CARIOTIPOS EN ALGUNAS CEPAS DE *Neurospora crassa* Y *Neurospora tetrasperma* (*)

Por GUIDO PINCHEIRA V. (**)
Plant Breeding Departament.
Cornell University, Ithaca.
New York. USA.

RESUMEN

Observaciones realizadas en cepas silvestres y mutantes de **Neurospora crassa** y **Neurospora tetrasperma**, no utilizadas previamente en estudios citológicos, con el fin de determinar su número de cromosomas, indican la existencia de un número básico de 7 cromosomas en ambas especies. Dos cromosomas presentan un mayor tamaño que el resto. Los otros cinco cromosomas presentan tamaños similares, o al menos es difícil notar diferencia entre ellos en los estados aquí estudiados.

Los resultados obtenidos permiten allegar alguna información al hecho de no ser posible la hibridización directa de **N. crassa** y **N. tetrasperma**, siendo factible si se realiza mediante cruzamientos a través de **N. intermedia** y **N. sitophila**. No existiendo diferencia en el número de cromosomas, la razón puede ser diferencias en la extructura de estos cromosomas o incompatibilidades fisiológicas.

Con respecto a una cepa de **N. crassa** que presenta un carácter hereditario no mapeable genéticamente, la observación de 7 cromosomas permite excluir la posibilidad que tal carácter se encuentre ubicado en un cromosoma extra.

La utilización de una mutante morfológica que permite una mayor extensión del citoplasma facilita el estudio citológico, lo cual puede ser útil en trabajos futuros.

SUMARY

Chromosome counts in wild and mutant strains of **Neurospora crassa** and **Neurospora tetrasperma**, not used previously for cytological work, indicate a basic number of 7 chromosomes in both species.

(*) Este trabajo fue financiado en parte por grant de investigación C-1256, concedido al Dr. A. M. Srb por National Cancer Institute of the National Institute of Health, U. S. Public Health Service.

(**) Actual dirección: Instituto de Biología, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Two chromosomes are larger than the rest. The other five chromosomes of the set are smaller, and for this reason it is difficult to distinguish diferences in length among them in the stages studied here.

Though the chromosome number is the same, it is not possible to hybridize these two species directly; but it is possible after intermediate crosses to **N. intermedia** and **N. sitophila.** Differences in chromosomal structure or physiological incompatibilities may be the reason, but there is as yet no pertinent information available.

The results obtained in the strain of **N. crassa** with a no mapable character permit to exclude the possibility of an extra chromosome.

The increase in spreadability of the cytoplasm observed ni strains carrying a morphological mutant may be of advantage for future cytological work.

INTRODUCCION

El gran caudal de informaciones concernientes a la fisiología génica que se ha obtenido en investigaciones en **Neurospora,** especialmente en lo que respecta a la base bioquímica de estos procesos, no ha sido acompañado de un conocimiento citológico acucioso de las diferentes especies de este hongo.

En efecto, desde que Shear y Dodge (1) describieron el género **Neurospora** en 1927, sólo un reducido número de trabajos abordan lo concerniente al cariotipo u otras características morfogenéticas de este hongo. Muy poco se conoce sobre los mapas cromosómicos citológicos, e incluso ni siquiera hay acuerdo sobre el número de cromosomas en las diferentes especies. La mayor dificultad parece haber sido la falta de una técnica adecuada.

El género **Neurospora** consta de 7 especies: **N. crassa, N. tetrasperma, N. sitophila, N. erytrea, N. intermedia, N. toroi, N. terrícola.**

N. crassa es la especie que mayor interés ha despertado desde el punto de vista genético, por lo cual es también la especie sobre la cual se tiene mayor información citológica. Con respecto a su cariotipo, los principales trabajos son los de Lindegren y Rumann (2), B. Mc Clintock (3), J. R. Singleton (4), C. E. Somers, R. P. Wagner y J. C. Hsu (5).

