

NOTA BREVE

DETECCION DE LA REGIÓN DEL ORGANIZADOR NUCLEOLAR EN CROMOSOMAS DE LA FAMILIA MUGILIDAE (PERCIFORMES): PRECISIONES TÉCNICAS.

DETECTION OF THE NUCLEOLAR ORGANIZER REGIONS IN THE CHROMOSOMES OF THE FAMILY MUGILIDAE (PERCIFORMES): TECHNICAL IMPROVEMENTS.

Delgado, J.V.*, G. Thode**, J. Lobillo*, M.E. Camacho*, A. Alonso*
y A. Rodero*.

*Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. 14005 Córdoba. España.

** Departamento de Biología celular y Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. 29071 Málaga. España.

== PALABRAS CLAVE ADICIONALES ==

Mugílidos. Citogenética. NORs.

== ADDITIONAL KEYWORDS ==

Mugilids. Cytogenetics. NORs.

== SUMMARY ==

In the present paper we offer some technical improvements for the NORs detection in Mugilids. With these modifications we have got to detect two carrier chromosomes, with subterminal localization. At the same time, we got clear pictures of the nucleolus in the interphasic cells. The NORs' knowledge of this species offers important taxonomic and cytoevolutionary information about this family and it is useful to design planes of genetic improvement based in the chromosomal manipulation and interspecific hybridizations.

== RESUMEN ==

En el presente trabajo se presentan una mejora metodológica para la detección de las NORs en mugílidos. Con estas modificaciones se ha conseguido detectar dos cromosomas portadores con localización subterminal e imágenes de los nucleolos en las células interfásicas altamente definidas.

El conocimiento de los NORs en los mugílidos ofrece una valiosa información taxonómica y citoevolutiva y es útil en el planteamiento de planes de mejora genética basados en la manipulación cromosómica y en la hibridación interespecífica.

== INTRODUCCION ==

Las distintas especies de la familia *Mugilidae* son cultivadas en todo el mundo, desde antiguo, como fuente de proteínas de alta calidad con destino al consumo humano (Iversen 1968). Los cultivos de estas especies toman especial relevancia en países del tercer mundo donde llegan a ser masivos (Kurian 1975).

La escasez de estudios, sobre todo genéticos, sobre los mugílidos, a pesar de su importancia comercial, fue seña-

lada por, Oren (1975) quien solicitaba una mayor atención, en este área.

Consecuentemente Kirpichnicov (1981) planteó las hibridaciones interespecíficas como vía para la mejora productiva de la familia. En este sentido, nuestro equipo ha realizado varios estudios sobre los complementos cromosómicos de algunas de las especies que componen esta familia, para los cuales ha sido necesario desarrollar toda una metodología específica.

En la presente nota, ofrecemos algunas precisiones técnicas para la investigación de las regiones del organizador nucleolar de los cromosomas de los mugílidos, en función de los resultados obtenidos en tres de sus especies mediterráneas; *Liza aurata*, *L. ramada* y *Chelon labrosus*.

Las regiones cromosómicas del organizador nucleolar (NORs), donde se ubican los genes responsables de la organización del nucleolo, son unas de las partes del genoma más conservadas en la evolución de los organismos eucariotas. De ahí la importancia de su análisis tanto a nivel molecular como citogenético, ya que sus posibles variantes suelen ser selectivamente neutras.

Desde el punto de vista citogenético, el estudio de los NORs se lleva a cabo mediante técnicas de tratamiento y tinción específicas que permiten:

- Distinguir las de otras regiones cromosómicas por su naturaleza y características.

- Considerarlas como un criterio adicional a fin de establecer grados de divergencia filogenética.

- Corroborar algunos tipos de reordenación cromosómica.

- Utilizar a los cromosomas portado-

res como marcadores específicos.

Todo ello constituye una información genética fundamental, a la hora de establecer las pautas de manipulación intra o interespecífica para conseguir una mejora adaptativa, reproductiva y productiva de la familia.

Para obtener toda esta información, se analizan las características más significativas, como: el número de NORs en el cariotipo, su localización en la estructura de los cromosomas portadores, y su amplitud dentro de cada cromosoma.

== MATERIAL Y METODOS ==

Se utilizaron 22 individuos de *Liza aurata*, 28 de *L. ramada* y 25 de *Chelon labrosus*, capturados en la costa suroccidental española, para la obtención de preparaciones cromosómicas se utilizó el método de Alvarez *et al.* (1980), con ligeras modificaciones.

Para la detección de los NORs, se aplicó una técnica de tinción consistente en el tratamiento de preparaciones cromosómicas con una solución de nitrato de plata al 50%, a unos 60°C durante unos minutos. Esta técnica fundamental, descrita por Rufas *et al.* (1982), fue modificada de la siguiente forma:

I.- La solución de nitrato de plata (manteniendo la concentración del 50%) se prepara con agua desionizada, ajustada con ácido fórmico a pH 3,1-3,9.

