

FIJACION CARNOY, UNA TECNICA PARA OBTENCION DE CROMOSOMAS EN HYMENOPTERA

Jacqueline Carvajal Murcia

Guiomar Nates-Parra

Consuelo Burbano Montenegro

Dpto. Biología, Universidad Nacional, A.A. 14490 Bogotá-Colombia.

RESUMEN

Con el ánimo de impulsar estudios en citogenética de Hymenoptera en Colombia, se han desarrollado técnicas estandarizadas en el laboratorio de la Universidad Nacional con la cual se obtuvieron resultados satisfactorios en *Apis mellifera*. La metodología es una modificación de la técnica ideada por Imai (1966), particularmente a nivel de las fijaciones.

SUMMARY

In order to promote studies on cytogenetics of Hymenoptera in Colombia, standard techniques have been developed at the National University of the Colombia with which satisfactory results were obtained on *Apis mellifera* L. The work describes a modification of a technique developed by Imai (1966), particularly in fixation .

PALABRAS CLAVE: Citogenética, cromosomas, *Apis mellifera*, himenópteros.

INTRODUCCION

En el mundo se han realizado numerosos trabajos sobre citogenética de himenópteros (Imai et al., 1977; Hoshihira & Imai, 1993; Pompolo et al., 1989; Kerr, 1972) desarrollados empleando técnicas sencillas tales como las de "squash" (Sanderson & Hall, 1948) y las de secado al aire ideadas por Imai y colaboradores desde 1966. En Colombia no se conoce la existencia de este tipo de trabajos. Con el presente trabajo se quiere motivar a la realización de investigaciones encaminadas a conocer el número y la morfología de los cromosomas de las diversas especies de himenópteros del país; información que resulta valiosa por cuanto complementa los estudios morfológicos y da bases más sólidas a los análisis filogenéticos.

Con la aplicación de las diversas técnicas publicadas, los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones ambientales no han sido muy satisfactorios (Carvajal, 1995) de tal manera que fue necesario establecer inicialmente una técnica más apropiada y de fácil realización. Para el establecimiento de ésta técnica se utilizó como material biológico *Apis mellifera*, especie que presenta dos ventajas principales: la existencia de gran cantidad de trabajos sobre biología, comportamiento y genética, y las numerosas poblaciones en diferentes partes del país, distribuidas en casi todos los pisos térmicos tanto en condiciones silvestres como en apiarios, lo cual favorece la adquisición de las muestras y la evaluación de la técnica bajo diferentes condiciones ambientales.

MATERIALES

1. Solución stock de colchicina 1% (1g de colchicina/100 ml de agua destilada).
2. Solución hipotónica (1% de citrato de sodio: 1g de citrato de sodio dihidratado /100 ml de agua destilada).
3. Solución hipotónica colchicina (0.01% de colchicina: 0.1 ml de colchicina solución stock/9.9 ml de citrato de sodio frescamente preparados).
4. Solución disgregadora (1.8 ml de ácido láctico, 1.2 ml de agua destilada, 1 ml de ácido acético glacial).
5. Fijador I 3:1 de etanol: ácido acético.
6. Fijador II 1:1 de ácido acético: etanol.

Las soluciones 3 a 6 deben prepararse antes de cada montaje.

Para la obtención de cromosomas de *Apis mellifera* se emplea ganglio cerebral de prepupas de 7 días de vida, etapa en la que los segmentos posteriores están transparentes. También se han observado metafases en órganos tales como intestino, tubulos de malpighi, ovario y testículos, pero con índices mitóticos bajos (Carvajal, 1995).

Procedimiento

- 1- Pretratamiento con colchicina-hipotónica. Los órganos deben ser disectados en una solución hipotónica-colchicina, empleando agujas

finas y removiendo en lo posible la grasa del cuerpo, tráqueas y membranas epiteliales. Luego el órgano se transfiere con las mismas agujas o con una pipeta Pasteur, a una solución hipotónica-colchicina en una lámina cóncava, donde se mantiene por 20 minutos a temperatura ambiente para el caso específico de *Apis mellifera*. Para otros himenópteros, este tiempo puede variar con la especie.

2- Preparación de las láminas: Se transfiere el órgano a una lámina limpia en donde se aplica una primera gota de solución disgregadora, manteniendo la lámina inclinada sobre papel secante; para retirar la solución hipotónica-colchicina. Con la aplicación de una segunda gota de solución disgregadora, se procede a disociar el tejido con un par de agujas finas, procurando en lo posible dispersarlo por toda la lámina.

3- Terminado el proceso de extender el tejido se aplica a la preparación una gota del fijador I, el cual desplaza a la solución disgregadora hacia los bordes de la lámina de donde se retira con papel secante. A continuación se adiciona una segunda gota del fijador I manteniendo la lámina inclinada sobre papel absorbente. Este proceso de fijación se repite tres veces y finaliza con la aplicación de una gota del fijador II.

Por último, la etapa de tinción se hace inundando la lámina con una solución de Giemsa al 2% en buffer fosfato pH 6.8 por diez minutos. Se lava con agua corriente, se deja secar y queda listo para observar al microscopio. Se recomienda que la tinción se haga después de 24 horas de preparada la lámina o secar por flameo.

Preservación del material: Se hace la disección y pretratamiento con la solución hipotónica-colchicina y luego el órgano se transfiere a una solución carnoy (3:1 metanol; ácido acético). Se almacena a -10 °C, hasta que se prepare en la lámina como se describió anteriormente.

