

Posibilidades del análisis citogenético en un estudio de bandeo cromosómico en dos especies de anfibios (*Anura-Leptodactylidae*)*

Potentiality of cytogenetic analysis in a chromosome banding study of two amphibian species (*Anura-leptodactylidae*)

ALBERTO VELOSO M., PATRICIA ITURRA C.

Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad de Chile, Casilla 6556, Santiago de Chile.

(Recibido para publicación el 3 de diciembre de 1977)

VELOSO, M.A., ITURRA, C.P. Posibilidades del análisis citogenético en un estudio de bandeo cromosómico en dos especies de anfibios (*Anura-Leptodactylidae*) (Potentiality of cytogenetic analysis in a chromosome banding study of two amphibian species (*Anura-Leptodactylidae*) Arch. Biol. Med. Exp. 12, 91-96, 1979.

The comparisons between *C. caudiverbera* and *T. montanus* $2n=26$ karyotypes are improved by chromosome banding techniques. Differences in constitutive heterochromatin distribution, fluorescent bands and NOR location are pointed out. Telomeric NOR is for the first time reported in amphibians and it correspond to *C. caudiverbera*. Same chromosome morphology and number are not enough evidences to support a close phylogenetic relationships and tribal arrangement of this two species. Suggestions are made to evaluate the roll of constitutive heterochromatin addition as a mechanism in the modification of both species karyotypes.

AMPHIBIANS CYTOGENETICS CHROMOSOME BANDING

Uno de los aportes de la citogenética al estudio de la filogenia de los organismos consiste en precisar los posibles mecanismos de cambio cromosómico que han conducido al establecimiento de los cariotipos de las especies actuales. El número y la morfología cromosómica son generalmente los parámetros que se comparan entre especies relacionadas sistemáticamente. El valor de las comparaciones de cariotipos adquiere una nueva dimensión al poder diferenciar longitudinalmente los cromosomas con la aplicación de las técnicas de bandeamiento. Estos procedimientos han demostrado ser particularmente

útiles en especies de anuros con número y morfología cromosómica similar (1).

Para un estudio comparativo del cariotipo de *Caudiverbera caudiverbera* $2N = 26$, que presenta divergencias osteológicas, inmunológicas y de comportamiento con las restantes especies de la subfamilia Telmatobiinae hemos considerado a *Telmatobius montanus* que también presenta $2N = 26$. En los ordenamientos taxonómicos propuestos (2) estas especies se encuentran agrupadas en la tribu telmatobiini.

La aplicación de las técnicas de bandeos a los cariotipos permite contar con mayor informa-

*Trabajo parcialmente financiado por proyecto 4297-R de la Universidad de Chile y Programa Multinacional de Genética OEA.

ción de la morfología cromosómica en la identificación de homólogos. Además es posible reconocer la distribución de la heterocromatina constitutiva (3), la zona organizadora del nucleólo (4) y determinar la composición de bases púricas y pirimídicas que está presente en la estructura cromosómica (5). La incorporación de los parámetros señalados en la comparación del cariotipo de estas especies corresponde a una búsqueda sistemática de criterios citogenéticos para establecer las relaciones interespecíficas e intergenéricas en *Telmatobiinae*.

MATERIALES Y METODOS

Los ejemplares machos y hembras utilizados provienen de las siguientes localidades:

C. caudiverbera: Santiago, Melipilla. Altitud 400 m.

T. montanus: Santiago, Farellones. Altitud 1.800 m.

Los especímenes fueron inyectados con colchicina 0,1% entre 3 y 24 horas antes de ser sacrificados. Los cromosomas metafásicos se obtuvieron mediante suspensión celular de médula ósea y bazo con hipotonía en KCL 0,075 M durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente. Los cromosomas se midieron sobre ampliaciones fotográficas y se ordenaron según tamaño decreciente. Para poner en evidencia la heterocromatina constitutiva (bandas C) se utilizó el método BSG ($\text{Ba}(\text{OH})_2$, buffer 2xSSC y tinción con Giemsa 2% a pH 6,9) (6). La identificación de la zona organizadora del nucleólo (NOR) se realizó mediante plata amoniacal o método Ag-As (4). Las bandas de fluorescencia (bandas Q) se obtuvieron con Quinacrina y/o mostaza de quinacrina en solución acuosa 0,5 mg/ml (pH 5) y las placas metafásicas se observaron en microscopio de fluorescencia Zeiss con lámpara HB200 y filtro excitador BG12.

