

LOS CROMOSOMAS DE *CRATOMELUS ARMATUS*
BLANCHARD, 1851 (ORTHOPTERA, GRYLLACRIDIDAE)
OBTENIDOS DE CULTIVO DE HEMOCITOS

P O R

GUIDO CEA C. y OSCAR MARIN S. (*)

R E S U M E N

Se modifica la técnica de cultivo de hemocitos empleada por Tyrkus en 1971 para el estudio de cromosomas mitóticos en insectos y se informa del cariotipo de *Cratomelus armatus* Blanchard, 1851 (Orthoptera; Gryllacrididae, Gryllacrididae), especie chilena que posee una fórmula cromosómica $2n = 28 + XO \sigma$ y $2n = 28 + XX \varphi$. Se discuten los resultados.

A B S T R A C T

The Tyrku's culture chromosome method for insects haemocytes (1971) was modified for the study of karyotype of *Cratomelus armatus*, Blanchard, 1951 (Orthoptera; Gryllacrididae, Gryllacridinae) chilean species with chromosome formulae is $2n = 28 + XO \sigma$ and $2n = 28 + XX \varphi$. Results are discussed.

I N T R O D U C C I O N

Con la intención de entregar nueva información al conocimiento de los cromosomas de la fauna de Ortópteros chilenos y nuevos aportes técnicos para el estudio de ellos, se presenta en este trabajo el cariotipo de *Cratomelus armatus* Blanchard, 1851 (Orthoptera; Gryllacrididae, Gryllacridinae) especie endémica de Chile, obtenido del cultivo de hemocitos modificando la técnica empleada por Tyrkus (1971).

Generalmente los estudios cromosómicos en insectos se efectúan en gónadas (Cea, 1974) con el consiguiente inconveniente cuando se dispone de ejemplares inmaduros o larvales, por lo que este procedimiento al estudiar los hemocitos ha solucionado este problema.

El conocimiento cariológico de los Gryllacrididae chilenos como el de muchas otras familias es escaso. Sólo encontramos referencias en trabajos de Mesa (1965) referidas al género *Heteromallus*, que son discutidas posteriormente y del mismo autor sobre especies australianas (Mesa et al, 1968).

(*) Laboratorio Citogenética Dpto. Biología Celular. Instituto de Biología "Otmar Wilhelm Grob". Universidad de Concepción. Chile.

MATERIALES Y METODOS

Se colectó 40 ejemplares de *Cratomelus armatus*, en los cerros que rodean al Campus de la Universidad de Concepción, Concepción, Chile en septiembre de 1975, los que fueron mantenidos en cajas de crianza en nuestro laboratorio. De este material fueron seleccionados 3 machos y 3 hembras en ambos casos se trataba de individuos adultos.

El procedimiento aplicado corresponde a una modificación a la técnica utilizada por Tyrkus (1971) y su desarrollo por pasos se describe a continuación.

- 1.— Se inyecta al hemocele, con jeringa hipodérmica de aguja fina, 0.3 ml de medio de cultivo para insectos Grace según fórmula de la Grand Island Biological Co. de Grand Island N.Y. preparado en nuestro laboratorio con algunas modificaciones y esterilizado en filtro Millipore de 0.45 μ . Los 0.3 ml de medio de cultivo deben contener 0.4 mg. de colchicina por ml de medio. Se ajusta a pH 7.0. La inyección debe hacerse suavemente y a través de las pleuras abdominales.
- 2.— Los animales así tratados fueron aislados en cajas de crianza y mantenidos a temperatura ambiente 22°C entre 8 y 23 horas.
- 3.— Al término del tiempo fijado se procede a anestesiar el ejemplar, se corta una pata a nivel de la coxa y se gotea directamente la hemolinfa que brota de la herida en un tubo de centrifuga que contiene una solución de citrato de sodio al 0.8%. Se deja por 10 minutos.
- 4.— Luego se centrifuga por 5 minutos a 800 r.p.m. (150 g. en nuestra centrifuga). Se retira el sobrenadante sin dañar el pequeño botón celular del fondo.
- 5.— En seguida se fija el material haciendo deslizar suavemente por las paredes del tubo una mezcla de etanol-ácido acético (3:1). Se deja durante 15-20 minutos.
- 6.— Se retira el fijador y se procede con igual cuidado a una segunda fijación con la misma mezcla, dejando por 10-12 horas a 4°C.
- 7.— Se elimina el fijador sin romper el pequeño botón celular, y se reemplaza por 2-3 ml de ácido acético al 45% resuspendiendo suavemente el material del fondo.
- 8.— Luego la suspensión celular se gotea sobre portaobjetos limpios, previamente desengrasados y mantenidos a 45°C sobre una platina termorregulable, calculando la concentración y esparcimiento adecuado de las células.
- 9.— Las placas así obtenidas pueden ser tratadas para su tinción y montaje permanente según el procedimiento que se desee. En este caso se usó para teñir, previa hidrólisis ácida, Giemsa Merck por 25 minutos (100 gotas de Giemsa por 100 ml de agua bidesilada y llevado a pH 7.0). El montaje permanente se hizo en medio de montaje Euparal.