II.- La incubación de las preparaciones en estufa se lleva a cabo a 65°C, en ambiente húmedo hasta la saturación, durante un tiempo que puede oscilar entre 4 y 15 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Factores que influyen en la resolución de la técnica. El ácido fórmico impide la precipitación de plata en la propia solución, lo cual es frecuente cuando esta se ha expuesto a la luz. Su utilización para conseguir el mencionado rango de pH, se ha encontrado óptima a fin de evitar la aparición de precipitados indeseables en las preparaciones. Un pH=3,9 resulta más conveniente para intensificar la tinción en preparaciones sometidas previamente a tratamiento.

La variación en el tiempo de tratamiento dependió principalmente de la concentración de células en cada preparación, y se establecía al observarse el color amarillo parduzco de una correcta impregnación argéntica. A una concentración más alta de las células, la intensidad del color de la preparación es mayor sin representar por ello un grado superior de tinción de las NORs.

La humedad es también un factor importante ya que evita la desecación y la consiguiente aparición de precipitado del nitrato de plata en las preparaciones.

Por último, 48 horas de antigüedad o "envejecimiento" de las preparaciones son necesarias, antes del tratamiento, en orden a evitar posibles efectos negativos del fijador aplicado a los cromosomas.

Otras técnicas para la detección de NORs, como el bandeo con acridina naranja, son menos consistentes (Verma, 1988). La hibridación "*in situ*" con sondas marcadas de ARNr o ADNr, es por el contrario más fidedigna y resolutive; y, si bien revela todas las NORs existentes, resulta más compleja y bastante más costosa. Por todo ello, la

tinción con sales de plata ha sido y sigue siendo una técnica fundamental en citogenética, y su optimización específica imprescindibles para la consecución de imágenes claras y definitivas de los NORs.

Resolución de la técnica en la detección de los NORs de mugilidos. En las tres especies estudiadas (**figura 1**) la distribución de los NORs fué muy conservativa pues el patrón encontrado fue idéntico y formado por un solo par de cromosomas portadores (par 24), el único con dos brazos que posee en complemento cromosómico (Delgado *et al.*). Los NORs se encontraban en posición terminal en los brazos cortos de los cromosomas portadores (**figura 2**).

Complementariamente, la técnica, permitió teñir los nucleolos en las células interfásicas, lo que es de utilidad para el estudio de las correspondencias entre el número de NORs en las células metafásicas y el número de nucleolos en las interfásicas.

Así mismo, se puso de manifiesto una cierta variación en el tamaño de los NORs, sugiriendo un diverso grado en la expresión de las regiones NORs de diferentes cromosomas (Delgado *et al.*).

Como conclusión final podemos apuntar que la optimización de esta técnica en la familia *Mugilidae* con toda certeza, posibilitará la obtención de importantes datos citogenéticos y citoevolutivos que podrán ser utilizados, tanto en la definición de las distintas especies y su origen, como en la manipulación de las mismas con fines productivos.



Figura 1. Metafase somática de *L. aurata*, mostrando la disposición de los NORs en los cromosomas del par 24. (Somatic metaphase of *L. aurata*, showing the NORs disposition on the chromosomes of the pair 24).

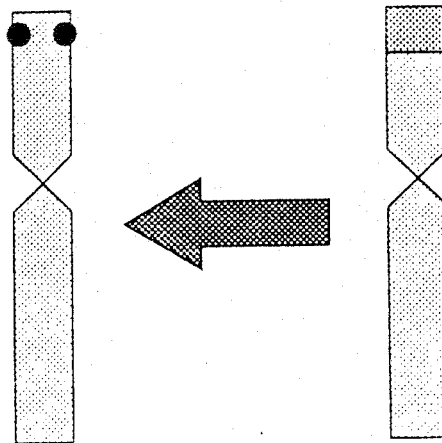


Figura 2. Descripción esquemática de la situación de los NORs en los cromosomas portadores. (Schematic description of the NORs localization on the carrier chromosomes).

BIBLIOGRAFIA

Alvarez, M.C., J. Cano y G. Thode. 1980. DNA content and chromosome complement of *Chromis chromis* (Pomacentridae, Perciformes). *Caryologia*, 33:267-278.

Delgado, J.V., J. Lobillo, G. Thode, A. Alonso, M.E. Camacho y A. Roderó. Conservative nature of the nucleolus organizer regions in three species of mediterranean mugilids. *No publicado.*

Iversen, E.S. 1968. Farming of the edge of the sea. *Fishing news (Books)*. Ltd. W. by Fleet. 310pp.

Kirpichnicov, U.S. 1981. Genetic bases of fish selection. Springer-verlag. Berlin. 410pp.

Kurian, C.V. 1975. Mullet and mullet fisheries of India. *Aquaculture*. 5:114.

Oren, O.H. 1975. Opening adress IBM/PM International Symposium on the Grey Mullet and Their Culture. *Aquaculture*. 5:3-8.

Rufas, J.S., G. Giménez-Martín y P. Esponda. Presence of a chromatid core in mitotic and meiotic chromosomes of grasshoppers. *Cell. Biol. Int. Rep.* 6:261-267.

Verma, R.S. 1988. Heterochromatin. Molecular and structural aspects. Cambridge Univ. Press. Cambridge, N.Y., Melbourne.

Recibido: 30-7-91. Aceptado: 12-9-91.