

LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DE GENES RIBOSOMALES ACTIVOS EN *PHYLLOMEDUSA HYPOCHONDRIALIS* Y *P. SAUVAGII* (ANURA: HYLIDAE)

MARIANA MORAND¹ Y ALEJANDRA HERNANDO²

1. Becaria de Iniciación de la SGCYT de la UNNE.

2. Cátedra de Zoología II (Vertebrados). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la UNNE. 9 de Julio 1449, (3400) Corrientes.

SUMMARY: The chromosomes of *Phyllomedusa sauvagii* and *P. hypochondrialis* were studied. Metaphases were obtained from bone marrow and intestinal epithelial cells and the activity of nucleolar organizer regions (NORs) were detected using silver banding techniques. Differences in number and NOR location between the species and heteromorphism in *P. hypochondrialis* are described.

Introducción

El número y la posición de genes ribosomales activos pueden detectarse en cromosomas metafásicos por medio de un tratamiento con nitrato de plata (Goodpasture y Bloom, 1975), muy utilizado en estudios citogenéticos de vertebrados.

En el caso de los anuros, unas 200 de las aproximadamente 3500 especies actuales fueron examinadas con tinción argéntica o con técnicas de hibridación *in situ* para identificar las regiones organizadoras del nucleolo (NOR) (King, 1990). En este sentido, King (1980) analizó los cromosomas de los anfibios australianos *Cyclorana* y *Litoria*; Schmid (1982) examinó 260 individuos de 23 géneros diferentes y estableció heteromorfismo en el tamaño de los NOR en el 67 % de los especímenes; Mahoney y Robinson (1986) determinaron número y posición de citrones ribosomales en 82 especies de Myobatrachidae, Anderson (1991) en 23 especies de *Hyla* holárticas y Baldissera Jr. *et al.* (1993) en 4 sudamericanas. Estudios similares se llevaron a cabo en algunos géneros

neotropicales como *Leptodactylus* (Barale *col et al.* 1978), *Odontophrynus* (Ruiz *et al.*, 1981; Schmid *et al.* 1985; Almeida *et al.* 1986), *Ceratophrys* (Schmid *et al.*, 1985; Soares-Scott *et al.*, 1988), *Pleurodema* (Veloso e Iturra, 1987); *Bufo* (Kasahara *et al.* 1996).

Con respecto al género *Phyllomedusa*, actualmente se reconocen 28 especies (Duellman, 1993) distribuidas en América Central y América del Sur. De acuerdo a las revisiones de King (1990) y Kuramoto (1990) la información cromosómica está limitada fundamentalmente a los números diploides de once taxa que mostraron $2n = 26$. Además, se ha descrito *P. tetraploidea* con $4n = 52$ (Pombal y Haddad, 1992). En lo referente a análisis con coloración diferencial, Batistic (1991) aplicó bandeado C y tinción argéntica en este último taxon y en otras tres especies diploides del género, proponiendo tres hipótesis sobre el origen de la poliploidía en *Phyllomedusa* basadas en la posición de los organizadores nucleolares del material analizado.

El propósito de este estudio fue identificar los genes ribosomales activos en *Phyllomedusa sauvagii* y *P. hypochondrialis* apli-

