

Análisis de similitud cromosómica según patrones de bandas G en cuatro especies chilenas de *Phyllotis* (Rodentia, Cricetidae)

Analysis of chromosomal similarity according G- banding patterns in four chilean species of *Phyllotis* (Rodentia, Cricetidae)

ANGEL E. SPOTORNO, LAURA WALKER B.

Laboratorio de Citogenética de Mamíferos, Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Santiago-Norte, Universidad de Chile, Casilla 6556, Santiago 7 - Chile

(Recibido para publicación el 3 de diciembre de 1977)

SPOTORNO, A.E., WALKER, L. Análisis de similitud cromosómica según patrones de bandas G en cuatro especies chilenas de *Phyllotis* (Rodentia, Cricetidae). (Analysis of chromosomal similarity according G banding patterns in four chilean species of *Phyllotis* (Rodentia, Cricetidae)). Arch. Biol. Med. Exper. 12, 83-90, 1979.

An analysis of chromosomal sequences of G- bands of *Phyllotis* species expressed through phenograms shows great similarity in *P. darwini*, *P. magister* and *P. osgoodi*, being *P. micropus* the least similar but having eight or nine similar chromosomes. This agrees with the taxonomic distinctions and present geographic distribution. Most chromosomal changes detected involves whole arms, suggesting they are functional units specially when the fundamental number is constant or even when is not.

CHROMOSOMAL SIMILARITY *PHYLLOTIS* PHENOGRAMS FUNDAMENTAL NUMBER G-BANDS

Uno de los objetivos permanentes de la citogenética comparada es establecer las posibles correlaciones y nexos entre la diferenciación cariotípica de un grupo y los patrones de evolución de las especies que portan esos cariotipos. El alcance de un análisis cariotípico aplicado al problema evolutivo dependerá, en gran medida, de la magnitud de la información recogida y de los procedimientos de sistematización y comparación de los datos.

La diversidad cromosómica detectada en la mayoría de los grupos de mamíferos ha sido descrita fundamentalmente a través de dos variables principales: el número diploide (2n) y el número fundamental de brazos (NF) que usualmente es igual al número de brazos visibles

(NA) (1). Ocasionalmente es posible utilizar la morfología de ciertos cromosomas marcadores, *i.e.*, aquellos particularmente identificables ya sea por tamaño, posición del centrómero (2), presencia de constricciones secundarias y/o regiones heterocromáticas, como también aquellos ligados a mecanismos genéticos, como es el caso de los cromosomas sexuales y de los cromosomas B (3). Así el análisis cariotípico se realiza con no más de un centenar de unidades de información por cariotipo y frecuentemente con menos de la mitad de esta cifra.

La nueva y reciente información obtenida a través de las distintas técnicas de bandeado cromosómico aumenta las cifras anteriores en casi un orden de magnitud. Por ejemplo, el cariotipo

humano presenta entre 300 y 3.000 bandas G constantes y repetibles de célula en célula y de individuo en individuo, obtenidas a través de una sola técnica de bandeado (4).

Al efectuar comparaciones entre cariotipos bandeados G de especies relacionadas, es posible confrontar los datos obtenidos con el objeto de detectar las similitudes y, por contraste, las diferencias atribuibles al proceso de divergencia cromosómica que interesa inferir. En trabajos previos hemos realizado tal confrontación (5), utilizando procedimientos que permiten comparar en forma ordenada patrones cromosómicos de bandas G (6). Presentaremos ahora el desarrollo de un análisis de similitud de bandas G en cuatro especies emparentadas de roedores chilenos pertenecientes al género *Phyllotis*. Utilizaremos para ello: a) datos provenientes de los trabajos anteriormente mencionados, en los que se describen y comparan los patrones de bandas G de *P. darwini* ($2n = 38$, NF = 76); *P. magister* ($2n = 38$, NF = 76); *P. osgoodi* ($2n = 40$, NF 76); b) datos recientes provenientes del análisis de los patrones de bandas G de *P. micropus*. Presentaremos, además, una nueva forma gráfica de sintetizar tales comparaciones. Se trata de un fenograma, definido como un diagrama que expresa afinidades según el grado de similitud observado, en nuestro caso específico en las secuencias de bandas G de distintos cromosomas, y que no contiene ningún otro tipo de información (7). Tal diagrama nos permitirá apreciar la magnitud de la estabilidad y la divergencia cromosómica, detectada a través de la aplicación de estos nuevos métodos.

