

## CARACTERIZACION DE LA HETEROCROMATINA EN *Tinca tinca* L. POR LA OBTENCION DE BANDAS-C Y CONTRATINCIONES CON FLUOROCROMOS ADN ESPECIFICOS

**Autores:** \*J.L. Fernández-García, \*\* I. Rodríguez de Ledesma, \* M. Martínez-Trancón, \*A. Rabasco, \*\*J.J. Pérez- Regadera y J.A. Padilla\*

**Dirección:** \* Genética y Mejora Animal. Facultad de Veterinaria. Ctra. de Trujillo s/n. 10071 Cáceres. \*\* Servicio de Investigación Agraria. Junta de Extremadura. Ctra. de Cáceres Km. 6. 06071 Badajoz. \*\*\* Centro Nacional de Acuicultura «Las Vegas del Guadiana». Consejería de Agricultura, Comercio e Industria (Junta de Extremadura). c/ Los Angeles, 11. 06195. Villafranco del Guadiana. Badajoz.

**Palabras Clave:** Bando Cromosómico. Heterocromatina constitutiva. Fluorocromos específicos del ADN. Contratinción. Tencas (*Tinca tinca*).

### INTRODUCCION

La heterocromatina constitutiva ha sido definida como bloques de cromatina permanentemente condensados localizados en regiones discretas de los cromosomas homólogos de un complemento dado (Brown, 1966) (1). La detección y caracterización de las regiones heterocromáticas ha sido posible por el descubrimiento de técnicas de bandeo diferencial (bandoes C, G y R) en cromosomas mitóticos (MacGregor y Varley, 1983) (2), que han permitido, además, identificar las parejas de cromosomas homólogos en la mayor parte de los vertebrados. Estas técnicas se han aplicado con éxito en mamíferos, aves, reptiles, anfibios y quelonios (Gold *et al.*, 1988) (3). En los peces, sin embargo, se han publicado sólo unos pocos estudios de bandeos cromosómicos debido a dos causas fundamentales: en primer lugar, a la dificultad de producir buenas extensiones metafásicas (Gold, 1979) (4), puesto que la mayor parte de las especies piscícolas poseen un número relativamente alto de pequeños cromosomas; y en segundo lugar, a la menor especificidad de estas técnicas en los peces (Gold *et al.*, 1988) (3). El bandeo-C es el método rutinario para localizar la heterocromatina constitutiva en un amplio número de organismos (Sumner, 1972; King y John, 1980) (5 y 6), mientras que la utiliza-

ción de fluorocromos específicos del ADN tales como 4'-6-diamidinofenilindol (DAPI), o la Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) permiten la detección de regiones cromosómicas que contienen en el ADN altas cantidades de pares de bases AT o GC, respectivamente (Schweizer, 1976; Jorgenson *et al.*, 1978; Schweizer, 1981) (7, 8 y 9).

En *Tinca tinca* L., sin embargo, se han obtenido varios cariotipos por medio de diferentes técnicas de tinción. Así, Cataudella *et al.* (1977), Sola *et al.* (1983) y Padilla *et al.* (1992) (10, 11 y 12) utilizando métodos de tinción convencional con Giemsa han encontrado el patrón cariotípico de las tencas. Hafez (1979) (13) obtuvo los patrones de Bandoes C y G en los cromosomas de las tencas, pero sus resultados no fueron concluyentes.

En este trabajo se presenta el cariotipo de bandeo C y los patrones de marcaje cromosómico obtenidos después de contrateñir con fluorocromos específicos del ADN (DAPI/AD/DAPI y CMA<sub>3</sub>).

### MATERIAL Y METODOS

*Tinca tinca* L., (2n=48) es un ciprínido de especial interés en acuicultura. Los animales utilizados en este estudio fueron recogidos del Centro Nacional de Ciprínidos Las Vegas del Guadiana (Badajoz), transportados vivos

y mantenidos en un acuario convenientemente aireado hasta su tratamiento.