En 1938, Lindegren y Rumann, utilizando una técnica similar a la de aplastado, obtuvieron la primera información sobre extructura y número de cromosomas en **N. crassa** pudiendo observar 9 pares de cromosomas en el zigoto y sólo 6 pares en anafase de las divisiones meioticas que acompañan el desarrollo del asco. En 1945, B. McClintock, en Stanford University, introdujo la técnica de aplastado en el estudio citológico de Ascomicetes. Utilizando orceina acética, pudo estudiar con mayor detalle el cariotipo de cepas silvestres y mutantes de **N. crassa.**

Sus observaciones le permitieron determinar un total de 7 pares de cromosomas en el zigoto de dicha especie. Los denominó con los números de 1 a 7 de acuerdo a su decreciente longitud e indicó la morfología, ubicación de centromero y cromomeros en algunos de ellos.

En 1953, J. R. Singleton introdujo algunas modificaciones a la técnica de McClintock y pudo confirmar sus resultados en lo que se refiere a números de cromosomas, agregando además una detallada información sobre su extructura.

Posteriormente, en 1960, los investigadores C. E. Somers, R. P. Wagner y T. C. Hsu, observando divisiones de núcleos vegetativos en una de las cepas silvestres utilizadas por los investigadores anteriores, pudieron constatar que sólo en un 75% de las figuras observadas era posible contar 7 cromosomas diferentes. En el 25% restante aparecía un octavo cromosoma, muy pequeño, de tal modo que no era posible determinar claramente si este octavo cromosoma era uno supernumerario en esa cepa, o bien un miembro regular del juego haploide de **N. crassa**, siendo solamente difícil de observarlo en el 75% de las figuras debido a su reducido tamaño.

La falta de concordancia de un número de 8 cromosomas con los 7 grupos de ligamiento génico determinados por Barratt, Newmeyer, Perkins y Garnjobst (6), podría ser explicada según Somers y colaboradores considerando la posibilidad que el octavo cromosoma, al ser pequeño y constituido principalmente por heterocromatina, presentaba dificultad no sólo para su observación, sino también para su determinación como un octavo grupo de ligamiento génico.

En 1962, algunas últimas informaciones sobre cariotipo de **N. crassa** han sido proporcionadas por E. Silver Dowding y J. Weijer (7) y E. W. B. Ward y K. W. Ciurysek (8) a base de observaciones de divisiones de núcleos vegetativos. En ambos casos se indica un total de 7 cromosomas diferentes.

Respecto a **N. tetrasperma**, la primera información que se tiene sobre su cariotipo fue comunicada en 1934 por B. Colson (9), quien pudo observar 6 pares de cromosomas en cortes seriados de ascos en desarrollo.

En 1946, V. Cutter (10), utilizando una técnica de aplastado con carmín u orceina acética para observación de estados meioticos, obtiene similares resultados, los cuales confirma con observaciones de divisiones en núcleos vegetativos, en los cuales constata también un número de 6 cromosomas diferentes.

En 1949, J. R. S. Fincham (11) menciona por primera vez, un total de 7 pares de cromosomas en zigotos de **N. tetrasperma** observados mediante técnica de aplastado con carmín y alumbre férrico.

En 1950, B. O. Dodge, J. R. Singleton y A. Rolnick (12) confirman también un número haploide de 7 cromosomas en **N. tetrasperma.** Posteriormente J. R. Singleton, en 1953, reafirma

esta información, pero sin mayores detalles en cuanto a su extructura y forma.

En síntesis, la revisión de la literatura nos indica un número de cromosomas en **N. crassa** que varía de 6 a 9.

En **N. tetrasperma**, el número de cromosomas varía entre 6 y 7.

Estos antecedentes y el hecho de contar con cepas silvestres y mutantes de **N. crassa** y **N. tetrasperma** no utilizadas anteriormente en estudios citológicos; sugirieron la conveniencia de realizar un recuento cromosómico en este material. Además, dos hechos presentados en experimentos de genética realizados con anterioridad en dicho material en el laboratorio del Dr. Srb en Cornell University, aconsejaban tal idea.