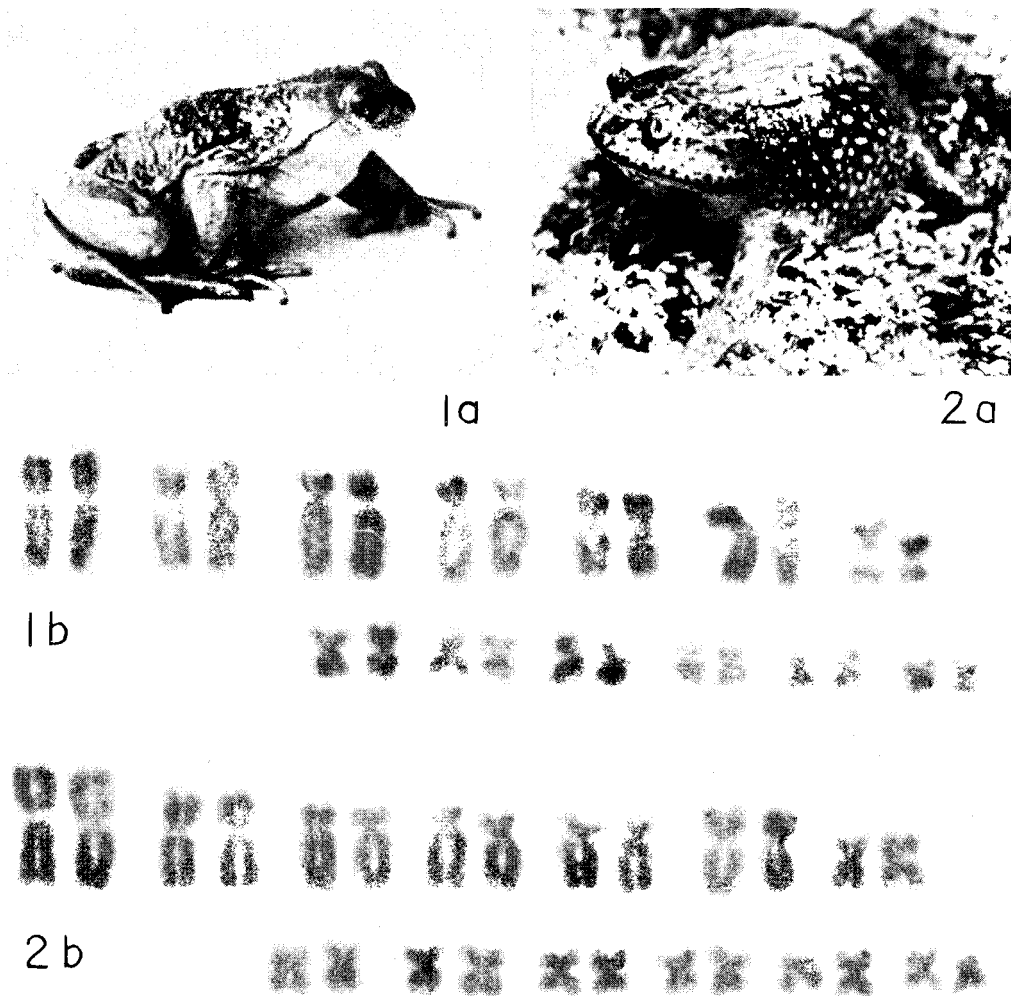


Fig. 1. 1a) *Telmatobius montanus* 2a) *Caudiverbera caudiverbera* 1b) Cariotipo $2n = 26$ 2b) Cariotipo $2n = 26$.

