

POLIMORFISMO CROMOSOMICO DE DOS POBLACIONES DE LA TRUCHA ARCOIRIS, *ONCORHYNCHUS MYKISS* (WALBAUM) DE LA ZONA CENTRAL DE CHILE

TWO POPULATIONS CHROMOSOME POLYMORPHISM OF RAINBOW TROUT, *ONCORHYNCHUS MYKISS* (WALBAUM) FROM CENTRAL CHILE

Alberto Veloso, Patricia Iturra*, Nelson Colihueque, Nelson Díaz y Francisco Estay.

RESUMEN

Determinaciones cariotípicas en adultos y embriones de *Oncorhynchus mykiss*, permitieron establecer diferencias en el polimorfismo cromosómico de una población de piscicultura y otra asilvestrada. Los números cromosómicos diploides oscilan entre $2n = 58$ a $2n = 61$ y $2n = 60$ a $2n = 63$ respectivamente, manteniéndose un $NF = 104$. La identificación de cromosomas mediante mediciones cromosómicas, bandeado C y AgAsNOR, permite establecer una correspondencia entre sexo cromosómico y sexo gonadal (sistema XX/XY), aparear cromosomas homólogos mediante el reconocimiento del patrón de distribución de la heterocromatina constitutiva y localizar los cistrones de DNAr activos en la constricción secundaria de un par metacéntrico de pequeño tamaño. En un 15% de los ejemplares se determinó polimorfismo intraindividual. Los resultados sugieren una participación de cromosomas metacéntricos grandes y cromosomas telocéntricos en reordenamientos de tipo robertsoniano para dar cuenta del polimorfismo. La extensión del polimorfismo sugiere un origen europeo para la población asilvestrada.

Palabras claves: Citogenética, cromosomas, especies introducidas.

ABSTRACT

There are differences in the chromosome polymorphism found in two populations of fish farm and introduced *Oncorhynchus mykiss*. Diploid numbers correspond to $2n = 58$ to $2n = 61$ and $2n = 60$ to $2n = 63$ respectively. Arm number (NF) in all individuals was 104. It was possible to identify chromosomes by chromosome measurements, C and AgAsNOR banding. There are correspondences between chromosomal and somatic sex (XX/XY system). The distributional pattern of constitutive heterochromatin makes easy to recognize certain homologs. Active DNAr cistrons are located in a small metacentric pair, in correspondence with a secondary constriction. Intraindividual polymorphism was found in 15% of the sampled individuals. The results suggest that the polymorphism is determined by robertsonian rearrangements between larger metacentric and telocentric chromosomes. The polymorphism range in the introduced rainbow trout suggest its European origin.

Key words: Cytogenetics, chromosome, exotic species.

INTRODUCCION

La introducción de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en Chile está documentada desde fines del siglo pasado. Las ovas embrionadas fueron importadas desde Europa y América del Norte. Esta especie ha colonizado con éxito diversos cuerpos de agua lóticos y lénticos. En su propagación en las diversas cuencas hidrográficas

en Chile Central, han tenido un papel decisivo las siembras de alevines y ovas embrionadas provenientes de pisciculturas locales (Campos, 1970).

La variación de los caracteres merísticos en estas poblaciones asilvestradas es similar con la encontrada en algunas poblaciones que se distribuyen en Alemania. A diferencia de las truchas europeas que pueden agruparse según el número de vértebras en dos grupos, este carácter en los

Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile.

* Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 70061, Santiago, Chile.

ejemplares de Chile presenta una distribución unimodal (Wetzlar, 1979), lo cual permite suponer una homogeneidad genética del material representado.

El notable incremento en Chile del cultivo de la trucha arcoiris con fines comerciales, se realiza en la actualidad sobre la base de ovas embrionadas importadas preferentemente desde Norteamérica. Si bien la composición genética de estas ovas cuenta con la información especificada por el productor extranjero, es necesario desarrollar a nivel local una capacidad técnica de certificación del material proporcionado.