Uno de estos hechos era el lento crecimiento inicial de una cepa de **N. crassa**, denominada "Sg", y que había derivado de la cepa silvestre en estudio. Dicha característica no ha sido posible mapearla génicamente en los 7 grupos de ligamiento conocidos, por lo cual se podía sospechar que podría estar determinada por genes en un cromosoma extra, similar a aquel observado por Somers y colaboradores en 1960.

El otro problema genético se había presentado al tratar de transferir un gen determinante de una mutación morfológica de **N. crassa** a **N. tetrasperma**, lo cual no había sido posible lograrlo en forma directa, pero si había sido posible por medio de cruzamientos previos con cepas pertenecientes a otras especies de **Neurospora** como son **N. intermedia** y **N. sitophila**, y por último a **N. tetrasperma**. En estas circunstancias surgía la posibilidad que la dificultad de hibridización se pudiera deber a una diferencia en el número de cromosomas entre **N. crassa** y **N. tetrasperma**.

MATERIALES Y METODOS

N. crassa.

Las observaciones fueron hechas sobre estados meioticos de ascos resultantes de cruzamientos recíprocos entre cepas silvestres 74A y 77a, aisladas por P. St. Lawrence y proporcionadas por D. Bonner de Yale University. Las cepas mutantes fueron:

— cepa "Sg" aislada en el Laboratorio del Dr. Srb en Cornell.
— cepa "peak-2" (pk-2). Mutante morfológica de carácter recesivo obtenida en el mismo laboratorio después de tratamiento de las cepas silvestres 74A y 77a con beta-propiolactona como agente mutagénico (13).

Dicha mutante en condición homozigotica afecta tanto a las características de crecimiento vegetativo, como también a la morfología del asco. El micelio crece en forma de anillos concéntricos, que le dan una forma de colina. En cuanto al asco,

este toma una forma globosa con un mayor diámetro, pero con una menor longitud.

N. tetrasperma.

Las observaciones en material silvestre fueron hechas en ascos producidos en una cepa llamada T-220 y que fue coleccionada en Australia por J. H. Warcup.

La cepa de **N. tetrasperma** que contiene el gen mutado peak-2, había sido obtenida en el laboratorio del Dr. .Srb después de transferir dicho gen desde **N. crassa** a **N. intermedia,** después a **N. sitophila** y después a **N. tetrasperma.** Después de esto, se habían efectuado once retrocruzas del gen peak-2 con **N. tetrasperma.**

Cultivo.

Los cruzamientos entre cepas de **N. crassa** fueron hechos en medio de Westergaard y Mitchell (14) que favorece la reproducción sexuada del hongo.

Los tubos fueron inoculados con conidios de una cepa y después incubados a 25ºC por 6-7 días. Cuando los protoperitecios se hubieron desarrollado, se inoculó conidios de la cepa cen sexo opuesto, y después nuevamente incubados a 25ºC.

A los 6-7 días se tuvo material con estados meioticos adecuados para recuento cromosómico.

Los cultivos de **N. tetrasperma** se hicieron en medio Difco-Corn-Meal, y fueron incubados a 25ºC. Después de 4 días fue posible tener material adecuado para recuento cromosómico.

Fijación.

En solución Carnoy a 2ºC, por 12 horas.

Tratamiento previo a tinción.

Lavado en H_2O destilada.

Hidrólisis en HCl normal a 60ºC por 8 minutos, con lo cual se obtenía una menor tinción del citoplasma y el contraste con el material nuclear es mejor.

Tinción.

Disección del cuerpo fructífero en una gota de ácido acético al 20%, utilizando pinzas finas y lupa esteroscópica.

En seguida, agregado de una gota de orceína acética al 1%.

Aplastado con cubre-objeto, esperando por lo menos 1 minuto para permitir la acción del colorante.

Sellado de la preparación, con una mezcla de parafina y goma, manteniéndola a la temperatura de la pieza por 12 horas, a lo menos, antes de su observación.

MICROSCOPIA.

Siendo un trabajo citológico, el énfasis es desde luego en microfotografías. Para ello se utilizó un microscopio Spencer con objetivo de inmersión Zeiss neofluar de 100 aumentos y 1,3 N. A.