Se observó un promedio de 100 células en cada caso. Las fotografías fueron obtenidas usando un Fotomicroscopio III Zeiss Oberkochen con lente de inmersión planapocromático (100 X) y película de alto contraste ajustada para una velocidad de 14 DIN.

Los cromosomas fueron recortados y medidos de ampliaciones fotográficas y ordenados según la clasificación de Levan et al. (1964).

RESULTADOS

La mayor cantidad de células en estado divisional se obtiene a las 23 horas de cultivo, sin embargo citológicamente son de mejor calidad las preparaciones obtenidas a las 8 horas.

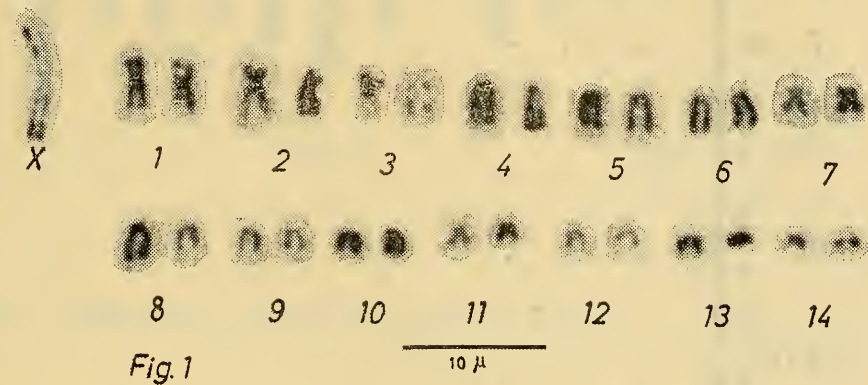


Fig. 1.— Cariotipo de macho de *Cratomelus armatus* Blanchard, 1851.

El cariotipo de *Cratomelus armatus* Blanchard, 1851 tiene la siguiente fórmula para el macho: $2n = 28 + XO$ cromosomas (Fig. 1) y para la hembra $2n = 28 + XX$ cromosomas (Fig. 2). Morfológicamente se distinguen (Fig. 3), un grupo de cromosomas metacéntricos (m) formado por 5 parejas que incluye a los heterocromosomas; otro grupo formado por 1 pareja de cromosomas submetacéntricos (Sm) que se encuentra casi en el valor límite de la relación

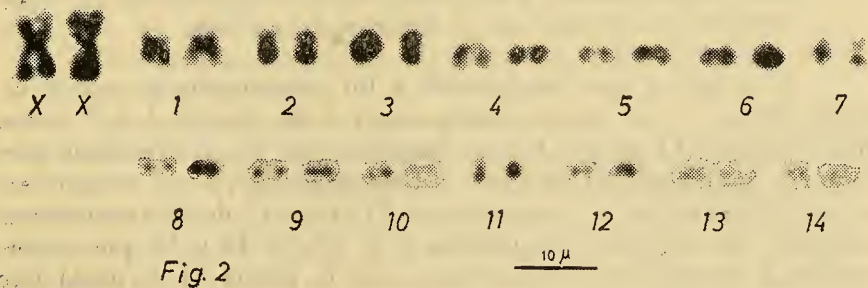


Fig. 2.— Cariotipo de la hembra de *Cratomelus armatus* Blanchard, 1851.

Bl/Bc que separa los metacéntricos de los submetacéntricos; otro grupo lo integran dos parejas de cromosomas subtelo-céntricos (st.) y por último hay siete parejas de cromosomas telocéntricos (T).

Del análisis de la Fig. 3 se desprende que existen tres grupos de cromosomas según el criterio de tamaño utilizado, que han sido ordenados en el idiograma de la Fig. 4. Estos grupos han sido denominados con las letras A,B y C.