MATERIAL Y METODOS

Animales. Parte del material utilizado está documentado extensamente en otras publicaciones (8, 6). El material de *P. micropus* fue colectado por personal de la Universidad Austral en el fundo Rucapangui (cerca de la ciudad de Valdivia) y facilitado gentilmente por el Sr. Milton Gallardo. Aparece temporalmente con los números 414 (macho) y 425 (hembra) en nuestra colección y serán depositados en forma definitiva en la colección de la Universidad Austral.

Técnicas citogenéticas. Los cromosomas se obtuvieron de médula ósea según técnicas convencionales. Se sometieron posteriormente a la técnica para obtención de bandas G descrita por Chiarelli (9) y modificada en nuestro laboratorio: las preparaciones fueron sumergidas en solución de Hank, libre de Ca^{++} y Mg^{++} , pH 6.0, durante 15 minutos y luego en una solución de tripsina 0.5%, pH 5.5, a tempera-

tura ambiente por 15 a 20 segundos. Después de lavarlas en agua, se tiñeron en Giemsa 2% durante 15 minutos.

La adjudicación de un determinado patrón de bandas G a cada par cromosómico fue posible mediante el montaje de numerosos cariotipos. Cabe señalar que factores tales como la contracción de los cromosomas y la acción de la tripsina, producen diferencias en el número de bandas en las distintas metafases. Esto último es especialmente notorio en los cromosomas medianos y pequeños, lo que dificulta la construcción de idiogramas bandeados y las comparaciones interespecíficas (10). Los resultados que se muestran en las microfotografías son cariotipos bandeados escogidos y que, sin embargo, no contienen toda la información obtenida; compárense, por ejemplo, los cromosomas bandeados de la misma especie, identificados como iguales en las figuras 1 y 2.

Nomenclatura cromosómica. Los cromosomas de cada especie se designan según la nomenclatura de la Conferencia de París de 1971, (Suplemento 1975) (11), es decir, precedidos por un trío de letras: la primera, en mayúscula, es la inicial del género y las otras dos, en minúsculas, las primeras letras del nombre de la especie, siguiendo la sugerencia hecha por Hsu (12). Los brazos cromosómicos se designan según la Conferencia de Chicago de 1966 (13), *p* para brazo corto y *q* para brazo largo.

Nomenclatura analítica. El análisis de similitud cromosómica se realizó utilizando una versión revisada de los conceptos operacionales propuestos inicialmente por Spotorno (14) para especificar correspondencias de bandas G en distintos cromosomas de distintas especies: a) *Cromosomas de correspondencia total* son aquellos del mismo tamaño que presentan las mismas bandas G en número y grosor. Pueden ser cromosomas *iguales* si tienen la misma secuencia de bandas o cromosomas *similares* si las mismas bandas están en alguna otra secuencia. b) *Cromosomas de correspondencia parcial* son aquellos que tienen algún sector en común, caracterizado por presentar las mismas bandas en la misma secuencia. c) *Cromosomas únicos* (o de correspondencia nula) son aquellos en que no se detecta ninguna correspondencia de bandas.

RESULTADOS

Phyllotis (Loxodontomys) micropus tiene un $2n = 34$ y predominio de cromosomas telocéntricos, excepto un par de metacéntricos pequeños (Fig. 1). El número de brazos cromosómicos es de 36 en las hembras y 37 en los machos, ya que el cromosoma Y aparece como submetacéntrico. Estos resultados concuerdan parcialmente con los publicados por Venegas (15). Este autor describe en individuos colectados en Malleco y Aysén, un cariotipo $2n = 34$ y NF = 36 para machos y hembras, identificando el cromosoma Y como un telocéntrico pequeño. Creemos que nuestra identificación de los cromosomas sexuales mediante morfología y patrón de bandas G es inequívoca (Fig. 1).