El interés de establecer una línea de reproductores a nivel local utilizando ejemplares asilvestrados y de piscicultura, con características de crecimiento y desarrollo importantes para esta industria requiere conocer como etapa previa la composición genética de estas poblaciones. A partir de esta información, será posible iniciar experimentos de manipulación genética, orientados a la producción de estos salmonídeos.

En las poblaciones naturales y de piscicultura de Norteamérica y de Europa, está descrito un polimorfismo cromosómico intra e interindividual (Ohno *et al.*, 1965; Thorgaard, 1976; Hartley y Horne, 1982). Los números cromosómicos están en un rango entre $2n = 58$ y $2n = 64$, manteniendo un $NF = 104$. Las diferencias en los números cromosómicos corresponden a variación del número de cromosomas subtelo-céntricos representados. Los machos presentan cromosomas sexuales heteromórficos (XY). Ocasionalmente en algunas poblaciones e independiente del número diploide que tengan los individuos, se observan ejemplares trisómicos y otros de sexo revertido (Thorgaard, 1977, 1983).

La extensión del polimorfismo en poblaciones de truchas de la Costa Pacífica de Norteamérica, revela un patrón geográfico que indicaría las relaciones evolutivas entre estas poblaciones (Thorgaard, 1983).

En este trabajo se caracterizan y comparan cromosómicamente truchas arcoiris de una población asilvestrada del Estero Del Arrayán, tributario norte del Río Mapocho (Lat. $33^{\circ}18'S$, Long. $70^{\circ}27'W$) y de una población de la cepa Kamloops de la piscicultura Aguas Claras. La información obtenida se analiza en el contexto de la variación cromosómica reportada en poblaciones del hemisferio Norte.

MATERIALES Y METODOS

Para realizar las determinaciones cromosómicas fueron seleccionados animales adultos, 12 machos y 6 hembras del Estero Del Arrayán, y 4 machos, 12 hembras y 8 embriones de la piscicultura Aguas Claras. Los cromosomas se obtuvieron a partir de ejemplares inyectados con colchicina 0.2 mg/gr. peso del animal, durante 6 a 18 hrs., manteniendo los ejemplares en acuario refrigerado a $10^{\circ}C$. Las placas metafásicas se obtuvieron por aplastado de células de epitelio de las branquias y de la porción anterior del riñón. De la gónada de los machos se obtuvieron placas cromosómicas meióticas. Los embriones fueron incubados en colchicina 0.2% a $10^{\circ}C$ durante 2 horas, y luego disectados y sometidos a hipotonía en agua destilada por 30'. Las tinciones utilizadas fueron Giemsa pH 7.2, identificación de Heterocromatina Constitutiva (bandas C), según método de Sumner (1972), e identificación de la Región Organizadora del nucléolo mediante método AgAsNOR (Quack y Noel, 1977). El número diploide fue determinado contando en ampliaciones fotográficas un mínimo de 5 placas metafásicas por animal. Para determinar el número fundamental de brazos (NF) se adoptó la convención de no considerar los cromosomas subtelo-céntricos como bibrachiados. Los cromosomas metacéntricos y submetacéntricos fueron identificados determinándose el índice centromérico (Levan *et al.*, 1964).

RESULTADOS

El cariotipo de *O. mykiss* está formado por cromosomas metacéntricos, submetacéntricos, subtelo-céntricos y telocéntricos y se reconocen los pares cromosómicos característicos de *O. mykiss* reportados por otros autores (Hartley y Horne, 1982; Thorgaard, 1976).