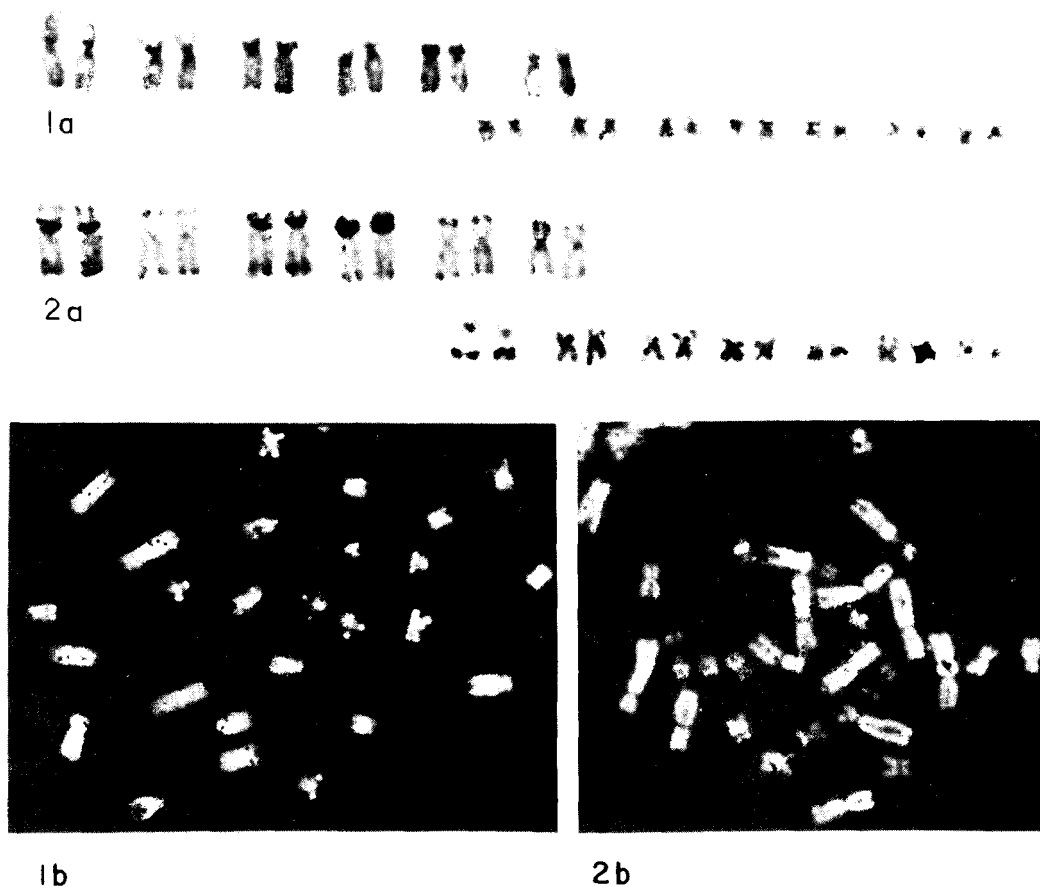


Fig. 2. Heterocromatina constitutiva (Bandas C) y fluorescencia (Bandas Q).

1a) Bandas C en *C. caudiverbera*

2a) Bandas C en *T. montanus*

1b) Bandas Q en *C. caudiverbera*

2b) Bandas Q en *T. montanus*.

RESULTADOS

El cariotipo de ambas especies tiene el mismo número diploide $2n = 26$. Los cromosomas son, principalmente, metacéntricos (m) y submetacéntricos (sm) y se distinguen 6 pares grandes y 7 pequeños. La comparación de los cromosomas ordenados según tamaño indica alguna diferencia entre parejas de homólogos que ocupan en ambos cariotipos una misma posición relativa. Estas diferencias se refieren a cambios en la morfología. En *C. caudiverbera* los pares 4 y 5 son subteloicéntricos (st). Los pares st en *T. montanus* son el 3 y 4. El par 5 es metacéntrico. El par 7 de estas especies presenta una constricción secundaria intercalar en el brazo largo de ambos homólogos. En los cromosomas de *Cau-*

diverbera no se presenta una constricción secundaria evidente (Fig. 1).

Distribución de bandas C y brazos heterocromáticos

Las bandas C en *T. montanus* se localizan en el centrómero de todos los cromosomas. En los pares grandes se distinguen bandas C teloméricas, características ausente en *C. caudiverbera*. En esta última, las bandas C se localizan principalmente en la región centromérica y pericentromérica de todos los cromosomas. El par 4 en *T. montanus* y el par 5 en *C. caudiverbera* tienen los brazos cortos heterocromáticos en toda su extensión. *T. montanus* muestra como característica los brazos cortos de los pares 8, 10 y 11 con material C positivo (Fig. 2).