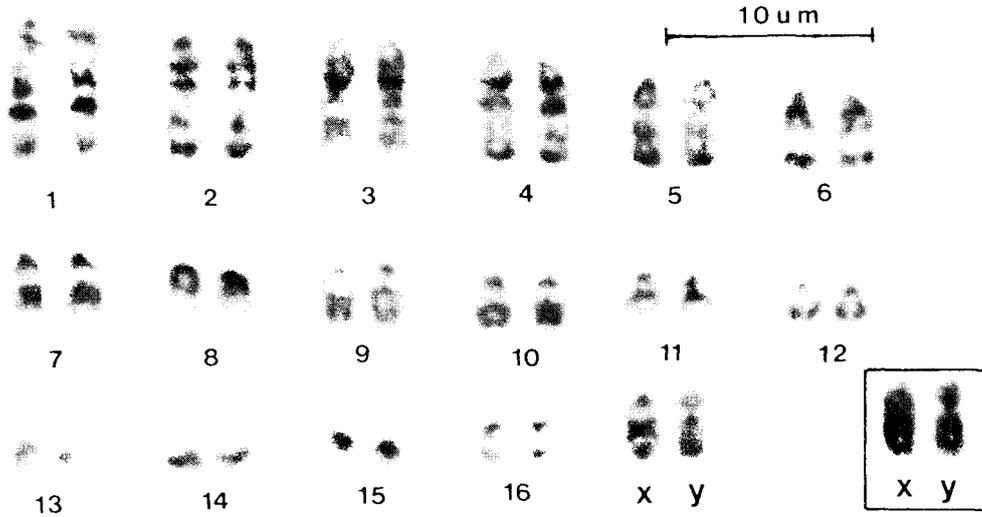


Fig. 1. Cariotipo bandeado G de *P. micropus*. Los cromosomas están ordenados y numerados según tamaño y morfología. En recuadro, los cromosomas sexuales teñidos con Giemsa corriente.

Comparación y análisis de correspondencia de bandas G. Al comparar morfología y especialmente patrones de bandas G de los cromosomas de *P. micropus* con los de *P. osgoodi*, *P. darwini* y *P. magister*, aparecen correspondencias entre las secuencias de bandas de ocho cromosomas de *P. micropus* y las de diversos

cromosomas o brazos cromosómicos de algunas o todas las otras especies señaladas. Estas correspondencias se ilustran en la figura 2. A partir de tales comparaciones se construyó una tabla de correspondencias por cromosomas o brazos cromosómicos, utilizando la numeración respectiva del cariotipo de cada especie (Tabla I).

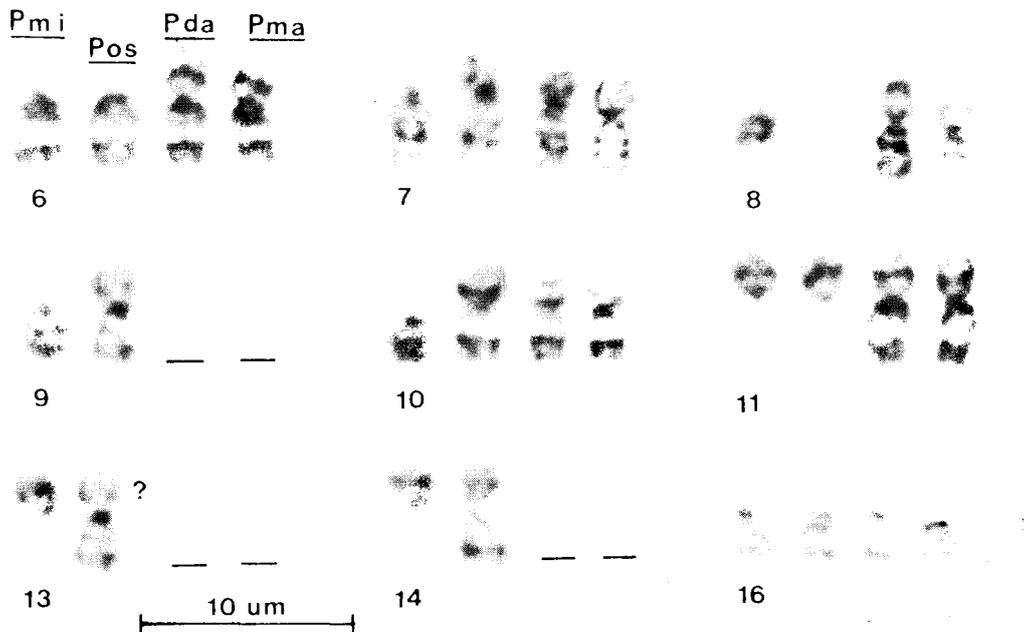


Fig. 2. Cromosomas y brazos cromosómicos correspondientes de *P. micropus* (*Pmi*), numerados, *P. osgoodi* (*Pos*), *P. darwini* (*Pda*) y *P. magister* (*Pma*).