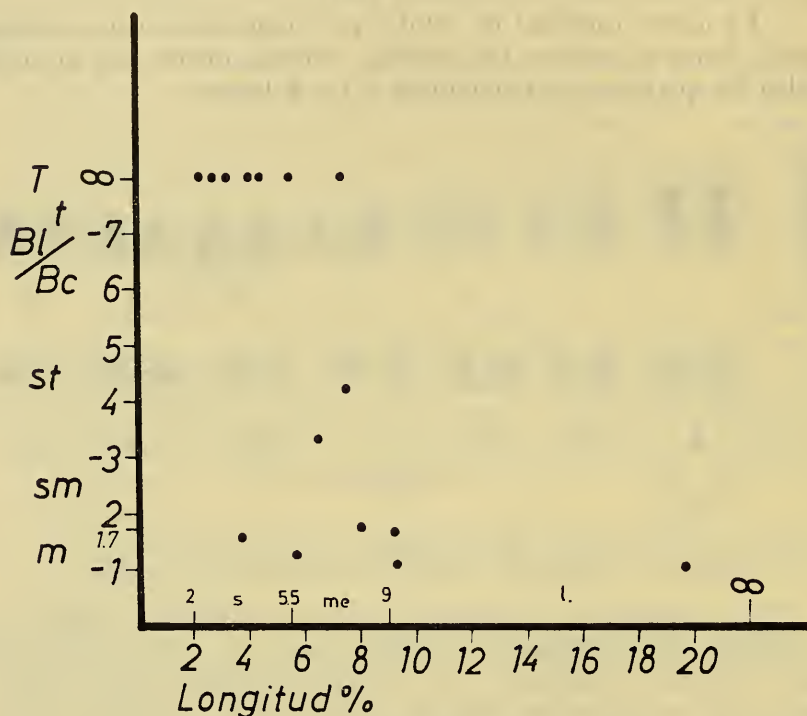


Fig. 3

Fig. 3.—Relación Bl/Bc vs. longitud porcentual de los cromosomas homólogos de *Cratomelus armatus* Blanchard, 1851. m = cromosoma metacéntrico; sm = submetacéntrico; st = subtelo-céntrico; t = acrocéntrico; T = telocéntrico; s = pequeños; me = medianos; l = grandes.

El grupo A que corresponde a los cromosomas de mayor tamaño, incluye a los heterocromosomas y a las parejas 1 y 2, todos metacéntricos. El grupo B está formado por los cromosomas medianos y comprende las parejas 3 submetacéntricos, 4 y 6 subtelo-céntricos, 5 telocéntrico y 7 metacéntrico. El grupo C, de los cromosomas pequeños, lo componen las parejas 8, 9, 10, 12, 13 y 14 que corresponden a cromosomas telocéntricos, más la pareja 11 formada por cromosomas metacéntricos.

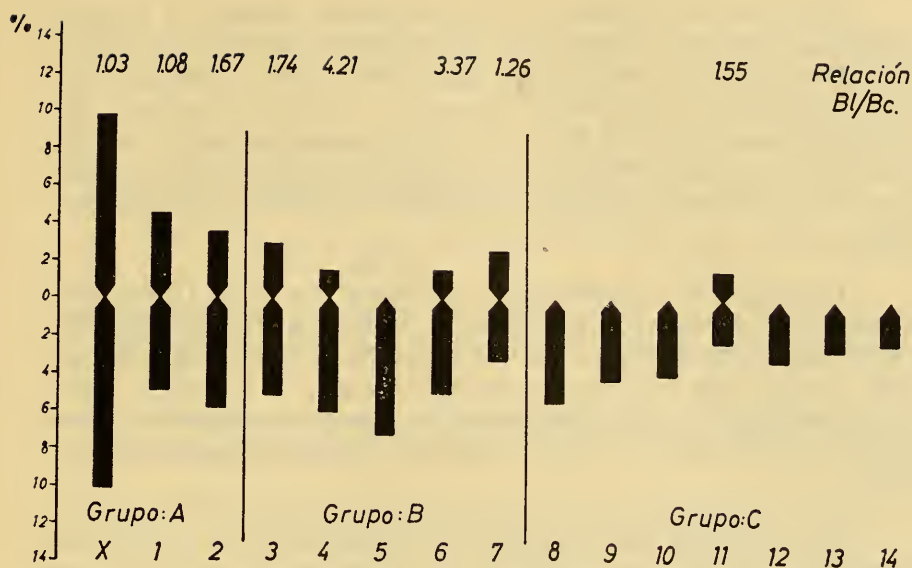


Fig. 4.— Idiograma de *Cratomelus armatus* Blanchard, 1851.