Los cromosomas metafísicos fueron obtenidos de células de riñón según el siguiente método:

a) Las tencas fueron tratadas con 0.02-0.04 mg. de Phitohemaglutinina-M (Gibco) por g de peso vivo, inyectadas intraperitonealmente por dos veces con una diferencia entre inyección de 24 horas (según el método de Pandás *et al.*, 1990) (14).

b) Dieciocho horas después de la segunda inyección se administró intraperitonealmente 1 ml. de colchicina al 0.05X en 0.85 % de NaCl, por cada 100 g. de peso vivo, se devolvieron al acuario 6 horas antes del sacrificio, siguiendo el método modificado de Gold (1974) (15).

c) El sacrificio se llevó a cabo por decapitación. Se disecó la mitad craneal del riñón y cuidadosamente se separó el tejido renal por cortes en pequeños trozos. Esta suspensión de tejido fue tratada, por dos veces, con una solución hipotónica (KCl 0.075 M) a 37° C durante 1 hora. Se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante.

d) La fijación del botón celular se realizó en metanol-ácido acético en proporción 3:1, durante 2 horas a 4° C. Posteriormente se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 10 min. y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 4 ml de fijador recién preparado y se resuspendió el botón celular con cuidado. Se repitió el centrifugado y la fijación dos veces más. Las preparaciones se hicieron por el método de goteo de la suspensión celular.

**Método de Bando-C:** Las preparaciones secadas al aire se incubaron en HCl 0.2 N durante 30 minutos. Posteriormente se sumergieron durante 4 min. en una solución saturada de Ba(OH)<sub>2</sub> a 37° C, y se incubaron en 2 x SSC a 60° C durante 1 h. Los portas se tiñeron en una solución de Giemsa al 5 % en tampón de fosfatos a pH 6.8, durante 10 minutos.

Los modelos de bando fluorescentes fueron obtenidos utilizando los métodos de contratinción desarrollados por Schweizer (1980) (9). Para las microfotografías de fluo-

rescencia se utilizó una película KODAK TMAX, a 100-125 ASA, en un microscopio ZEISS con bloques de filtros de fluorescencia 02 y 06 con excitación a 365 y 435 nm, para Actinomicina D/DAPI y CMA<sub>3</sub>, respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El número diploide de las tencas fue establecido por Onho *et al.* (1967) (16) en  $2n=48$ . El cariotipo de bando C de la tencas obtenido en este trabajo se presenta en la figura. 1. Está aceptado en la bibliografía que la técnica de tinción diferencial de bandas C provoca sobre los cromosomas la detección de la heterocromatina constitutiva a nivel de regiones centroméricas (Pardue y Gall, 1970; Arrighi y Hsu, 1971) (17 y 18). Sin embargo, aunque las bandas-C en las tencas son esencialmente centroméricas, se pueden observar además algunas bandas intercalares y teloméricas.

Así, en las tencas se pueden observar (Fig. 1):

— Bandas centroméricas en las parejas cromosómicas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 del grupo de

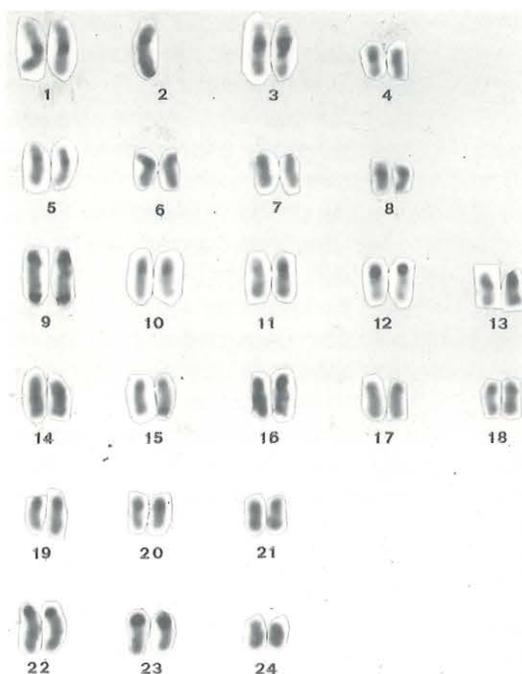


Figura 1.—Cariotipo de Bando C de una hembra de *Tinca tinca* L. ( $2n=48$ ).