Este procedimiento permite aprovechar el material que no puede prepararse inmediatamente se colecta, bien por las condiciones locativas o por la escasez de tiempo. Además evita posibles cambios en el número normal de los cromosomas que usualmente ocurren cuando se altera la temperatura del nido (Kerr, 1972; Tarelho, 1981). Sin embargo, las metafases así obtenidas pueden presentar en algunos casos residuos citoesqueléticos ya que la fijación endurece los tejidos.

Además, no se recomienda tratar las preparaciones para obtención de bandas.

DISCUSION

La técnica descrita comprende tres etapas básicas, cada una de ellas susceptible a modificaciones de acuerdo a la especie estudiada. La primera etapa consiste en tratar el órgano a estudiar con una solución de colchicina, la cual inhibe la polimerización del huso mitótico (Saéz & Cardoso, 1978) de tal manera que se obtiene una mejor calidad de las preparaciones y aumenta el número de metafases observadas. Sin embargo debe considerarse que tiempos largos pueden dar lugar a que los cromosomas se condensan observándose estos redondeados, y con tiempos cortos, se encuentran pocas metafases, por lo cual se hace necesario estandarizar el tiempo adecuado para la especie de interés. Además, la colchicina se halla diluida en una solución hipotónica que provoca el aumento del volumen celular, de tal manera que los cromosomas detenidos en metafase se pueden observar como unidades separadas, ganándose resolución de su morfología. En ocasiones, las metafases obtenidas están cerradas o rotas indicando que es necesario variar el tiempo de exposición, la concentración o emplear otra solución hipotónica tal como el cloruro de potasio al 4% (Hoshiba & Okada, 1986).

Extensión del material: La solución disgregadora contiene ácido láctico con el cual se facilita la disociación de las masas celulares. El ácido láctico fue inicialmente introducido en la técnica de Imai (1966) por Hoshiba et al. (1989) y modificada su concentración por Carvajal (1995), al adicionar una pequeña proporción de agua destilada, y evitando la rápida desecación de la lámina, obteniéndose mayor tiempo para disgregar el tejido.

Fijación: Lo que se busca con la esta etapa es matar a las células sin deshidratarlas, y eliminar a la vez residuos citoesqueléticos. Se diferencia de la técnica ideada por Imai (1966) en que en ella se emplean tres fijadores en los que cada uno es una combinación de ácido acético y etanol; las metafases así obtenidas presentan generalmente residuos citoesqueléticos, los cuales pueden eliminarse empleando otro fijador conocido comúnmente como Carnoy (ácido

acético: etanol 1:3) obteniéndose metafases más limpias y cromosomas con una mejor definición morfológica.

Con la técnica de fijación Carnoy así diseñada se ha logrado determinar el cariotipo (es decir, el número y la forma característica de los cromosomas) de *Apis mellifera* y otras especies de abejas. También se ha logrado observar una mayor diferenciación entre un cromosoma y otro, ya que estos presentan patrones de bandeo G espontáneo, el cual con procedimientos específicos puede ser mejorado (Cortés, 1984). La utilización de tales métodos no sólo permite detallar más a fondo la estructura de los cromosomas, sino que también proporciona información sobre posibles reordenamientos cromosómicos y su evolución, de tal manera que pueden ser considerados en los estudios de tipo filogenético (Cardoso et al., 1978).

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a COLCIENCIAS y a la Universidad Nacional de Colombia por su financiación, a la profesora Martha Bueno por su aporte al texto y al doctor Hidehiro Hoshiba por facilitarnos información.

LITERATURA CITADA

- Cardoso, H., R. Wettstein & N. Brum. 1978. Enfoque multidisciplinario aplicado al estudio de los mecanismos hereditarios de evolución. Pp. 13-19, en Serie de Biología (Programa regional científico y tecnológico de la OEA, eds.). Washington, D.C.
- Carvajal, J. 1995. Ensayo y selección de técnicas para el estudio citogenético en *Apis mellifera*. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Cortes, F. 1984. Bando de cromosomas. *Investigación y Ciencia*, 97: 20-29.

- Hoshiba, H & I. Okada. 1986. G-banding analyses of male chromosomes in *Apis cerana* and *Apis mellifera ligustica*, *Apidologie*, 17: 101-106.
- Hoshiba, H., M. Matsuura & H. Imai. 1989. Karyotype evolution in the social wasps (Hymenoptera: Vespidae), *Japan Journal Genet.*, 64: 209-222.
- Hoshiba, H & Imai. 1993. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on basis of C-banding pattern analyses. *Japan Journal Ent.*, 63:465-492.
- Imai, H. T. 1966. The chromosome observation techniques of ants and the chromosomes of Formicinae and Myrmicinae. *Acta Hymenopterologica*, 2: 119-131.
- Imai, H. T., R. H. Crozier & R. W. Taylor. 1977. Karyotype Evolution in Australian Ants. *Chromosoma, (Berl.)* 59: 341-393.
- Kerr, W. 1972. Effect of low temperatura on male meiosis in *Melipona marginata*. *Journal of Apicultural Research*, 11: 95-99.
- Pompolo, S., C. Takahashi & W. Kerr. 1989. Estudio citogenético del género *Melipona* (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera). Apimondia XXXII Congreso Internacional de Apicultura.
- Saez, F. & H. Cardoso. 1978. Citogenética básica y biología de los cromosomas (Secretaría General de la Organización de los Estados Unidos, eds.). Washington, D.C.: 3-117.
- Sanderson, A. R. & D. W. Hall. 1948. The cytology of the honey bee *Apis mellifera* L. *Nature*, 162: 34-35.
- Tarelho, Z. 1981. Effects of low and high temperatures on the spermatogenesis of *Apis mellifera* L. *Revista Brasileira de Genetica*, 4: 193-212.