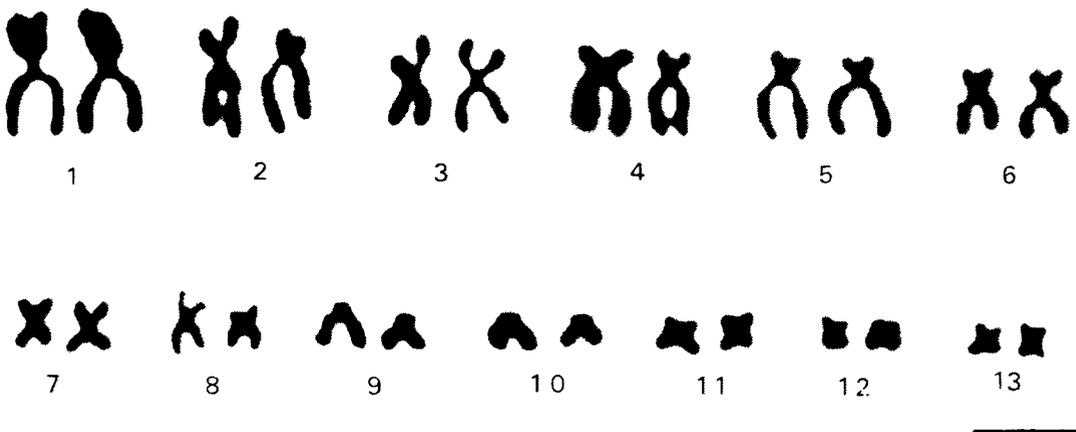


Fig. 1: Cariotipo de *Phyllomedusa hypochondrialis* ($2n = 26$), hembra. Barra representa 10 μ m en todas las figuras.

cando la técnica Ag-NOR, con el fin de aportar nuevos caracteres citogenéticos para el género. Utilizando tinción convencional, los cariotipos de estas especies ya fueron descritos por Barrio (1976), pero los datos sobre NOR se establecen por primera vez.

Materiales y métodos

Se analizaron 3 ejemplares de *P. sauvagii* y 6 de *P. hypochondrialis* (Apéndice I). El material se encuentra depositado en la Colección Herpetológica de la Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes (UNNEC), Argentina.

Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con colchicina 0.1 % (0.1 ml./10 gr. de peso corporal) dos horas antes de ser sacrificados. Las preparaciones cromosómicas se obtuvieron por medio de las técnicas habituales de aplastado intestinal y suspensión celular de médula ósea. Los tejidos fueron tratados con una solución hipotónica de Cl K 0.075 M durante 15 minutos y fijados con metanol: ácido acético (3:1). La coloración convencional se realizó con Giemsa pH 6.8. Las regiones organizadoras del nucleolo se marcaron mediante la técnica de Howell y Black (1980).

Resultados

Coloración convencional. En *Phyllomedusa hypochondrialis* y *P. sauvagii* se determinó un número diploide $2n = 26$ cromosomas. En ambas especies, los pares 1, 7, 11, y 13 son metacéntricos, los pares 9 y 10 subtelocéntricos y los restantes poseen morfología submetacéntrica (Figs. 1 y 2).

Coloración con nitrato de plata. En un total de 60 metafases intestinales de *Phyllomedusa hypochondrialis* fue posible analizar número y posición del NOR. Se contaron un máximo de cuatro organizadores nucleolares en el 31 % de las células analizadas, los cuales estuvieron localizados en posición subterminal en uno de los homólogos de los pares 7p, 8q, 11q y 13q. Se observó, además, duplicación en tandem del NOR en el par 8 (Fig. 3 a y b). Con mayor frecuencia (53 %), las metafases mostraron 3 NOR activos (7p, 8q y 11q) (Fig. 4) y sólo un 17 % dos organizadores nucleolares (7p, 8q). Estas variaciones fueron observadas en todos los individuos examinados.

En *Phyllomedusa sauvagii* se identificó un par de cistrones ribosomales localizados en el brazo largo del par 9 (Fig. 5).

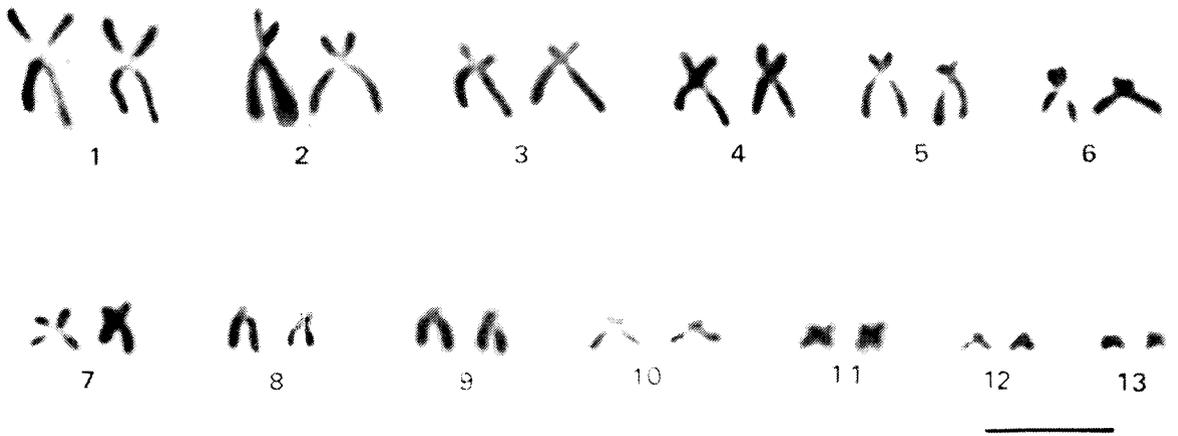


Fig. 2: Cariotipo de *Phyllomedusa sauvagii* ($2n = 26$), hembra.