cromosomas metacéntricos, sobre las parejas 10, 11, 13, 15, 18, 19, 20 y 21 del grupo de los submetacéntricos y sobre las parejas de cromosomas homólogos 22, 23 y 24 del grupo de los telocéntricos.

— Asimismo es posible distinguir bandas C positivas que ocupan todo el brazo corto (p) en las parejas de cromosomas homólogos 9, 12, 16 y 17.

— Por otra parte, sólo las parejas cromosómicas 2, 12 y 22 presentan bandas intercalares.

— El par metacéntrico número 3 se tiñe positivamente con bandas C en la constricción secundaria.

— Se observan bloques heterocromáticos teloméricos en los pares cromosómicos 9, 11, 13, 15, 16, 18 y 21 del grupo de los submetacéntricos-acrocéntricos.

— El par cromosómico número 14 parece estar desprovisto de heterocromatina constitutiva.

No hemos detectado polimorfismo heterocromático intraespecífico ni intraindividual (Fig. 1), en contraste con los resultados de Hafez (1979) (13) que sí encontró polimorfismo cromosómico intraespecífico en el número, localización y coloración de las bandas sobre las parejas cromosómicas 7, 20 y 22. Las diferencias detectadas en la intensidad de coloración de bandas entre cromosomas pertenecientes al mismo par homólogo, no creemos que indiquen la existencia de polimorfismo heterocromático cuantitativo intraindividual, sino diferencias de compactación de la heterocromatina en la banda C, debidas a la propia técnica de bandeo.

Las diferencias entre los cariotipos de bandeo-C obtenidos por Hafez (1979) (13) y nuestro cariotipo se podrían explicar por las diferencias poblacionales existentes entre los individuos utilizados en ambos trabajos. Nuestros ejemplares fueron recogidos de una población genéticamente homogénea que fue creada a partir de unos pocos padres y que ha sufrido unas fuertes presiones de selección. Las diferencias intraespecíficas e intraindividuales, si existían, han sido seleccionadas en contra a lo largo de los años. Sin embargo, las tencas usadas en el trabajo de

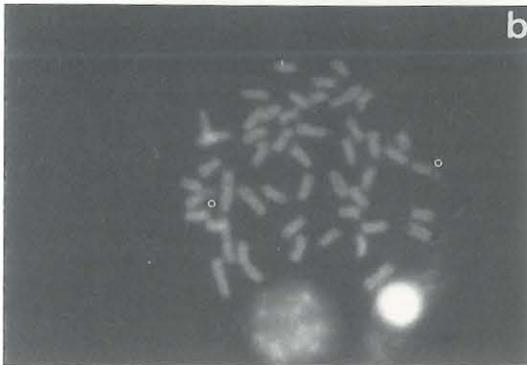
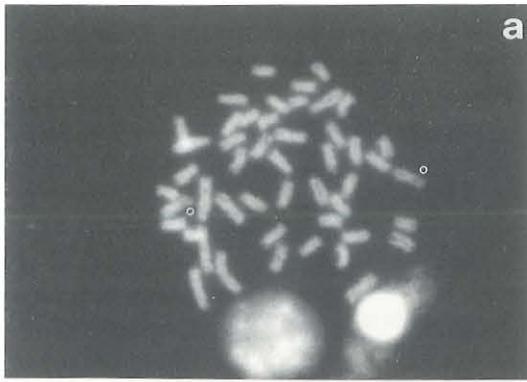
Hafez (13) fueron capturadas de una población silvestre y, por lo tanto, presumiblemente heterogénea. Este tipo de variabilidad poblacional ha sido descrita previamente en otras especies de peces (revisado en Kirpichnikov, 1981) (19).