TABLA I
Correspondencia según secuencia de bandas G entre cromosomas y brazos cromosómicos de *P. micropus* (*Pmi*),
P. osgoodi (*Pos*), *P. darwini* (*Pda*) y *P. magister* (*Pma*)

A) Cromosomas y brazos cromosómicos correspondientes, ubicados en la misma columna															
<i>Pmi</i>	?	11	6	?	?	?	7	13?	9	14	?	?	?	?	8
<i>Pos</i>	1	19	18	?	2q	3p	3q	4p	4q	5p	?	?	?	?	?
<i>Pda</i>	1	2p	2q	3p	3q	4p	4q	?	?	?	5p	5q	6p	6q	?
<i>Pma</i>	1	2p	2q	3p	3q	4p	4q	?	?	?	5p	5q	6p	6q	?
<i>Pmi</i>	?	10	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	16 ?
<i>Pos</i>	6p	6q	7p	10q	?	9	10p	7q	11	?	23	14	?	?	16 17
<i>Pda</i>	7p	7q	8p	8q	9	10	11p	11q	12	13	14	15i	16	17	18
<i>Pma</i>	?	7q	8p	8q	9	?	11p	11q	12	13	14	15	16	17	18
B) Cromosomas y brazos cromosómicos únicos															
<i>Pmi</i>	1	2	3	4	5	12	15	X	Y						
<i>Pos</i>			2p	5q	8	12	15	X	Y						
<i>Pda</i>								X	Y						
<i>Pma</i>						7p	10	X	Y						

Se utilizó la numeración propia de cada cariotipo. p = brazo corto; q = brazo largo; i = inversión; q = deleción en brazo q; | = centrómero; ? = correspondencia no detectada.

En ella aparecen otras correspondencias ya publicadas (5, 6). La morfología y secuencia de bandas G aparece igual sólo para un cromosoma en las cuatro especies: N° 16 de *micropus* y *osgoodi*, N° 17 de *darwini* y *magister*. Para otros cromosomas de *Pmi* se encontró correspondencia total con cromosomas de *osgoodi* y correspondencia parcial con brazos cromosómicos de *darwini* y *magister*: *Pmi* 6 y *Pmi* 11 corresponden a *Pos* 18 y *Pos* 19, respectivamente, y a los brazos q y p de *Pda* 2 y *Pma* 2. Correspondencias parciales se establecen entre los cromosomas telocéntricos de *micropus* y brazos de los cromosomas meta-céntricos de las otras especies: a) *Pmi* 7 y *Pmi* 10 encuentran correspondencia con brazos largos de cromosomas de *osgoodi*, *darwini* y *magister*. *Pmi* 7 corresponde a *Pos* 3q, *Pda* 4q y *Pma* 4q; *Pmi* 10 corresponde a *Pos* 6q, *Pda* 7q y *Pma* 7q. b) *Pmi* 8 encuentra sus correspondientes en brazos largos de cromosomas presentes en *darwini* y *magister*: *Pda* 6q y *Pma* 6q. c) Otros cromosomas se corresponden con brazos q o p de cromosomas presentes sólo en *osgoodi*: *Pmi* 14 se corresponde con *Pos* 5p; *Pmi* 9 con *Pos* 4q. La correspondencia de *Pmi* 13 con el brazo corto de *Pos* 4 aparece probable aunque el material de que disponemos y el escaso número de bandas presentes en este pequeño cromosoma, no nos permite asegurarlo.

No hemos detectado ninguna correspondencia para las secuencias de bandas de varios cromosomas de *P. micropus*: pares N° 1, 2, 3, 4, 5, 12, 15, X e Y.

Construcción de fenogramas. La extensión y magnitud de las correspondencias de bandas G detectadas entre los cromosomas de las especies analizadas pueden servir para el diseño de fenogramas que presenten tales correspondencias de manera parsimoniosa, es decir, con la menor cantidad posible de repeticiones. La figura 3 muestra dicho fenograma para todos los cromosomas de tres especies: *darwini*, *magister* y *osgoodi*. Fue construido sobre la base de las correspondencias anotadas en la tabla I. Los seis cromosomas correspondientes iguales en las tres especies se anotaron en la primera línea inicial común de la izquierda. El primer nodo separa a *Pos* porque *Pda* y *Pma* poseen además otro ocho cromosomas correspondientes iguales; en cambio *Pos* y *Pda* tienen sólo dos cromosomas correspondientes iguales adicionales, unidos por línea interrumpida, y uno similar (*Pda* 15). La restante dupla, *Pos* y *Pma* presenta sólo un cromosoma correspondiente igual adicional (*Pos* 14), además de los ya anotados al comienzo. En resumen, en el internodo están anotados los comunes iguales en *Pda* y *Pma* con sus correspondientes parciales en la línea de