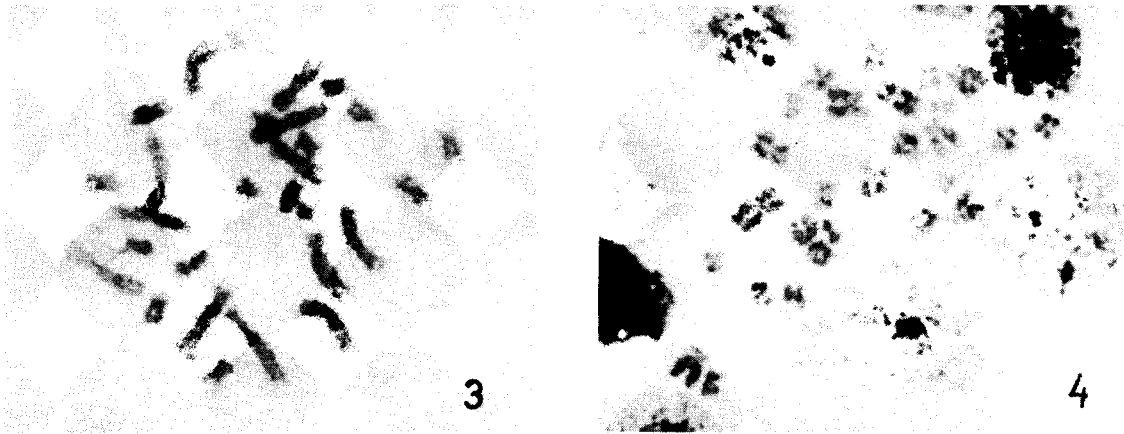


Fig. 3. Localización de la zona NOR por Ag-As. 3) *T. montanus*

4) *C. caudiverbera*.

Identificación de fracciones en la Heterocromatina constitutiva

Los resultados de los bandeos C y Q analizados de conjunto señalan correspondencia entre bandas C y Q brillantes en la región del centrómero, principalmente en *C. caudiverbera* (Figs. 2 y 3). Las bandas C teloméricas y de los brazos cortos de *T. montanus* presentan fluorescencia atenuada. Esta misma reacción al bandeo se observa también en los brazos cortos de los pares 4 y 5 de *C. caudiverbera* y *T. montanus* respectivamente. En las regiones teloméricas de los cromosomas 7, 8, 12 y 13 de *C. caudiverbera* hay bandas brillantes Q, las que no se corresponden con bandas C.

Reconocimiento de la zona organizadora del nucléolo (NOR)

En *T. montanus* la zona organizadora del nucléolo es única y se corresponde con la constricción secundaria intercalar del brazo largo de ambos homólogos del par 7 (Fig. 3). En cariotipos de *C. caudiverbera* sin constricción secundaria evidente, la zona NOR se localiza en el telómero de ambos homólogos del par 12. (Fig. 4). Las técnicas combinadas de bandas Q y Ag-As permitieron determinar que el NOR se encuentra en el brazo largo de este cromosoma metacéntrico pequeño. Este par se encuentra frecuentemente asociado en las placas metafásicas. En esta especie, otra zona NOR se localiza en el telómero del par 9. Esta zona no se observa en forma constante en todas las placas.

La constricción secundaria en *T. montanus* no está en correspondencia con bandas C. Sin embargo, en el centrómero y región distal y telómero del brazo portador del NOR presenta una zona fuertemente C positiva. En *C. caudiverbera* no se presentan bandas C junto a la zona NOR.

En ambas especies la zona NOR presenta atenuación de fluorescencia.

En algunos ejemplares de *T. montanus* la longitud de la constricción secundaria es diferente en ambos homólogos (Fig. 1). La extensión del NOR revelado en Ag amoniaco está en correspondencia con este heteromorfismo (Fig. 3).

DISCUSION

Distribución de la heterocromatina constitutiva

Los mecanismos modificadores del cariotipo que se han señalado en anfibios son: fisiones y/o fusiones céntricas (7) (8), translocaciones (1) e inversiones cromosómicas (9). En mamíferos, se ha señalado que la adición de heterocromatina constitutiva es otro mecanismo modificador de la morfología cromosómica (10). El crecimiento de sectores o brazos completos de cromosomas por adición de heterocromatina, estaría presente en *C. caudiverbera* y particularmente en *T. montanus*. Este mecanismo también presente en otros de especies telmatobinos (1) hace necesario revisar para el conjunto de especies sus relaciones filogenéticas basadas en la comparación del número diploide y

morfología cromosómica. La diferente expresión de la heterocromatina constitutiva modificadora del número de brazos cromosómicos indica que el número $2n = 26$ y una similar morfología cromosómica puede ser alcanzada independientemente en estas especies (11). Un cariotipo $2n = 26$ y cromosomas de similar morfología no indica como se ha sugerido una relación ancestral de estas especies. Sin embargo, un nuevo antecedente útil para las comparaciones consiste en poner en evidencia qué especies de telmatobios pueden compartir la adición de heterocromatina constitutiva como mecanismo modificador del cariotipo.