En nuestras preparaciones convencionales es fácil distinguir la constricción secundaria en la pareja de cromosomas homólogos metacéntricos número 3. La localización del organizador nucleolar fue observada sobre los satélites de este cromosoma mediante técnicas de tinción con plata (Padilla *et al.*, 1992) (12). Hemos encontrado sobre la constricción secundaria de esta pareja de cromosomas homólogos bandas C positivas coincidentes en su posición con las regiones teñidas con plata (Fig. 1). El bandeo C indica la presencia de heterocromatina constitutiva asociada a los NOR. Este hecho ha sido considerado causante de desigual sobre cruzamiento o intercambio de cromátidas hermanas que ha originado polimorfismos de tamaño en los NOR (Sola *et al.*, 1988) (20). Resultados similares han sido descritos en otras especies de peces (Galleti *et al.*, 1984; Phillips *et al.*, 1986; Cau *et al.*, 1989 y Sánchez *et al.*, 1990) (21, 22, 23 y 24). En las tencas analizadas no hemos encontrado este tipo de polimorfismos de los NOR.

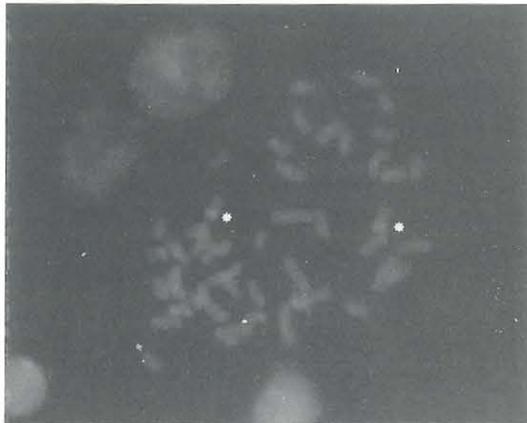
En la figura 2 se observa una metafase somática teñida con DAPI (Fig. 2a) y contra teñida con Actinomicina D/DAPI (Fig. 2b). Con este método se observa una fluorescencia uniforme en todos los brazos cromosómicos; observándose tinción fluorescente negativa en las regiones de los organizadores nucleolares.

Resultados similares fueron obtenidos por Mayr *et al.* (1986 a) (25). Estos resultados indican que las secuencias ricas en pares de bases AT se encuentran uniformemente distribuidas sobre los cromosomas de la tencas, si exceptuamos las regiones NOR.

En la figura 3 se presenta una célula somática después de contratinción con Cromomicina A<sub>3</sub>. Este método de tinción produce sobre los cromosomas de tencas bloques brillantes de CMA<sub>3</sub>, bien definidos, sobre las regiones del organizador nucleolar. Este método de bandeo se ha utilizado en las



**Figura 2.**—Metafase somática de un macho de *Tinca tinca*, L. teñida con DAPI (a) y Actinomicina D/DAPI (b).



**Figura 3.**—Metafase somática de un macho de *Tinca tinca* L. contrateñida con CMA<sub>3</sub>.

especies piscícolas para detectar, en el ADN, las secuencias ricas en pares de bases GC asociadas a las regiones del organizador nucleolar (NOR). Estos resultados indican que la heterocromatina constitutiva asociada a los NOR que ha sido puesta de manifiesto mediante la técnica de bandeado C (Fig. 1) está constituida por regiones altamente repetitivas, ricas en pares de bases G-C, como se de-

muestra por la técnica de fluorescencia CMA<sub>3</sub>. Sin embargo, debemos pensar que en la heterocromatina asociada a las regiones centroméricas C positivas existe una menor riqueza en pares de bases GC, dada la ausencia de una fluorescencia diferenciada en dichas regiones. Resultados similares han sido obtenidos en otras especies de peces (Mayr *et al.*, 1986 a, b, 1988; Amemiya, 1986; Amemiya y Gold, 1986, 1988; Rab, 1987) (25, 26, 27, 28, 29 y 30).