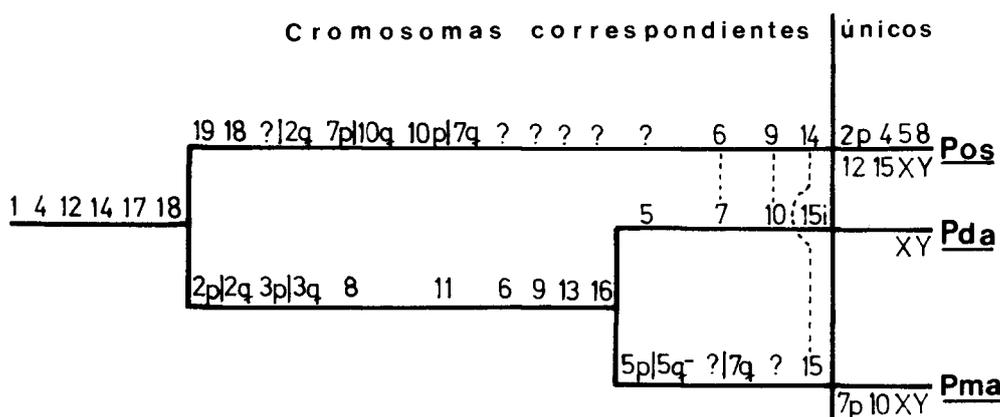


Fig. 3. Fenograma de cariotipos bandeados G de tres especies de *Phyllotis*. Los cromosomas de correspondencia total o parcial están anotados a la izquierda de la vertical. Tales cromosomas se denominan con nomenclatura referida a *Pda*, exceptuando la línea específica de *Pos*. Los únicos se denominan con la nomenclatura de la especie (véase tabla 1 y texto).

Pos, si se los detecta, relacionándose dichas correspondencias en sentido vertical. El segundo nodo origina las líneas específicas para ambas especies, distinguiéndose los cromosomas que presentan alguna correspondencia de aquellos en que no se detecta ninguna (cromosomas únicos).

El segundo fenograma (Fig. 4) contiene información de las cuatro especies. Fue construido

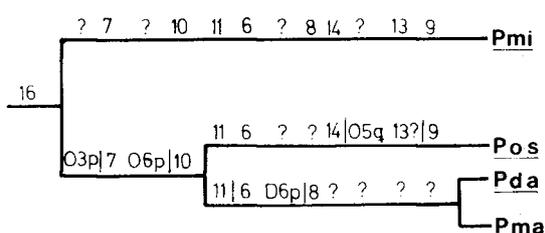


Fig. 4. Fenograma de correspondencias cromosómicas en cuatro especies de *Phyllotis*. Los números designan cromosomas referidos a *Pmi* si aparecen solos, a *Pos* si se anteceden por la letra O, y a *Pda* si se anteceden por D (véase tabla 1 y texto).

do a través del mismo método, aunque esta vez utilizando sólo las correspondencias encontradas al comparar los cromosomas de *Pmi* con los de otros cariotipos (Tabla I, figura 2). La nueva información no altera el ordenamiento anterior, puesto que *Pda*, *Pma* y *Pos* presentan un grado de similitud cromosómica notoriamente mayor entre ellos que el de cada uno comparado sepa-

radamente con *Pmi*. Por tanto, la configuración de líneas y nodos que representa la similitud cromosómica entre *Pda*, *Pma* y *Pos* se mantiene igual a la del primer fenograma. La ubicación de los cromosomas de *Pmi*, a lo largo de la línea superior refleja las relaciones de correspondencia de cada uno de ellos. Obsérvese cómo, en casi la totalidad de los casos, las correspondencias se establecen entre cromosomas telocéntricos de *micropus* y brazos enteros de cromosomas metacéntricos de las otras especies, i.e., los seis cromosomas cuyos brazos aparecen separados por una línea vertical. Creemos que la topografía de ambos fenogramas, determinada por la ubicación de los subconjuntos cromosómicos, expresa con fidelidad los grados de similitud de los cariotipos bandeados.