En ambas poblaciones se estableció un polimorfismo del número cromosómico. El rango de la variación cromosómica oscila entre $2n = 58$ y $2n = 63$, manteniéndose un $NF = 104$. La diferencia en el número cromosómico está determinada por la variación en el número de cromosomas metacéntricos y telocéntricos. El cariotipo $2n = 58$ presenta 20 pares metacéntricos, un par subtelo-céntrico y 5 pares telocéntricos. Los metacéntricos disminuyen hasta 18 pares y los telo-

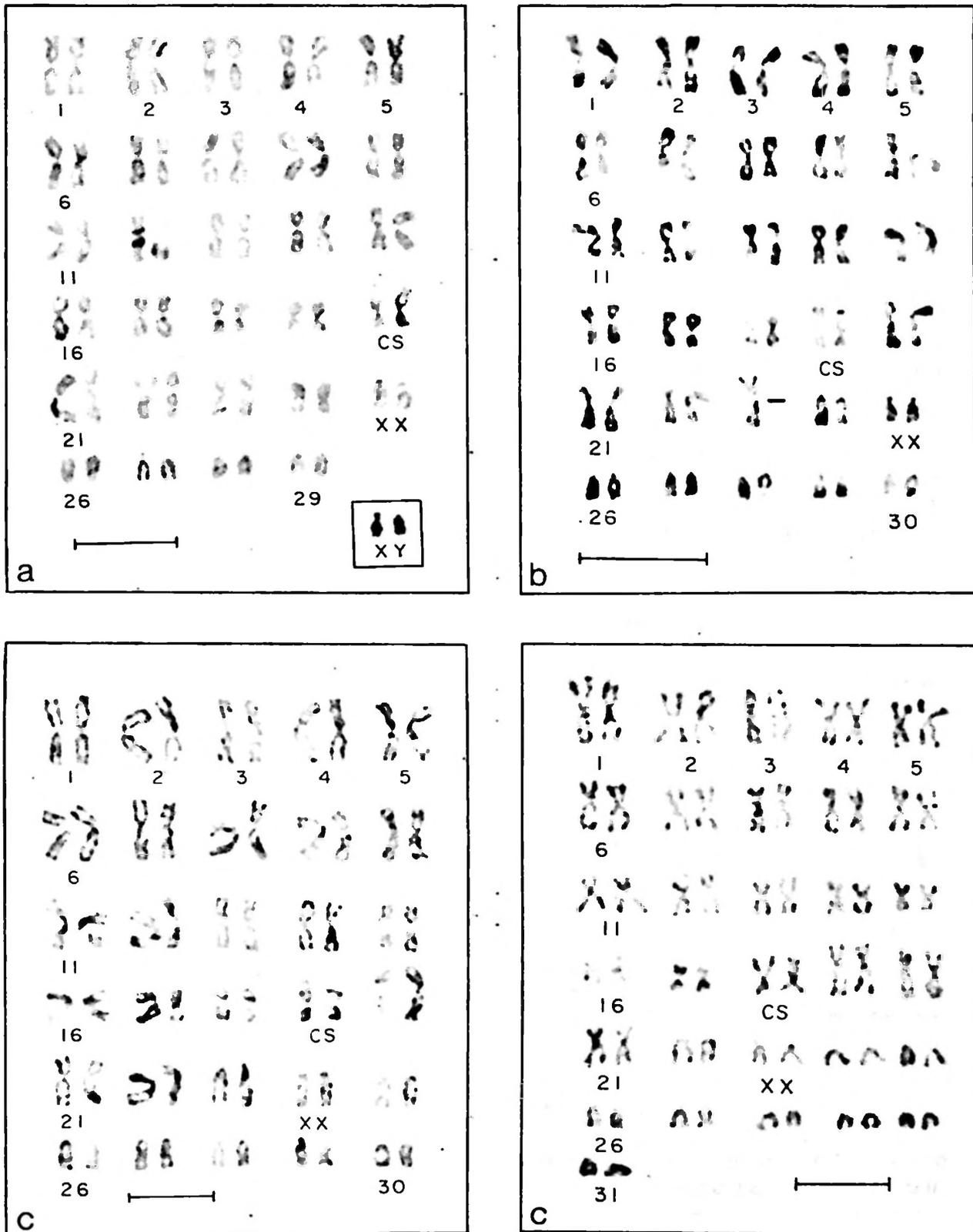


Figura 1. Cariotipos de *Oncorhynchus mykiss*. (a) Hembra $2n = 58$ Aguas Claras. En el recuadro el par sexual de un macho. (b) Hembra $2n = 59$ Aguas Claras. (c) Hembra $2n = 60$ Aguas Claras. (d) Hembra $2n = 62$ Arrayán. CS = CONTRICCION SECUNDARIA. La barra corresponde a 10 μ m.

céntricos aumentan hasta 9 pares en cariotipos $2n = 62$. En el cariotipo de *O. mykiss* fueron identificados por lo menos 3 pares de cromosomas submetacéntricos (Fig. 1).

