

BANDEADO CROMOSOMICO: BANDAS G., EN *AKODON LONGIPILIS HIRTUS* THOMAS (RODENTIA, CRICETIDAE)

P O R

ROLANDO MONTOYA M. y WALDO VENEGAS S. (*)

RESUMEN

Se presenta el bandeo de los cromosomas de *Akodon longipilis hirtus* Thomas, el que fue obtenido con Giemsa, previo tratamiento con Tripsina al 0,5%. El número diploide encontrado es de $2n = 52$ cromosomas, los homólogos son fácilmente identificables usando esta técnica. El método será utilizado próximamente para hacer estudios cromosómicos comparativos con otras especies del género, y así proponer un esquema evolutivo de este taxón.

ABSTRACT

Chromosomic banding of *Akodon longipilis hirtus* Thomas, obtained with Giemsa, previous treatment with Tripsine 0,5%, is presented. The diploid number found is $2n = 52$ chromosomes. The homologous are easily identified with this technique. This method will be proximately used for comparative chromosomic studies with other species of the genus, so as to propose an evolutionary schema of the taxon.

INTRODUCCION

Desde hace unos ocho años, se abrieron nuevos campos de investigación en el estudio de los cromosomas. Estos nuevos horizontes comenzaron a surgir cuando Caspersson et al (2, 3, 4, 5) presentó por primera vez, sus trabajos sobre cromosomas humanos bandeados con Quinacrina Mustard, que es un colorante de tipo fluorescente. Desde entonces hasta ahora, se han acumulado innumerables trabajos que dicen relación con este tema de bandeo. Trabajos que informan de nuevas técnicas (1, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 27), de modificaciones de las ya existentes, de los mecanismos de bandeo cromosómico (6, 7, 8, 13, 15), de su utilidad como herramienta rutinaria en el trabajo citogenético (4, 22, 26), etc.

De esta manera, podemos decir, que se han conseguido técnicas, que permiten la identificación de cromosomas mitóticos y meióticos, de mamíferos (1, 2, 4, 12, 13, 26), de plantas (3, 20, 27) de

(*) Departamento de Biología Celular, Instituto de Biología "Ottmar Wilhelm Grob", Universidad de Concepción.

insectos, por medio de *Patrones de Bandedado*. Los métodos de bandedado informados hasta ahora se pueden dividir en dos clases:

- a) de acuerdo a si está involucrado el centrómero (10)
 - Bandas C
- b) si está involucrado el cromosoma completo (10)
 - Bandas Q
 - Bandas G
 - Bandas R
 - Bandas T

Esto por nombrar las más importantes. Lo interesante, es que cuando se describe una técnica de bandedado, sea para obtener un *Patrón de Bandas*, es decir, bandas que se repitan de idéntica manera de una preparación a otra.

La interpretación de por qué se forma este bandedado es compleja debido a la gran cantidad de tratamientos que inducen un bandedado similar; éstos incluyen reactivos tales como sales inorgánicas, bases, agentes quelantes, distintos buffers, detergentes, denaturantes de proteínas, enzimas proteolíticas y agentes oxidantes (13, 14, 19, 21, 22, 23, 24, 25).

Las técnicas de bandedado fluorescentes y Giemsa han sido muy utilizadas en la identificación de cromosomas normales y aberrantes, cromosomas homólogos, para estudiar anomalías cromosómicas tales como inversiones, translocaciones (22), fusiones cromosómicas (tipo Robertsonianas), además de servirnos para estudiar posibles mecanismos de especiación (26).

MATERIALES Y METODOS

Los ejemplares de *Akodon longipilis hirtus* Thomas estudiados fueron capturados en Chillán (Cordillera de Chillán), con trampas de tipo Sherman y analizados bajo el punto de vista Citogenético, de acuerdo a las técnicas de rutina, con algunas modificaciones que serán comentadas más adelante. Se encontró en todos ellos un número diploide $2n = 52$ cromosomas, los que no presentaron alteraciones visibles en su morfología.

50 minutos antes de ser sacrificados, los animales fueron inyectados con 1 ml. por 100 grs. de peso, con colchicina al 0.01% vía intraperitoneal.