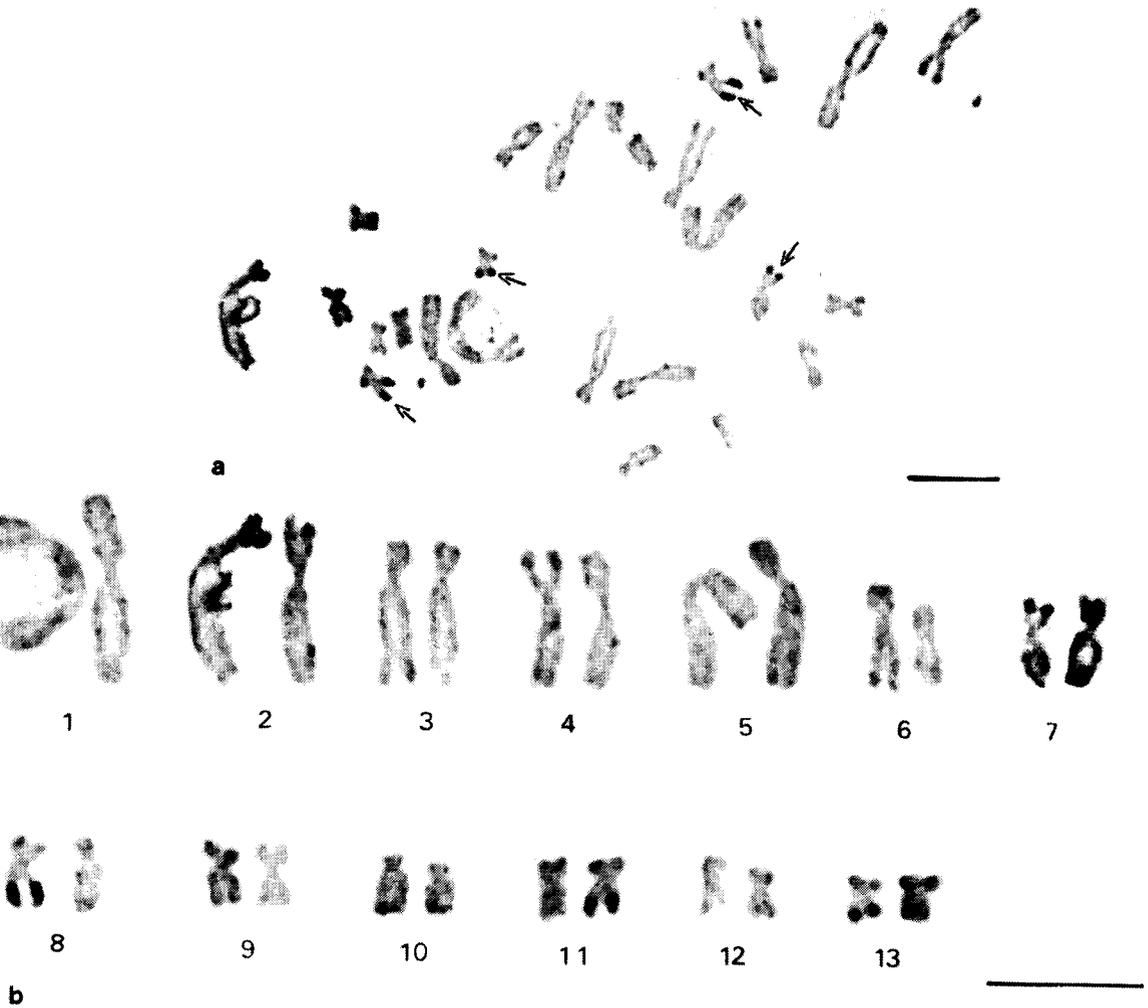


Fig. 3: Metafase con cuatro organizadores nucleolares de *Phyllomedusa hypochondriatis*. Los cromosomas de la metafase a) fueron ordenados en b).