Fracciones de heterocromatina constitutiva

Las bandas Q brillantes están relacionadas con la cantidad de bases nitrogenadas adenina y timina presentes en el ADN cromosómico. La atenuación de la fluorescencia se relaciona con un incremento de base guanina y citosina (12) (13). La heterocromatina constitutiva se relaciona con secuencias de ADN de alta repetitividad (14). En mamíferos se ha sugerido una correlación entre ADN satélite pesado rico en bases CG y atenuación de la fluorescencia, en tanto que ADN satélite liviano, rico en bases AT estaría en correspondencia con bandas de fluorescencia brillante (15). En ausencia de centrifugación analítica e hibridización ADN/ADN que permite reconocer fracciones de ADN presentes en el genoma de estas especies, sólo es posible señalar de manera tentativa que la reacción del fluorocromo en las zonas C en *C. caudiverbera* y *T. montanus*, estaría determinada por la presencia de diversas fracciones de ADN satélite. Una evidencia que contribuye reforzar esta hipótesis es la relación establecida en *Xenopus mulleri* de bandas Q brillantes y presencia de secuencias de ADN satélite liviano (16).

La presencia de bandas Q brillantes y ausencia de bandas C en los telómeros de los pares pequeños de *C. caudiverbera* (Figs. 2 y 3) indicaría secuencias de ADN repetido independientemente de su ubicación en la heterocromatina constitutiva. Una relación inversa entre bandas Q brillantes y bandas C ha sido señalada recientemente en *Drosophila nasutooides* (17).

Zona organizadora del nucléolo y constricción secundaria

La especificidad del método de Ag amoniacoal

para determinar la localización del ADN ribosomal (ADNr) 18S y 28S ha sido demostrada en numerosas especies (4) (18). Una relación entre NOR y constricción secundaria ha sido determinada en *Xenopus mulleri* y *X. laevis* (16) *Odontophrynus americanus* y *O. cultripes* (19). *Alsodes nodusus* y *A. tumultuosus*. Estas dos últimas especies pertenecientes a la subfamilia Telmatobiinae (20). Esta misma relación se observa en *T. montanus*. Sin embargo, en *C. caudiverbera* la zona NOR es telomérica. Esta localización particular del NOR es la primera reportada en anfibios y constituye un importante marcador citogenético.

La zona NOR en *C. caudiverbera* no es única. En el telómero del par 9 se observa otra zona NOR que no aparece en todas las placas. Esta última característica podría estar relacionada con la mínima cantidad de ADNr que debe existir para que el método de Ag amoniacoal utilizado ponga en evidencia la zona NOR (4). Otra posibilidad es que el reconocimiento de la zona NOR con AgAs, estaría en relación con la actividad de transcripción del ADNr en etapas previas a la metafase (18). La actividad transcripcional posiblemente determina modificaciones de estructura de este sector cromosómico.

La existencia de más de una zona NOR en los cromosomas de *Caudiverbera* señala un mecanismo de organización del nucléolo en el que participarían más de un par de cromosomas homólogos.

El heteromorfismo del largo de la constricción secundaria en *T. montanus* y la correspondencia con la zona NOR sugiere que este heteromorfismo estaría determinado por cantidades diferentes de ADNr. Esta diferencia podría corresponder a un carácter establecido en la población mediante duplicaciones o deleciones en material genético. La presencia de diferentes fenotipos en la población podría ser puesta en evidencia a través de cruzamientos experimentales y/o muestras más extensas en poblaciones naturales.

CONCLUSIONES

Analizadas en su conjunto, las evidencias cromosómicas señalan las diferencias entre estas dos especies en cuanto a la distribución de la heterocromatina constitutiva, la localización del NOR en estos cromosomas y además el reco-

nocimiento de sectores cuyo predominio en determinadas bases nitrogenadas del ADN es característico. Como resultado de nuestro análisis podemos concluir que la comparación del cariotipo de ambas especies en términos de número y morfología cromosómica posiblemente no constituye una prueba válida en el establecimiento de una estrecha relación intergenérica entre ambas. El número $2n = 26$ y los cromosomas de morfología similar son posiblemente el resultado de diferentes mecanismos de cambio cromosómico en los que la adición de heterocromatina constitutiva tiene una expresión diferente.