Se disecó los fémures para obtener la médula ósea, la cual fue tratada para lograr bandedado de tipo G, de acuerdo a una modificación a la técnica presentada por Chiarelli que en sus pasos fundamentales trata los cromosomas con una solución de Tripsina al 0.5% a 4°C por 15 a 20 segundos.

Posteriormente, se tiñeron las placas con Giemsa al 2% con buffer Sörensen, pH = 7.00, durante 15 minutos.



Fig. 1.—Cariotipo y placa metafásica mitótica, bandas G., de un macho de *Akodon longipilis hirtus* Thomas.

Las preparaciones fueron montadas permanentemente con Euparal y fotografiadas con película Kodak de alto contraste.

RESULTADOS

En la figura 1, se observa el cariotipo y placa metafásica mitótica de un macho de *Akodon longipilis hirtus* obtenida de médula ósea y teñida por el método descrito anteriormente; en esta fotografía se puede observar perfectamente el bandeo de tipo G, que es distinto para cada par de cromosomas homólogos, por lo que su identificación es posible aún sin efectuar medidas convencionales en ellos. Si hubiese una posible alteración en su morfología, también sería pesquizada de esta manera.

En la figura 2, se presenta el idiograma de bandas G, de este roedor de la familia *Cricetidae*, el set haploide de cromosomas, ordenados por tamaño decreciente, está formado por cromosomas en su mayoría acrocéntricos, con excepción de los números 14 y 20 que fueron considerados como submetacéntricos, y el número 25 con centrómero claramente en la región media por lo que fue considerado como cromosoma metacéntrico. En la parte inferior de la figura, los trazos negros de diferente espesor, representan bandas claramente identificadas, las regiones achuradas con líneas blancas, representan zonas en que no es posible identificar bandas con claridad. A manera de comparación, en la parte superior de la figura se presenta el juego haploide de cromosomas, teñidos con Giemsa, pero sin bandear, que muestra claramente la morfología antes mencionada.

DISCUSION

De acuerdo a los resultados presentados, podemos decir que los cromosomas de los roedores del género *Akodon* resultan un excelente material para realizar estudios cromosómicos comparativos entre las diferentes especies que componen este taxón, puesto que presentan cromosomas de un tamaño adecuado y es posible obtener fácilmente un banding sobre ellos, además, estos roedores, son fácilmente capturables y se encuentran en buen número a lo largo de todo el territorio chileno y sudamericano en general. Cabe señalar, que las otras especies y subespecies de este género representadas en Chile, presentan número y morfología cromosómica de gran similitud a los presentados en este trabajo (Venegas, en redacción) por lo que un estudio comparativo por medio de bandeo se hace de absoluta necesidad.

Analizando las placas metafásicas (Fig. 1), concluimos que esta técnica de bandas G, resulta de gran utilidad no sólo en la identificación de los cromosomas homólogos sino también en la detección de cualquier posible anomalía que hubiere en la morfología de ellos. En lo que se refiere a la identificación de homólogos, fuera de las medidas convencionales necesarias para tal efecto, ésta se hace