Oculares 10 aumentos o 16 aumentos.

Las microfotografías fueron tomadas con Kodak contract Process film y se desarrolló con solución microdol-x.

OBSERVACIONES Y RESULTADOS.

Las observaciones se planificaron tanto en cepas silvestres como mutantes a fin de tener la posibilidad de comparar los resultados obtenidos. En general, la conducta de los cromosomas meioticos en **Neurospora**, con excepción de ciertos caracteres del proceso de sinapsis, se asemeja mucho a los de organismos superiores.

Siendo el principal objetivo el determinar el número de cromosomas en las diferentes cepas en estudio, se puso especial interés en la observación de estados de diakinesis, metafase o anafase, pues el mayor grado de condensación del material cromatínico permite una mejor tinción y más fácil recuento de los cromosomas. Tanto en cepas silvestres como mutantes de ambas especies, se pudo constatar un número básico de 7 cromosomas, pudiendo distinguirse, además, que dos cromosomas son mayores de tamaño que el resto.

Al respecto, B. Mc Clintock, en 1945, y Singleton, en 1953, designaron a estos dos cromosomas de mayor tamaño con los números **1** y **2.** Los otros 5 cromosomas son más pequeños y fueron designados por los mismos autores con los números 3 a 7 en orden de decreciente longitud. En los estados estudiados aquí, es difícil distinguir esta diferencia de longitud.

DISCUSION

El gran número de ascos obtenidos en la disección de los cuerpos fructíferos de ambas especies de **Neurospora** ha facilitado el recuento cromosómico. No obstante en las cepas silvestres, hubo un poco más de dificultad, pues los cromosomas parecen estar localizados muy cerca unos de otros, lo que no facilita su clara distinción.

En cambio, en las cepas portadoras del gen pk-2 se nota una mayor extensión de los cromosomas, lo cual facilita su recuento. Esto es notorio incluso en ascos heterozigotos. La razón parece ser una consecuencia de alteraciones que pk-2 determina en la morfología del asco, lo que permite una mayor extensión de los cromosomas con la técnica de aplastado.

De todos modos, los resultados obtenidos permiten extraer ciertas conclusiones.

Cultivo.

Los cruzamientos entre cepas de **N. crassa** fueron hechos en medio de Westergaard y Mitchell (14) que favorece la reproducción sexuada del hongo.

Los tubos fueron inoculados con conidios de una cepa y después incubados a 25ºC por 6-7 días. Cuando los protoperitecios se hubieron desarrollado, se inoculó conidios de la cepa con sexo opuesto, y después nuevamente incubados a 25ºC.

A los 6-7 días se tuvo material con estados meioticos adecuados para recuento cromosómico.

Los cultivos de **N. tetrasperma** se hicieron en medio Difco-Corn-Meal, y fueron incubados a 25ºC. Después de 4 días fue posible tener material adecuado para recuento cromosómico.

N. tetrasperma.

Las observaciones en material silvestre fueron hechas en ascos producidos en una cepa llamada T-220 y que fue coleccionada en Australia por J. H. Warcup.

La cepa de **N. tetrasperma** que contiene el gen mutado peak-2, había sido obtenida en el laboratorio del Dr. .Srb después de trasferir dicho gen desde **N. crassa** a **N. intermedia**, después a**N. sitophila** y después a **N. tetrasperma.** Después de esto, se habían efectuado once retrocruzas del gen peak-2 con **N. tetrasperma.**

Tratamiento previo a tinción.

Lavado en H_2O destilada. z

Hidrólisis en HCl normal a 60ºC por 8 minutos, con lo cual se obtenía una menor tinción del citoplasma y el contraste con el material nuclear es mejor.

Fijación.

En solución Carnoy a 2ºC, por 12 horas.

Tinción.

Disección del cuerpo fructífero en una gota de ácido acético al 20%, utilizando pinzas finas y lupa esteroscópica.

En seguida, agregado de una gota de orceína acética al 1%.

Aplastado con cubre-objeto, esperando por lo menos 1 minuto para permitir la acción del colorante.