DISCUSION

La primera interpretación que se desprende de nuestros resultados es la evidente conservación de secuencias completas de bandas G, a pesar de las diferencias cariotípicas específicas.

Este conservantismo de ciertas secuencias de bandas cromosómicas, resistentes al cambio, o que en las variantes tienen probablemente un valor selectivo menor, ha sido extensamente documentado en *Drosophila* (16) y recientemente en varios grupos de mamíferos (17, 18). Lo que se destaca en nuestros resultados es que

tal conservantismo no sólo involucra simples secuencias de bandas sino preponderantemente brazos completos. Este hecho corrobora la hipótesis acerca de la preponderancia de mecanismos robertsonianos en la evolución del grupo phyllotino (19, 5, 6). Señala, además, el importante rol funcional de centrómeros y telómeros, explicando el indudable valor descriptivo del número fundamental (número de telómeros) (1) y del número diploide (número de centrómeros), así como la utilidad de ambos como indicadores de cambio cromosómico (20).

En conjunto, esto sugeriría que en grupos que tienen NF constante el brazo cromosómico se comportaría como una unidad funcional; más aún, esto podría extenderse a grupos de NF variable como lo muestran nuestros resultados en *P. micropus*.

El siguiente nivel de interpretación se refiere al hecho de que tales semejanzas permiten detectar, por contraste y con bastante precisión, las diferencias ocurridas en el proceso de divergencia. Aquí la dificultad reside en el tipo de supuestos que hay que adoptar para intentar separar aquellas diferencias producidas en el origen mismo de las especies ("splitting") de aquellas producidas en la divergencia posterior independiente de cada especie (21). En cualquier caso, los resultados encontrados permiten afirmar que tales diferencias son de distinta magnitud que las detectadas por los métodos anteriores al bandeo, lo que concuerda con lo planteado en la introducción respecto del nuevo contenido informacional de las bandas. Al mismo tiempo, revelan las limitaciones del $2n$ y el NF como indicadores citogenéticos suficientes, ya que sobreestiman o subestiman la magnitud del cambio cromosómico producido.

Las implicaciones taxonómicas de estos hechos son importantes, porque amplían el número y la cantidad de caracteres de valor diagnóstico tal que permiten distinguir taxones (7).

Respecto del análisis específico de relaciones entre las especies aquí estudiadas, estimamos que las similitudes y diferencias encontradas en los distintos cariotipos deben reflejar de alguna manera sus relaciones genealógicas por ancestro. Sus posiciones en los fenogramas deben ser consideradas como proposiciones susceptibles de ser analizadas y/o modificadas recurriendo a supuestos taxonómicos adicio-

nales, y comprobadas mediante el examen de otros caracteres. Sin embargo podemos adelantar que la alejada posición de *P. micropus* y la unidad de las otras tres especies ya tienen reconocimiento taxonómico previo a nivel de subgénero (22). La distribución geográfica también es compatible con la presente información citogenética, ya que *P. micropus* presenta distribución austral y las otras tres se distribuyen en los Andes Centrales (8, 22).

Hemos centrado nuestra atención en la descripción y el análisis de la mayor cantidad posible de correspondencias cromosómicas razonablemente detectables, porque creemos que tales conceptos operacionales tienen relación con conceptos teóricos como los de homología genética, y ello es ciertamente un avance hacia el desarrollo de indicadores más confiables y de proposiciones más rigurosas respecto del origen y la evolución de grupos animales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con ayuda del Proyecto N° 4159-r, Servicio de Des. Cient., U. de Chile; del Programa Multinacional de Genética OEA-Chile y del Proyecto Especial de Citogenética OEA.

Queremos agradecer finalmente al Prof. Dr. Raúl Fernández-Donoso su valiosa crítica y constante estímulo durante todo el desarrollo de este trabajo.