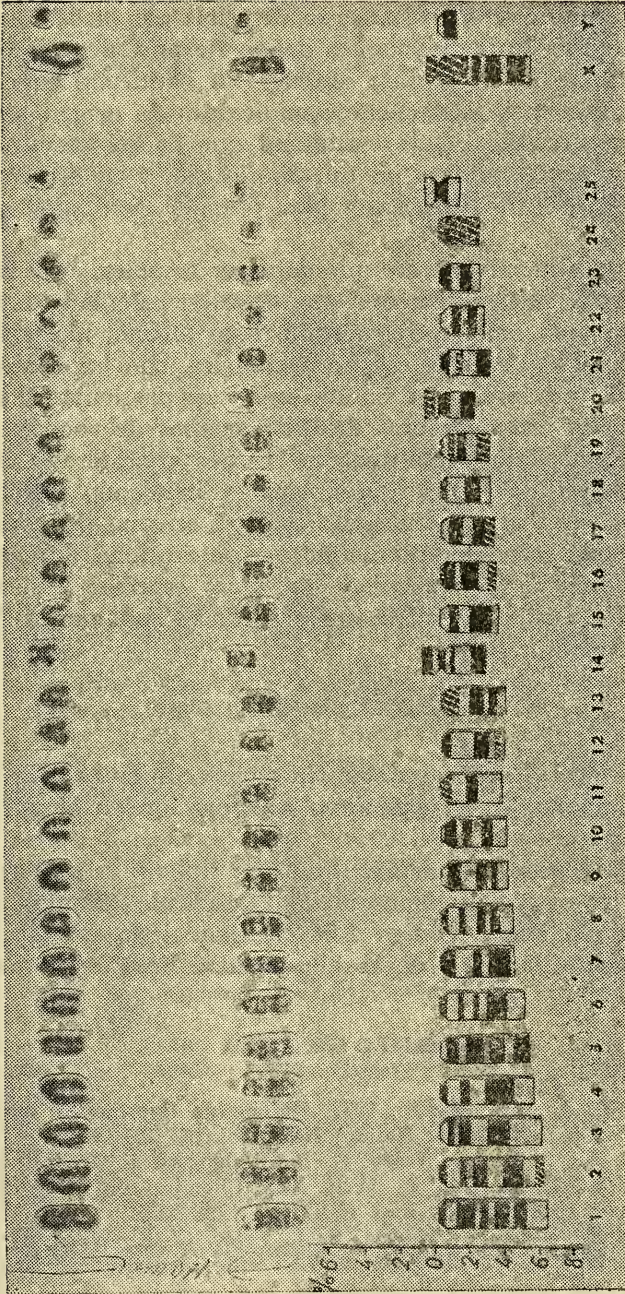


Fig. 2.— Idiograma, bandas G., de *Akodon longipilis hirtus* Thomas. En la parte superior de la figura se muestra el set haploide sin bandear.

más precisa aún, cuando acompañando al bandeado G, se realizan tinciones de bandeado de otro tipo, como bandas C, Q, R o T.

Durante el transcurso de nuestra investigación, también nos hemos encontrado con dificultades ya descritas por otros autores, por ejemplo: ninguna de las soluciones deben llevar Calcio o Magnesio, en caso contrario no es posible obtener un bandeado adecuado; es necesario además tomar en cuenta condiciones de origen ambiental, como temperatura, humedad y salinidad que hacen que una misma técnica dé buenos resultados en un laboratorio, y en otros sea necesario hacer algunas modificaciones para obtener resultados satisfactorios.

Otro gran inconveniente que debe ser resuelto, es el problema de concentración de la colchicina, que debe ser calculada experimentalmente para cada especie en cuestión. Esto último, lo estamos subsanando, con los cultivos de sangre perisférica, con los cuales hemos obtenido excelentes resultados, no sólo en el caso particular de *Akodon*, sino también en representantes de otros grupos de roedores.

En este trabajo preliminar no hemos considerado necesario describir en detalle el cariotipo normal y bandeado visible de la subespecie que nos ocupa, pues ello se hará en una próxima publicación en la que se contemplará una mayor cantidad de datos y un estudio cromosómico comparativo con otras especies y subespecies del género *Akodon*; estos interesantes roedores sudamericanos de la familia Cricetidae.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar sus agradecimientos a la señorita Luz Eugenia Spano T., su entusiasta colaboración en el manejo del material de laboratorio.

Se deja constancia además, que este trabajo es una parte del proyecto de investigación denominado "Bandeado Cromosómico en Octodóntidos Chilenos", código 2.08.27, financiado por el Consejo de Investigación Científica de la Universidad de Concepción.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— Buckland, R. A., y P. Marchi, 1972. Quinacrina fluorescence and Giemsa staining in plants. *Nature (Lond.) New Biol.* 237:191-192.
- 2.— Caspersson, T., Farber, S., Foley, G. E., Kudgnows, J., Modest, E. J., Simonsson, E., Wagh, U. y L. Tech, 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* 49:219-222.
- 3.— Caspersson, T., Tech, L., Modest, E. J., Foley, G. E., Wagh, U. y E. Simonsson, 1969a. Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* 58:128-140.
- 4.— Caspersson, T., Tech, L., Johnsson, C. y E. J. Modest, 1970. Identification of human chromosomes by DNA binding fluorescent agents. *Chromosoma (Berl.)* 30:215-227.