En resumen, los resultados de nuestro estudio indican que es posible identificar la parejas de cromosomas homólogos de las tencas por medio de técnicas de tinción diferencial que ponen de manifiesto la heterocromatina constitutiva (Bandeado-C), y que las técnicas que detectan secuencias específicas del ADN tienen menos éxito para tal efecto. Sin embargo, estas últimas pueden tener rápida aplicación para detectar el número de NOR y, por tanto, los niveles ploídicos de los embriones producidos por las nuevas técnicas de manipulación cromosómica utilizadas con objeto de mejorar las especies piscícolas.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) BROWN, S.W. (1966): Heterochromatin. *Science*, 151: 417-425.
- (2) MACGREGOR, H.C.; VARLEY, J. (1983): Working with Animal Chromosomes. John Wiley and Sons Ltd. New York.
- (3) GOLD J.R.; ZOCH P.K.; AMEMIYA C.T. (1988): Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). XIV Chromosomal NOR phenotypes of eight species from the genus *Notropis*. *Cytobios* 54: 137-147.
- (4) GOLD J.R. (1979): Cytogenetics, p. 353-405. In: Fish physiology. Vol. 8. W. S. Hoar, D. J. Randall and J. R. Brete (eta.). Academia Press, New York.
- (5) SUNMER, A.T. (1972): A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 75: 304-306.
- (6) KING, M.; JOHN, B. (1980): Regularities and restrictions governing C-band variations in acridoid grasshoppers. *Chromosoma*, 76: 123-150.
- (7) SCHWEIZER, D. (1976): Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324.
- (8) JORGENSEN, K.F.; VAN DE SANDE, J.L.; LIN, C.C. (1978): The use of base pair specific DNA binding agents as affinity labels for the study of Mammalian chromosomes. *Chromosoma*, 68: 287-302.

