra en relajación y vuelve a su frecuencia casi normal, dado que por efecto de la selección natural los genes letales son eliminados de la población, como fue observado por Mourad [8 y 9] y Sankaranarayanan [10].

Tabla IV. Distribución de las diferentes categorías de genes en poblaciones experimentales de *Drosophila melanogaster*.

Población	kB/m ³	mGy	n	A	b	c	d	e	f	g
T1		1.209	148	4.05 0.987	1.35 17.086***	15.54 5.0628*	9.46 0.8580	16.89 0.1349	16.89 1.0147	35.81 0.0100
R1	30±7		195	2.05	6.15	6.67	12.31	15.38	21.03	36.41
		0.1								
	12±2									
T3		2.088	119	1.68 0.987	2.52 0.3585	6.72 3.8585*	9.24 3.0861	17.65 1.1270	31.09 2.1469	31.09 0.0232
R3	43±5		144	2.08	3.47	11.81	14.58	13.19	22.92	31.94
		0.869								
	25±7									
		0.156								
	14±2									
T6		0.03	168	0.60 74.14***	2.98 2.0472	6.55 0.8146	16.67 4.6349*	14.88 0.0048	25.60 0.4757	32.74 0.1022
R6	6±2		165	7.27	5.45	4.24	7.88	15.15	29.09	30.91
		3.18								
	78±1									
		2.12								
	58±5									
T9		2.878	128		4.69 0.1844	11.72 0.0081	17.9 7.9467**	15.63 0.2821	21.09 14.125**	28.91 0.2320
R9	74±7				3.76	12.03	6.02	13.53	38.35	26.32

En cuanto a estudios con dosis altas suministradas en forma aguda, una sola exposición, Kwon y Sperlich [11] observaron un fuerte incremento en la inducción de letales, pero no mencionan nada con respecto a lo que ocurre cuando se suspende el tratamiento con relación a si se mantuvieron o no en las siguientes generaciones las frecuencias de genes letales inducidas.

Las fluctuaciones en frecuencia de genes letales, por nosotros observadas fueron a partir de la primera generación para la población testigo T1= 13.30 % en tanto que para la tratada R1= 18.88 % mostrando, como era de esperar, un incremento por la exposición a las emanaciones del radón. En la siguiente generación de prueba, tercera de exposición, la frecuencia de letales en la población testigo aumento a 14.29 % en tanto que en la población tratada disminuyó a 16.67 %. En la sexta generación, poblaciones T6 y R6 presentaron un aumento de las frecuencias con valores observados de 22.02 % y 20.13 % respectivamente. Finalmente, en la novena generación las frecuencias obtenidas fueron para T9 16 % y para R9 10.53 %. Durante todo el estudio, las frecuencias en ambas poblaciones presentaron un promedio similar de 7.64 % para la población testigo y de 7.36 % para la tratada. Un comportamiento similar se observó con respecto a las frecuencias de genes semiletals y consecuentemente lo mismo ocurrió con la suma de ambos tipos de genes detrimentales. En todos los casos al aplicar la prueba estadística de X^2 las diferencias no fueron significativas.

4.2. Efecto de la Viabilidad con Respecto a la Fecundidad

Este análisis consistió en evaluar el promedio de descendientes dejados por 5 parejas de cada cromosoma extraído lo cual se muestra en la Tabla III representándose los valores promedio obtenidos así como su error estándar y el resultado de la prueba estadística "t" de Students aplicada. Aunque aparentemente los promedios muestran una tendencia a disminuir gradualmente, lo que es muy probablemente reflejo del diferente número de cromosomas analizado por generación, al aplicar la prueba estadística mencionada dio como resultado que 3 de las comparaciones mostraran ser significativas a una $p \leq 0.001$. esto nos indica que la adecuación de las poblaciones al ser expuestas a las emanaciones de radón sufrió un incremento. Este fenómeno ha sido también observado por otros autores, así, Ayala [12 y 13] observó un incremento en la productividad, equivalente en nuestro caso a la fecundidad, en poblaciones de *Drosophila serrata* y *Drosophila birchi* irradiadas antes de iniciar el experimento con un promedio de 4000r para los machos y de 2000r para las hembras fundadores de las poblaciones y mediante la metodología de transferencia seriada observó en los primeros 6 censos una disminución en el tamaño de la población, en los censos posteriores y hasta el 19avo observó un incremento en el tamaño de la población donde alcanzaron el límite superior el cual no varió hasta el fin del estudio.