SUMMARY

Karyotype morphological features had extensively been used for taxonomic analysis and to infer phylogenetic relationships between carrier species. Nevertheless, the amount of such information per karyotype is rather scarce. The new banding techniques allows an unequivocal identification of each chromosome as a unique, constant sequence of bands, increasing the number of information bits and the reliability of comparisons. Detection of chromosomal similarities and differences is thus improved. In this work, we show a complete similarity analysis using chromosomal G-bands of four species of Chilean rodents, genus *Phyllotis*: *P. darwini*, *P. magister*, *P. osgoodi* and *Phyllotis micropus*. G-bands were obtained using Chiarelli techniques and banded karyotypes

were compared trying to detect chromosomal correspondences between sequences of bands. We distinguish *equal chromosomes* between species with total correspondence of bands and same morphology, chromosomes with *partial* correspondence in a certain sequence of bands and *unique chromosomes* for a given species. There is a great similarity in band sequences from chromosomes of the first three species named when correspondences are ordered as in Table I, being *P. micropus* the least similar (Fig. 1). Nevertheless, it is possible to find some correspondences for eight or possible nine of its chromosomes in all or some of other species (Fig. 2). They can be represented through phenograms (Fig. 3 and 4), diagrams expressing the amount of observed similarities through its topology. Chromosome sub-sets were used to built phyletic lines assuming parsimony.

A chromosomal phenogram, as in Fig. 3, is a complete comparative description of karyotypes from these species in terms of G-bands and can be related with its real genealogy, but here is considered only as a proposition which should be further analysed with additional assumptions and tested with other characters. Nevertheless the present cytogenetic data agree with previous sub-generic distinctions and present geographical distribution of such taxa.

On the other hand, the described chromosomal correspondences involves not only whole sequences of bands but whole arms, confirming and detailing the important role of robertsonian mechanisms in the chromosomal evolution of the group. This also suggest a functional role for telomeres and centromeres which can help to explain the descriptive and predictive power of NF and $2n$. Thus, in groups with constant NF, the whole arm behaves as a functional unit; moreover, this happens even when NF changes, as suggested by our results in *P. micropus*. Anyway, an important chromosomal conservatism of bands sequences from divergent taxa

is stressed, even when there is great karyotypic change.

REFERENCIAS

1. SPOTORNO, A.E., VII Congreso Latinoamericano de Zoología. Tucumán, 1977. Resúmenes de Comunicaciones, pp. 50-51.
2. SPOTORNO, A.E., Mamm. Chrom. Newsletter 17:14, 1976.
3. JACKSON, R.C., Ann. Rev. of Ecol. and Syst. 2:327, 1971.
4. YUNIS, J.J., Science 191:1268, 1976.
5. WALKER, L., III Congreso Latinoamericano de Genética. Montevideo, 1977. Resúmenes de Comunicaciones, p. 87.
6. WALKER, L., SPOTORNO, A.E., FERNÁNDEZ-DONOSO, R., Cytogenet. Cell Genet., en prensa, 1979.
7. MAYR, E., "Principles of Systematic Zoology". Mc Graw-Hill Inc. New York, 1969, p. 254.
8. SPOTORNO, A.E., An. Mus. Valp. (Chile) 9:141, 1976.
9. CHIARELLI, B.A., SARTI-CHIARELLI, M., SHAFER, D.A., Mamm. Chrom. Newsletter 13:44, 1972.
10. NADLER, C.F., RAUSCH, V.R., LYAPUNOVA, E.A., HOFFMANN, R.S., VORONTOV, N.N., Z. Säugetierkunde 41:137, 1976.
11. Paris Conference (1971), Supplement (1975). Birth Defects: Original Article Series, xi, 9, 1975. The National Foundation, New York.
12. HSU, T.C., En editorial Mamm. Chrom. Newsletter 78:69, 1977.
13. Chicago Conference. Birth Defects: Original Article Series, ii, 2, 1966. The National Foundation, New York.
14. SPOTORNO, A.E., En Simposios del III Congreso Latinoamericano de Genética, publ. Unesco, Montevideo, 1977, pp. 179-187.
15. VENEGAS, W., Bol. Soc. Biol. Conc. 48:69, 1974.
16. CARSON, H.L., CLAYTON, F.E., STALKER, H.D., Proc. Natl. Acad. Sci. 57:1280, 1967.
17. MASCARELLO, J.T., STOCK, A.D., PATHAK, S., J. Mamm. 55:695, 1974.
18. WÜRSTER-HILL, D.H., GRAY, C.W., Cytogenet. Cell Genet. 15:306, 1975.
19. PEARSON, O.P., PATTON, J.L., J. Mamm. 57:339, 1976.
20. WILSON, A.C., BUSH, G.L., CASE, S.M., KING, M.C., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72:5061, 1975.
21. LEWONTIN, R.C., "The Genetics Basis of Evolutionary Change". Columbia University Press, N.Y., 1974.
22. PEARSON, O.P., Univ. California Publ. Zool. 56:391, 1958.