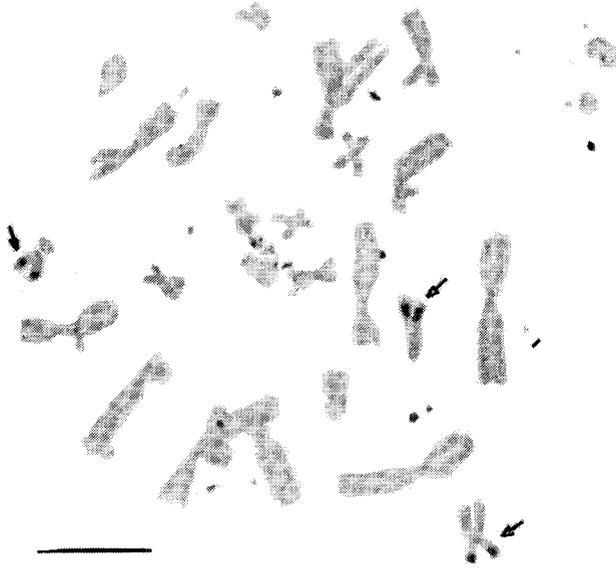


Fig. 4: Metafase de *Phyllomedusa hypochondrialis* con tres NOR (flechas).

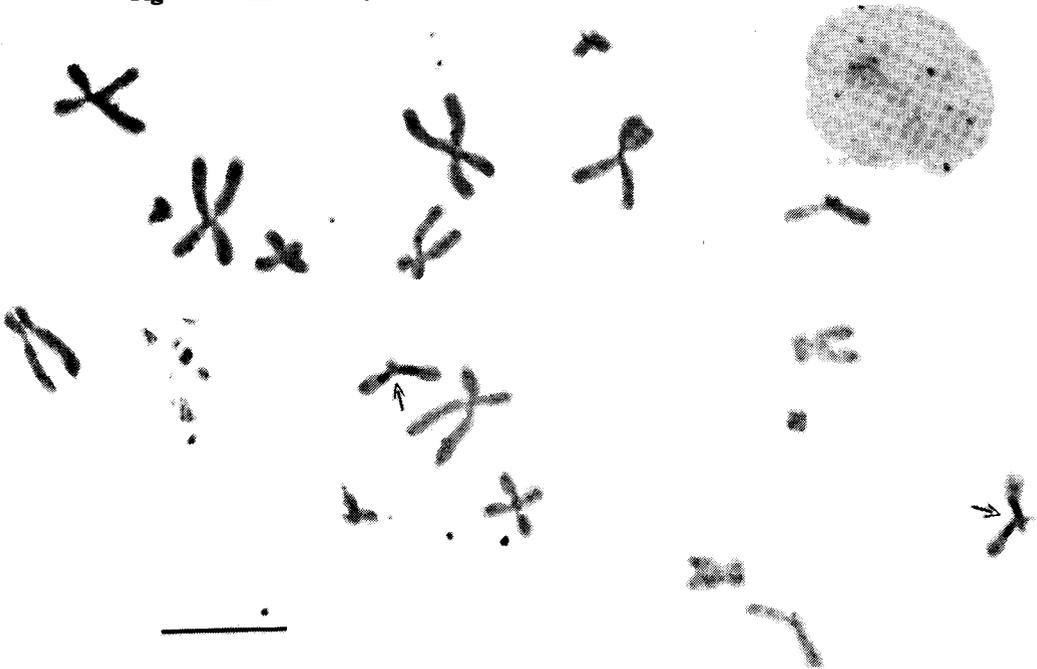


Fig. 5: Organizadores nucleolares en metafase intestinal de *Phyllomedusa sauvagii*, hembra.

Discusión

Los cariotipos de *P. sauvagii* y *P. hypochondrialis* mostraron el número cromosómico ($2n = 26$) establecido como típico para el género y para la subfamilia Phyllomedusinae (Hylidae) (King, op. cit.; Kuramoto, op. cit.).