4.3. Distribución de la Viabilidad Diferencial con Respecto a la Fecundidad

Cuando los efectos de genes individuales son débiles, se observa ligera disminución de la viabilidad o número de descendientes, pero ocurren con mayor frecuencia. La acumulación de los efectos detrimentales es importante y este puede ser medido cuando los cromosomas portadores de estos genes se hacen homocigotos ya sea por consanguinidad o bien experimentalmente mediante sistemas de cruce como en nuestro caso y de esa manera podemos observar la distribución de la viabilidad diferencial en condición homocigota. Wallace y Madden [7] en el cromosoma II y Drescher [14] en el X de *D. melanogaster*, aplicando procedimientos similares demostraron la alta variabilidad existente al analizar la viabilidad diferencial misma que forma parte de la carga genética mutacional. Estos autores agruparon en categorías porcentuales las viabilidades individuales de los diferentes cromosomas por ellos analizados y construyeron las

tablas y gráficas de distribución de esas categorías. De manera similar nosotros determinamos las viabilidades diferenciales a partir de los promedios de cada población y establecimos 7 clases, determinando para cada población la frecuencia de cada una de ellas mismas que se presentan en la Tabla III en la que se muestran para cada población y generación el número de cromosomas analizados, el número y porcentaje de genes por categoría y el resultado de la prueba estadística X^2 aplicada a cada una de las 27 pares de comparaciones de las cuales 7 mostraron ser diferentes significativamente a un nivel de probabilidad $p \leq 0.001$.

5. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los datos obtenidos y conforme a la metodología empleada se puede concluir que: para el efecto ditrimental, al menos en las poblaciones estudiadas, la dosis baja de radiación por la emisión de radón no fue lo suficientemente alta como para inducir cambio substancial en la frecuencia de genes letales recesivos, aún cuando la exposición se llevó a cabo en 9 generaciones, lo que impide que estos se acumulen en la población, asimismo no alterar el monto de la carga genética.

En cuanto al efecto de la viabilidad con respecto a la fecundidad se demostró que la aplicación de radiación aumenta la productividad de las poblaciones y por ende su adecuación. En un estudio paralelo al presente, Pimentel *et al.* [4] llegó a las mismas conclusiones: que las poblaciones irradiadas mejoran el valor de la viabilidad, en términos de viabilidad huevo adulto.

En lo que se refiere a la distribución de la viabilidad diferencial con respecto a la fecundidad, únicamente en 7 casos, se presentaron diferencias que permiten concluir que los efectos producidos por la emanación de radón, no provocan daño substancial deletéreo en las poblaciones estudiadas con respecto a los testigos.

REFERENCIAS

1. Wallace B and JC King, "Genetic changes in populations under irradiation", *Am. Naturalist*, **85**, p. 209-222 (1951).
2. Wallace B, "Genetic changes within populations after X-irradiation", *Genetics*, **36**, p. 612-628 (1951).
3. Wallace B, "Studies on irradiated populations of *Drosophila melanogaster*", *J. Genet.*, **54**, p. 280-293 (1956).
4. Pimentel E, L Tavera, MPCruces, M Balcázar and ME de la Rosa, "Low radon-dose effect on fecundity and egg-to-adult viability of *Drosophila*", *Radiation Measurements*, **36**, p. 511-516 (2003).
5. Crow JF, "Minor viability mutants in *Drosophila*", *Genetics*, **92S**, p. 165-172 (1979).
6. Friedman LC, "X-ray induced sex-linkage lethal and detrimental mutations and their effect on the viability of *Drosophila melanogaster*", *Genetics*, **49**, p. 689-699 (1964).
7. Wallace B and CV Madden, "The frequencies of sub and supervitals in experimental populations of *Drosophila melanogaster*". *Genetics*, **38**, p. 456-470 (1953).
8. Mourad AEKM, "Effects of irradiation in genetically coadapted systems", *Genetics*, **47**, p. 1647-1662 (1962).

9. Mourad AEKM, "Lethal and semilethal chromosomes in irradiated experimental populations of *Drosophila melanogaster*", *Genetics*, **50**, p. 1279-1287 (1964).
10. Sankaranarayanan K, "Genetic loads in irradiated experimental populations of *Drosophila melanogaster*", *Genetics*, **50**, p. 131-150 (1964).
11. Kwon YE and D Sperlich, "Developmental time at which spontaneous, X-ray induced and EMS-induced recessive lethal mutations become effective in *Drosophila melanogaster*", *Genet. Sel. Evol.*, **24**, p. 473-486 (1992).
12. Ayala FJ, "Evolution of fitness. I. Improvement in the productivity and size of irradiated populations of *Drosophila serrata* and *Drosophila birchii*", *Genetics*, **53**, 883-895 (1966).
13. Ayala FJ, "Evolution of fitness. III. Improvement of fitness in irradiated populations of *Drosophila serrata*", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **58**, p. 1919-1923 (1967).
14. Drescher W, "The sex limited genetic load in natural populations of *Drosophila melanogaster*", *Am. Nat.*, **98**, p. 167-171 (1964).