Sellado de la preparación, con una mezcla de parafina y goma, manteniéndola a la temperatura de la pieza por 12 horas, a lo menos, antes de su observación.

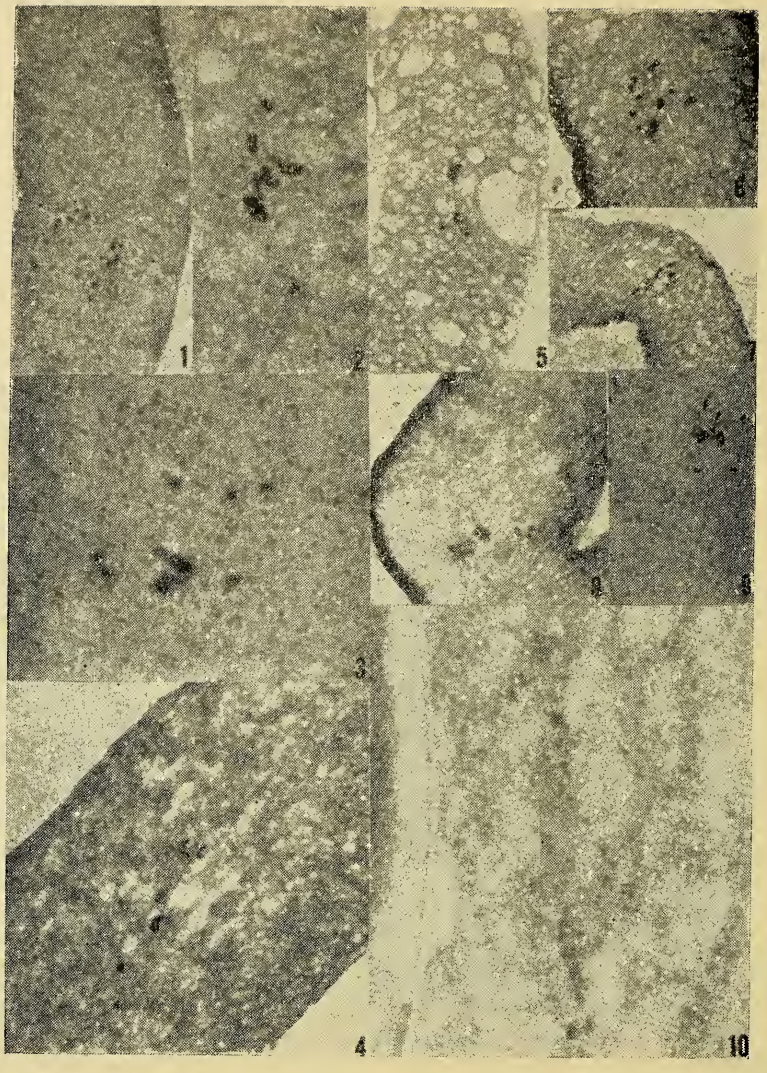

Fig. 1.— **N. crassa** silvestre. (74A x 77a)
Anafase I. Dos grupos de 7 diadas. x 1875.

Fig. 2.— **N. crassa** (Sg)
Metafase I. Siete bivalentes. Los dos bivalentes ubicados en la posición de 7 en la esfera de un reloj, aparecen sobrecubriéndose parcialmente. Cromosoma 1 fácil de distinguir por su mayor tamaño. x 3200.

Fig. 3.— **N. crassa** (Sg)
Comienzo de Anafase I. Siete pares de cromosomas. Los dos pares ubicados en la posición de 12 y 1 de la esfera de un reloj ya se han separado. Ciomosoma 1 presenta claramente visible su región centromérica. Cromosoma 2 le sigue en tamaño. x 3200.

Fig. 4.— **N. crassa** (pk-2 pk-2).
Metafase I. Siete bivalentes. Cromosoma 1 facilmente distinguible. x 1875.

Fig. 5.— **N. tetrasperma** silvestre pk-2.
Comienzo Anafase I. Siete pares de cromosomas. Dos bivalentes ya se han separado. x 1875.