Barrio (1976), utilizando material colectado en Frías (Santiago del Estero) y Parque

Nacional El Rey (Salta), describió constricciones secundarias (C S) en los pares 6 y 9 del cariotipo de *P. sauvagii*, las cuales no fueron evidentes en las preparaciones examinadas en este trabajo. Sin embargo, el par 9 fue plata positivo en el lugar señalado por Barrio como sitio de la CS.

Las tinciones con plata aplicadas a cariotipos de *Phyllomedusa* revelan diferencias in-

terespecíficas en número y posición del NOR. Batistic (1991) identificó genes ribosomales en los pares 1p y 9q de *P. burmeisteri*, *P. distincta* y *P. iheringii* ($2n = 26$), y en los pares 1p y 8q de la especie *P. tetraploidea* ($4n = 52$). En este trabajo, se observó que *P. sauvagii* comparte con las especies diploides la posición del NOR 9q y *P. hypochondrialis* la 8q con el taxón poliploide. Estas dos últimas especies no presentaron organizadores nucleolares en el par cromosómico 1. *P. sauvagii* mostró un único par de NOR, situación comúnmente descrita entre los anuros (Schmid *et al.* 1990), pero en *P. hypochondrialis* se contaron 2, 3 o 4 NOR, variación que puede indicar diferente actividad de los organizadores nucleolares en el período de interfase. Además, en todos los individuos de esta última especie fue notable el heteromorfismo en la localización de los NOR que se ubicaron siempre en uno de los homólogos de cuatro pares cromosómicos (7, 8, 11 y 13). Casos de completa pérdida de cistrones ribosomales por delección espontánea en uno de los homólogos fueron observados en individuos de *Bombina variegata*, *Xenopus laevis*, *Bufo fowleri* (Schmid, 1982) y *Bufo paracnemis* (Kasahara *et al.* 1996). Esta situación en *P. hypochondrialis* puede ser verificada usando fluorocromos como mitramicina, la cual marca los organizadores nucleolares independientes de su actividad (Schmid y Guttenbach, 1988).

Schmid *et al.* (op.cit.) argumentaron que en las especies de anuros filogenéticamente relacionadas el NOR se localiza en la misma región cromosómica, y las excepciones indican reordenamientos que han involucrado a los cistrones ribosomales. Estos reordenamientos pudieron haber ocurrido en *Phyllomedusa*, los cuales se confirmarían utilizando otras técnicas de bandeado.

Una característica descrita con frecuencia en los cariotipos de anuros es el heteromorfismo para el tamaño de los NOR, debido a duplicaciones o triplicaciones en tandem del ADN ribosomal que afectan a uno de los homólogos (Schmid, 1982). En *P.*

hypochondrialis fue evidente una duplicación en el cromosoma 8.

Las diferencias cromosómicas descritas hasta el momento en *Phyllomedusa*, la existencia de una especie poliploide dentro del género y el hallazgo de híbridos naturales entre *P. distincta* y *P. tetraploidea* (Haddad *et al.*, 1994) muestran a este taxon como un grupo muy interesante para estudios citotaxonómicos y de evolución cromosómica que precisa un análisis minucioso aplicando coloraciones diferenciales.

Apéndice I Material analizado

Phyllomedusa hypochondrialis UNNEC-04839 (♂), UNNEC-05181 (♀), Corrientes, Capital.

UNNEC-04838 (♂), UNNEC-04879 (♀), UNNEC-04900 (♀), UNNEC-05146 (♂), Resistencia, Chaco.

Phyllomedusa sauvagii UNNEC-04598 (♀), UNNEC-04599 (♀), UNNEC-04600 (♂) TacoPozo (Chaco)

Agradecimiento

Al Sr. Pedro Cacivio, por la recolección del material de *P. hypochondrialis* de la localidad de Resistencia (Chaco).