Los parámetros citogenéticos considerados enriquecen el análisis comparativo de los cariotipos al proporcionar marcadores cromosómicos. Estos marcadores se refieren al reconocimiento de sectores en los cromosomas cuya funcionalidad es posible determinar a nivel celular. Un ejemplo lo constituye la zona NOR cuya funcionalidad se expresa en la formación del nucléolo. Un segundo nivel de comparación del cariotipo al cual se accede es el análisis molecular. El reconocimiento de la heterocromatina constitutiva, calidad y proporción relativa de bases nitrogenadas son la expresión del ADN o ADN-proteína en la estructura cromosómica.

SUMMARY

The aim this work is to present a comparative study of *Caudiverbera caudiverbera* $2N = 26$ karyotype and *Telmatobius montanus* also $2N = 26$, both belonging to a same tribal arrangement in Telmatobiinae.

The chromosome longitudinal differentiation of both species is pointed out by banding techniques. The comparisons between banded karyotypes correspond to a systematic search for cytogenetic parameters, to establish the intergeneric relationships of telmatobines.

Present evidence is in connection with the distribution and recognition of constitutive heterochromatin (C bands), Q bands which quinacrine and the recognition of the nucleolar organizer region (NOR) by Ag-As method.

The constitutive heterochromatin distribution is different in both species. A combination of C and Q banding results reveals at least two different fractions of constitutive heterochro-

matin. A characteristic Q brilliant band is present in the telomere of small *Caudiverbera* chromosomes indicating a particular AT rich base composition of this structure. A single NOR is present in chromosome number 7 of *Telmatobius montanus* in correspondence with a distinct secondary constriction of both homologous. In *Caudiverbera caudiverbera* a telomeric NOR is present. It has not been previously reported in Anura and constitutes an important cytogenetic marker for future comparisons.

Cytogenetic differences show that a same $2N = 26$ in Telmatobiinae is not enough evidence to support intergeneric relationships. Same diploid number and same chromosome morphology can be the result of independent events in the two species.

REFERENCIAS

1. VELOSO, A. Proc. Sem. y III Congreso Latinoamericano de Genética, en prensa, Montevideo, 1977.
2. LYNCH, J.D. Univ. of Kansas Publ. Mus. Nat. Hist. 53:7, 1971.
3. HSU, T.C., Nobel Symp. 23:32, en "Chrom. Id." (ed. T. Caspersson y L. Zech). N. York. Acad. Press., 1973.
4. GOODPASTURE, C., BLOOM, S., Chromosome 53:37, 1975.
5. WEISBLUM, B., HASETH, P.L., de Proc. Nat. Acad. Sci. 69:629, 1972.
6. SUMNER, A.T., Exp. Cell. Res. 75:304, 1972.
7. BOGART, J.P., Cytogenetics 9:369, 1970.
8. MORESCALCHI, A., Amphibia in Cytotaxonomy and Vertebrate. Evolution Chiarelli and Capanna Eds. Academic Press, 1973.
9. DE WEESE, J., Mann. Chrom. 16:121, 1975.
10. STOCK, A., HSU, T.C. Chromosome 43:211, 1973.
11. BARRIO, A., Physis xxx (81):673, 1971.
12. WEISBLUM, B., Col. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 38:441, 1973.
13. LATT, S., Chromosome 49:17, 1974.
14. YUNIS, J.J., YASMINEH, W.G. Science 174:1200, 1971.
15. JALAL, S.M., CLARK, R.W., HSU, T.C., PATHAK, S. Chromosome 48:391, 1974.
16. PARDUE, M.L., Col. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 38:475, 1973.
17. LEE, C.S. COLLINS, L. Chromosome 61:57, 1977.
18. MILLER ORLANDO, J., MILLER, D.A., DEV, V.G., TANTRAVAHU, R. CROCE, C.M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73:4521, 1976.
19. RUIZ, I.R.G., WILLY, BECAK, Chromosome 54:69, 1976.
20. ITURRA, P., VELOSO, A. Res. III Congreso Latinoamericano de Genética, p. 39 (Abstract), 1977.