- 5.—Caspersson, T., Tech, L. y C. Johansson, 1970. Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA binding fluorescent agents. *Exp. Cell Res.* 62:490-492.
- 6.—Comings, D. E. 1975. Mechanisms of Chromosome Banding. IV Optical Properties of the Giemsa Dyes. *Chromosoma (Berl.)* 50:89-110.
- 7.—Comings, D. E., Kovacs, B. W., Avelino, E. y D. C. Harris, 1975. Mechanisms of Chromosome Banding. V Quinacrine Banding. *Chromosoma (Berl.)* 50: 111-145.
- 8.—Comings, D. E. y E. Avelino, 1975. Mechanism of Chromosome Banding. VII Interaction of Methylene Blue with DNA and Chromatin. *Chromosoma (Berl.)* 51:365-379.
- 9.—Drets, M.E. y M.V. Shaw, 1971. Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 68:2037.
- 10.—Dutrillaux, B., y J. Lejeune, 1971. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 272 D:2638-2640.
- 11.—Dutrillaux, B., 1973. Nouveaux système de marquage chromosomique: les bandes T. *Chromosoma (Berlin)* 41:395-402.
- 12.—Kato, H. y T. H. Yosida, 1972. Banding patterns of Chinese hamster chromosomes revealed by new techniques. *Chromosoma (Berl.)* 36:272-280.
- 13.—Kato, H. y K. Moriwake, 1972. Factors involved in the production of banded structure in mammalian chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* 38:105-120.
- 14.—Lee, C. L. Y., Welch, J. P. y S. H. S. Lee, 1973. Banding of human chromosomes by protein denaturation. *Nature (Lond.) New Biol.* 241:142-143.
- 15.—Okada, T. A., y D. E. Comings, 1974. Mechanisms of Chromosome Banding. III Similarity between G. Bands of Mitotic Chromosomes and Chromomeres of Meiotic Chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* 48:65-71.
- 16.—Hamerton, J. L., Jacobs, P.A. y H. P. Klinger, 1971. Paris Conference, Standardization in Human Cytogenetics. The National Foundation, March of Dimes Vol. VIII N° 7.
- 17.—Prieur, M., Dutrillaux, B. y J. Lejeune, 1973. Planches descriptives des chromosomes humains (Analyse en Bandes R et Nomenclature selon la Conférence de Paris 1971. *Ann. Génét* 16 (sous presse 1973).
- 18.—Schnedl, W., 1971a. Banding patterns of human chromosomes. *Nature (Lond.) New Biol.* 233:93.
- 19.—Schnedl, W., 1971a. Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. *Chromosoma (Berl.)* 34:448-454.
- 20.—Schweizer, D., 1973. Differential Staining of Plant Chromosomes with Giemsa. *Chromosoma (Berl.)* 40:307-320.
- 21.—Seabright, M., 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* II:971-972.
- 22.—Seabright, M., 1972. The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. *Chromosoma (Berl.)* 36:204-210.
- 23.—Summer, A. T., Evans, H. J. y R. A. Buckland, 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature (Lond.) New Biol.* 232:31-32.
- 24.—Summer, A. T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75:304-306.
- 25.—Utakoji, T., 1972. Differential staining of human chromosomes stained with potassium permanganate. *Nature (Lond.)* 239:168-170.
- 26.—Voiculescu, I., 1974. A comparative study of the chromosomes banding patterns of *Mesocricetus newtoni* and *Mesocricetus auratus*. *Z. Säugetierkunde* 39:211-219.
- 27.—Vosa, C. G. y P. Marchi, 1972. Quinacrina fluorescence and Giemsa staining in Plants. *Nature (Lond.) New Biol.* 237:191-192.