Literatura citada

- ALMEIDA, T.; I. RUIZ & W. BEÇAK. 1986. Ribosomal gene activity detected by silver staining two diploid populations of *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Anura) from southern Brasil. *Rev. Brasil. Genet.* 9 (3): 433-437.
- ANDERSON, K. 1991. Chromosome evolution in Holartic *Hyla* treefrogs: 299-331. *En*: GREEN, D. M. AND SESSIONS, S. K. (eds), *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, Inc. San Diego USA. 456 pp.
- BALDISSERA JR. J.; P. LOPEZ DE OLIVEIRA & S. KASAHARA. 1993. Cytogenetics

- of four brazilian *Hyla* species (Amphibia - Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. *Rev. Brasil. Genet.*, 16 (2): 335 - 345.
- BARALE, G.; M. ORTIZ & J. LISANTI. 1978. Cariotipo y organizador nucleolar de *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae). *Rev. UNRC*, 8 (1): 83- 88.
- BARRIOS, A. 1976. Estudio cariotipico y análisis audioespectrográfico de los cantos de las especies de *Phyllomedusa* (Anura-Hylidae) que habitan en la Argentina. *Physis*, 35: 65 - 74.
- BATISTIC, R. 1991. Origem da poliploidia em *Phyllomedusa* (Amphibia - Anura). *Rev. Bras. Genet.* 15 (Suppl. 2): 14
- DUELLMAN, W. 1993. Amphibian species of the world: additions y corrections. The University of Kansas. *Museum of Natural History. Special Publication* N° 21.
- GOODPASTURE, C. & S. BLOOM. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosome using silver staining. *Chromosoma*, 53: 37 - 50.
- HADDAD, C.; J. POMBAL & R. BATISTIC. 1994. Natural hybridization between diploid and tetraploid species of leaf-frogs, genus *Phyllomedusa* (Amphibia). *J. Herpetol.*, 28 (4): 425 - 430.
- HOWELL, W. & D. BLACK. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. *Experientia*, 36: 1014 - 1015.
- KASAHARA, S.; A. P. ZAMPIERI SILVA & C. F. B. HADDAD. 1996. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia - Bufonidae). *Brazil. J. Genetics*, 19 (2): 237 - 242.
- KING, M. 1980. C-banding studies on Australia Hylid frogs: Secondary constriction structure and the concept euchromatin transformation. *Chromosoma*, 80:191-217.
- KING, M. 1990. Animal Cytogenetics. Vol. 4: Chordata 2. Amphibia. JOHN, B. and C. GWENT, (eds.). *Gebruder Borntraeger, Berlin*. 241 pp
- KURAMOTO, M. 1990. A list of chromosome numbers of Anuran Amphibians. *Bull. Fukuoka Univ. Educ.* PtIII, 39: 83- 127.
- MAHONEY, M. & E. ROBINSON. 1986. Nucleolar organizer region (NOR) location in karyotypes of Australian ground frogs (Family Myobatrachidae). *Genetica*, 68: 119 - 127.
- POMBAL, J. & C. HADDAD. 1992. Especies de *Phyllomedusa* do grupo *burmeisteri* do Brasil oriental, com descrição de uma espécie nova (Amphibia, Hylidae). *Rev. Brasil Biol.*, 52 (2): 217 - 229.
- RUIZ, I.; M. SOMA & W. BEÇAK. 1981. Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploid species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). *Cytogenet. Cell Genet.*, 29: 84 - 98.
- SCHMID, M. 1982. Chromosome banding in Amphibia III. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma*, 87: 327- 344
- SCHMID, M.; T. HAAF & W. SCHEMPP. 1985. Chromosome banding in Amphibia IX. The polyploid karyotypes of *Odontophrynus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura, Leptodactylidae). *Chromosoma*, 91: 172- 182
- SCHMID, M. & M. GUTTENBACH. 1988. Evolutionary diversity of reverse fluorescent chromosome bands in vertebrate. *Chromosoma* 97: 101 - 114.
- SCHMID, M.; C. STEINLEIN, I. NANDA, & J. EPPLIN. 1990. Chromosome banding in Amphibia. 21 - 54. E. Olmo (de.) *En Cytogenetics of Amphibians and Reptiles. Advances in Life Science. Birkhauser Verlag, Basel*.
- SOARES-SCOTT, M.; I. TRAJTENGERTZ; M. SOMA & M. BEÇAK. 1988. C and Ag-As bands of the octaploid untanha frog *Ceratophrys dorsata* (*C. aurita*) (8n = 104, Amphibia, Anura). *Rev. Brasil Genet.*, 2 (3): 625 - 631.
- VELOSO, A. & P. ITURRA. 1987. Chromosome location of active ribosomal genes in *Plurodema thaul* (Amphibia- Leptodactylidae) C-banding and polymorphism of the nucleolar organizer region. *Caryologia*, 40 (4): 359- 365.