Fig. 6.— **N. tetrasperma** silvestre x pk-2.
Comienzo Anafase I. Siete pares de cromosomas. Cromosoma 1 ubicado a las 6 de la esfera de un reloj. Centromero visible. x 1875.

Fig. 7.— **N. tetrasperma** (Silvestre).
Metafase I. Siete pares de cromosomas. x 1180.

Fig. 8.— **N. tetrasperma** silvestre x pk-2. Metafase I.
Siete pares de cromosomas. Cromosoma 1 ubicado a las 7 de la esfera de un reloj. x 1875.

Fig. 9.— **N. crassa** pk-2 xpk-2.
Metafase I. Siete parejas de cromosomas con una de ellas ya separadas. Cromosomas 6 y 7, por su menor tamaño deben ser los ubicados a las 5 y 7 de la esfera del reloj. x 1875.

Fig. 10.—**N. tetrasperma** silvestre x pk-2.
Dos grupos de 7 crimisomas cada uno durante Anafase II. x 3.000.

Primero: Con respecto a la cepa Sg en **N. crassa**, el resultado obtenido permite descartar la posibilidad que dicho carácter resida en un cromosoma extra similar a aquel observado por Somers y colaboradores. Es probable que dicho carácter sea determinado por algún componente citoplasmático, pues no ha sido posible mapearlo génicamente en alguno de los 7 grupos de ligamentos clásicos.

Segundo: El hecho de constatar un número básico de 7 cromosomas con algunos similares en tamaño y forma, tanto en **N. crassa** como en **N. tetrasperma**, sugiere que la imposibilidad de hibridizar directamente estas dos especies no se debe a diferencia en el número de sus cromosomas. En cambio se puede deber a la diferencia en la extructura de estos cromosomas o bien a incompatibilidades fisiológicas.

Un mayor conocimiento de la distribución de cromomeros y posición de los centrómeros en los cromosomas de **N. tetrasperma** puede ser útil en el esclarecimiento de este problema. En este respecto tenemos esperanzas que el aumento en la extensibilidad de los centrosomas en cepas portadoras del gen pk-2 pueda ser de gran utilidad para tal objeto.

Tercero: La técnica empleada es sencilla lo cual permite abrigar algunas esperanzas en próximos trabajos.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su aprecio y agradecimientos a los profesores A. M. Srb y L. F. Randolph por sus valiosas sugerencias y facilidades proporcionadas en sus respectivos laboratorios en Cornell University, Ithaca, N. Y.

BIBLIOGRAFIA

1.— SHEAR, C. L. and B. O. DODGE: J. Agr. Research **34**: 1010-1042. 1927.
2.— LINDEGREN, C. C. and S. RUMANN: Jour. Genetics **36**: 385-404. 1938.
3.— McCLINTOCK, B.: Am. J. Botany **32**: 671-678. 1945.
4.— SINGLETON, J. R.: Am. J. Botany **40**: 124-143. 1953.
5.— SOMERS, C. E., R. P. WAGNER and J. C. HSU: Genetics **45**: 801-810. 1960.
6.— BARRAT, R. W., D. NEWMEYER, D. D. PERKINS and L. GARNJOBST: Advances in Genetics **6**: 1-92. 1954.
7.— DOWDING, E. SILVER and J. WEIJER: Genetics **32**: 339-351. 1962.
8.— WARD, E. W. B. and K. W. CIURYSEK: Am. J. Botany **49**: 393-399. 1962.
9.— COLSON, B.: Ann. Botany **48**: 211-224. 1934.
10.— CUTTER, V. M.: Mycologia **38**: 693-698. 1946.
11.— FINCHAM, J. R. S.: Ann. Botany **13**: 23. 1949.
12.— DODGE, B. O., J. R. SINGLETON and A. ROLNICK: Proc. Am. Phil. Soc. **94**: 38-52. 1950.
13.— MURRAY, J. C.: Cornell Ph. D. Thesis. 1960.
14.— WESTERGAARD, M. and H. K. MITCHELL: Am. J. Botany **34**: 573-577. 1947.