DISCUSION

El procedimiento técnico empleado constituye una complementación a la técnica para hemocitos empleada por Tyrkus (1971). Las ventajas de este procedimiento modificado sobre el original son:

- 1.— Pretratamiento controlado en solución hipotónica.
- 2.— Fijación con etanol-ácido acético que otorga mayor nitidez y resolución.
- 3.— No dispersión de los hemocitos sobre el portaobjetos y por lo tanto mayor facilidad en el recuento y observación.
- 4.— Control de la concentración de hemocitos en las preparaciones por utilización de cantidades adecuadas de ácido acético al 45% en la suspensión final.

Cratomelus armatus debido a su talla relativamente grande (alrededor de 5 cm) permite obtener aproximadamente 0.5 ml de hemolinfa, lo que es más que suficiente para este procedimiento. En insectos de tamaño menor o que poseen menor cantidad de hemolinfa circulante es probable que la cantidad de hemocitos que se obtenga, no permita la aplicación de la técnica con el éxito logrado en este caso.

Se conoce de la fauna de Gryllacrididae chilenos el número cromosómico de cuatro especies del género *Heteromallus* (Sub-familia: Rhaphidophorinae reportados por Mesa (1965) que corresponden a *H. Spina* Bruner, *H. pectinipes*, Karny, *H. spinifer* (Blanchard), *H. gracilipes* Andes, todas con $2n = 45 + XO$ cromosomas para el macho. *Cratomelus armatus* Blanchard (sub-familia Gryllacridinae) posee $2n = 28 + XO$ cromosomas para el macho. Este género es monoespecífico.

Comparando la información entregada por Mesa (1964) para el género *Heteromallus* al que ubica en la familia Raphidophoridae, reunida hoy junto a *Cratomelus* en la familia Gryllacrididae (Borror 1970) se colige que hay grandes variaciones tanto en el número como en la morfología de los cromosomas, aunque el mecanismo cromosómico determinante del sexo es similar y del tipo primitivo $XO \sigma - XX \varphi$.

En el género *Heteromallus* el cromosoma X y el par más grande de autosomas son metacéntricos o submetacéntricos y un par de tamaño medio es metacéntrico. Los cromosomas restantes son acrocéntricos. Aunque Mesa no da medidas cromosómicas ni hace un ordenamiento total de ellos llega a esta conclusión por el examen visual de placas cromosómicas meióticas. Sólo en *H. gracilipes* el cromosoma X es el más grande del complemento.

En *Cratomelus* el complemento cromosómico incluye a un mayor número de cromosomas metacéntricos o submetacéntricos, a pesar del menor número total de cromosomas, entre los que destaca el X que es notoriamente mayor en tamaño que los restantes autosomas.

De la sub-familia Gryllacridinae se conoce y mal, muy pocas especies desde el punto de vista cariológico. La variación en número oscila desde $2n = 17$ en *Nippancistroger testaceus* (Matsumura y Shiraki (Ohmachi, 1935), $2n = 11$ en *Gryllacris signifera* (Stool), (Heberer, 1937) y ahora $2n = 29$ en *Cratomelus armatus* (Blanchard. Todas las especies con mecanismo determinante del sexo del tipo $XO \sigma - XX \varphi$. Por lo tanto, a la luz de los datos de que se dispone, no es posible emitir un juicio sobre las relaciones cromosómicas del grupo, salvo en lo que se refiere a la variación numérica.

BIBLIOGRAFIA

- Borror, D.J. and D.M. Delong. 1970. An introduction to the study of insects. Third Edition Holt, Rinehart and Winston p. 144.
- Cea, G. 1974. Nuevo método para el estudio de cromosomas en insectos. Bol. Soc. Biol. de Concepción. 47:289-291.
- Heberer, G. Von, 1937. X-Chromosomen und spermiengröße. Untersuchungen an einheimischen und tropischen. Orthopteren. Zeit. int. Abstamm -u-Vererblehre 73:479-482.
- Levan Al. Frega, K., Sandberg A.A. 1964. Nomenclature for Centromeric position on chromosomes. Hereditas. London 52:201-220.
- Mesa, A., 1965. Caryology of four Chilean species of Gryllacridoidea; Rhabdophoridae). Occasional Papers Museum Zool. Univ. Michigan 640, 1-13.
- Mesa, A., Ferreira, A., de Mesa, R.S. 1968. The Karyotype of some Australian species of Macrophathinae (Gryllacridoidea-Rhabdophoridae) Chromosoma (Berl) 24, 456-466.
- Ohmachi, F., 1935. The relation between chromosomes and classification in the Gryllidae Dobutsugaku Zasshi (Zool.Mag.), 47:593-605.
- Tyrkus, M., 1971. Cricket haematocytes: a chromosome culture method. Ann. entomol. Soc. Amer. 64, 1169-1170.