- (9) SCHWEIZER, D. (1981): Counterstaining enhanced chromosome banding. *Hum. Genet.* 57: 1-14.
- (10) CATAUDELLA, S.; SOLA, L.; ACCAME-MURATORI, R.; CAPANNA, E. (1977): The chromosomes of 11 species of Cyprinidae and one Cobitidae from Italy, with some remarks on the problem of polyploidy in the Cypriniformes. *Gen Etica* 47(3): 161-171.
- (11) SOLA, L.; CATAUDELLA, S.; GENTILI, G.; MONACO, G. (1983): An experimental carp x ten ch hybrid: Karyological analysis and SEM morphological observations. *Boll Zool* 50: 159-171.
- (12) PADILLA J.A.; FERNANDEZ-GARCIA, J.L.; RABASCO, A.; MARTINEZ-TRANCON, M.; RODRIGUEZ DE LEDESMA, I.; PEREZ REGADERA, J.J. (1992): Characterization of the karyotype of *Tinca tinca* L and analysis of the chromosomal heterochromatin regions by C-, Ag-, and restriction endonuclease banding. *Cytogenet. Cell Genet.* (en prensa).
- (13) HAFEZ, R. (1979): Analisis du caryotipe de la tanche (*Tinca tinca* L.) par l'obtencion des bandes C et G. *Cybiurn 3e serie* 7: 15-26.
- (14) PENDAS, M.; LOBILLO, A.; MORAN, P. (1990): Técnica directa para el incremento del número de células mitóticas en salmonidos. XXV Jornadas de Genética Luso-Españolas. Alcalá de Henares. pp 252.
- (15) GOLD, J.R. (1974): A fast and easy method for chromosome karyotyping in adult teleosts. *The progressive fish-culturist* 36 (3): 169-171.
- (16) OHNO, S.; MURAMOTO, J.; CHRISTIAN, L.; ATKIN, N.B. (1967): Diploid-Tetraploid relationship among old-world members of the fish family Cyprinidae. *Chromosoma*, 23: 1-9.
- (17) PARDUE, M.L.; GALL, J.G. (1970): Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168: 1356-1358.
- (18) ARRIGHI, F.; HSU, T. C. (1971): Localization of heterochromatine in Human chromosomes. *Cytogenet.*, 10: 81.
- (19) KIRPICHNIKOV, V. S. (1981). Gene tic Bases of fishselection. Springer Verlag. Benin, Heidelberg, New York.
- (20) SOLA, L.; NATILI, G. L.; CATAUDELLA, S. (1988): Cytogenetical characterization of *Odontesthes bonariensis* (Plates, Atherinidae) an Argentine species introduced in Italy. *Gen Etica*, 77: 217-224.
- (21) GALETTI, P.M. Jr; FORESTI, F.; BERTOLLO, L.A. C.; MOREIRA FILHO, O. (1984): Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. *Caryologia*, 37: 401-410.
- (22) PHILLIPS, R.; ZAJICEK, K.D.; UTTER, F.M. (1986): Chromosome banding in salmonid fishes: nucleolar organizer regions in *Oncorhynchus*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28: 502-510.
- (23) CAU, A.; SALVADORI, S.; DEIANA, A.M.; BELLA, J.L.; MEZZANOTTE, R. (1988): The characterization of *Murena helena* L. mitotic chromosomes: Karyotype, C-banding, nucleolar organizer regions and in situ digestion with restriction endonucleases. *Cytogenet. Cell Genet.*, 47: 223-226.
- (24) SANCHEZ, L.; MARTINEZ, P.; VIÑAS, A.; BOUZA, C. (1990): Analysis of the structure and variability of nucleolar organizer regions of *Salmo trutta* by C-, Ag-; and restriction endonucleases banding. *Cytogenet. Cell Genet.*, 54: 6-9.
- (25) MAYR, B.; RAB, P.; KALAT, M. (1986 a): NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in Cyprinidae of different ploidy level. *Genética*, 69: 111-118.
- (26) MAYR, B.; RAB, P.; KALAT, M. (1986): Localisation of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Salmo gairdneri* and *Salmo trutta* (Pisces, Salmonidae). *Theor. Appl. Genet.*, 71: 703-707.
- (27) MAYR, B.; KALAT, M.; RAB, P. (1988): Heterochromatins and band Karyotypes in three species of Salmonids. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 45-53.
- (28) AMEMIYA, C.T. (1986): The karyotype of the Mexican Blinca, *Prietella phreatophila* Carranza (Ictaluridae). *Copeia*, 4: 1048-1028.
- (29) AMEMIYA, C.T.; GOLD, J.R. (1986): Chromomycin A<sub>3</sub> stains nucleolar organizer regions of fish chromosomes. *Copeia* 1: 226-231.
- (30) RAB, P. (1987): Chromosome banding studies in European esocoid fishes: localization of nucleolar organizer regions in *Umbra krameri* and *Exos*. *Copeia*, 4: 1062-1067.

## Agradecimientos

Los autores estamos especialmente agradecidos a los Profesores D. Jaime Gosálvez y D. José Bella, del Dpto. de Biología (Genética) de La Universidad Autónoma de Madrid, por habernos facilitado los métodos de contraindicaciones con fluorocromos específicos del ADN.

Este trabajo ha sido subvencionado por la Consejería de Agricultura, Comercio e Industria de la Junta de Extremadura, en el marco del convenio en materia de acuicultura entre la UNEX (Dpto. de Zootecnia. Genética) y la Junta de Extremadura.