En todos los ejemplares analizados se identificó un par de cromosomas sexuales. Los machos son el sexo heterogamético, presentando un par de cromosomas sexuales heteromórficos, constituido por un cromosoma submetacéntrico (X) y un telocéntrico (Y), lo que corresponde a un sistema de determinación del sexo XX/XY (Fig. 1^a). La determinación de cromosomas sexuales permitió establecer una estricta correspondencia entre sexo cromosómico y el gonadal, así como también reconocer el sexo cromosómico de los embriones utilizados, identificándose 6 machos y 2 hembras. Se reconoce un par de cromosomas metacéntricos pequeños como portador de una constricción secundaria próxima al telómero, la cual no es siempre evidente en ambos homólogos (Fig. 1^a). En las preparaciones obtenidas del testículo se observan en la diaquinesis figuras bivalentes y multivalentes como resultado del apareamiento meiótico (Fig. 2).

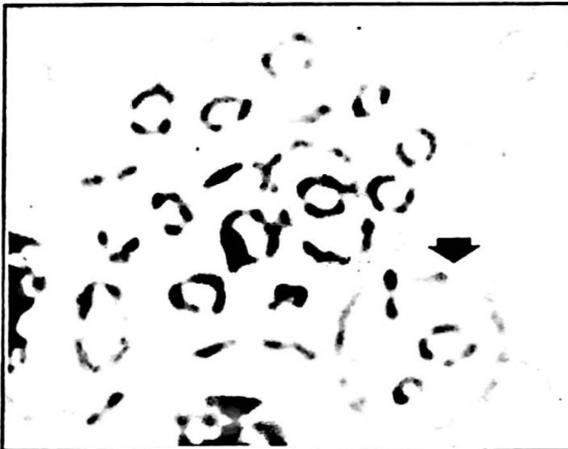


Figura 2. Diaquinesis de macho de *Oncorhynchus mykiss*. La flecha muestra un multivalente en anillo.

En la Figura 3 se muestran los números diploides representados en estas poblaciones. En la población del Estero del Arrayán el número modal es $2n = 62$ con un rango entre $2n = 60$ y $2n = 63$, en tanto que en los ejemplares de Aguas Claras es $2n = 58$, observándose un ejemplar con $2n = 61$.

El bandeo C en la mayor parte de estos cromosomas revela la heterocromatina constitutiva

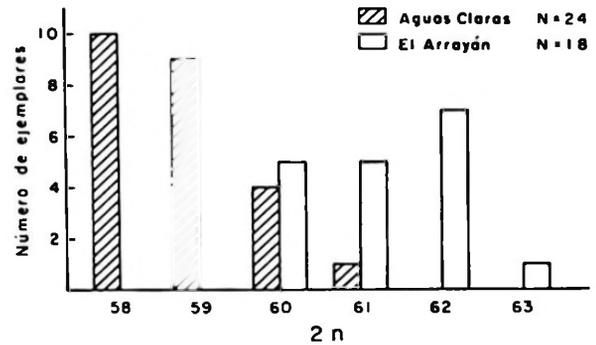


Figura 3. Histograma de números diploides ($2n$) en *Oncorhynchus mykiss* de Aguas Claras y Arrayán.

(HC) distribuida en la región pericentromérica y centromérica de los cromosomas bibraqueados. En los cromosomas telocéntricos las bandas C están localizadas en la zona centromérica o telomérica de determinados pares. El cromosoma X (st) presenta el brazo corto totalmente heterocromático, en tanto el cromosoma Y muestra escasa HC pericentromérica. El par portador de la constricción secundaria muestra un brazo completamente C^+ (Fig. 4).

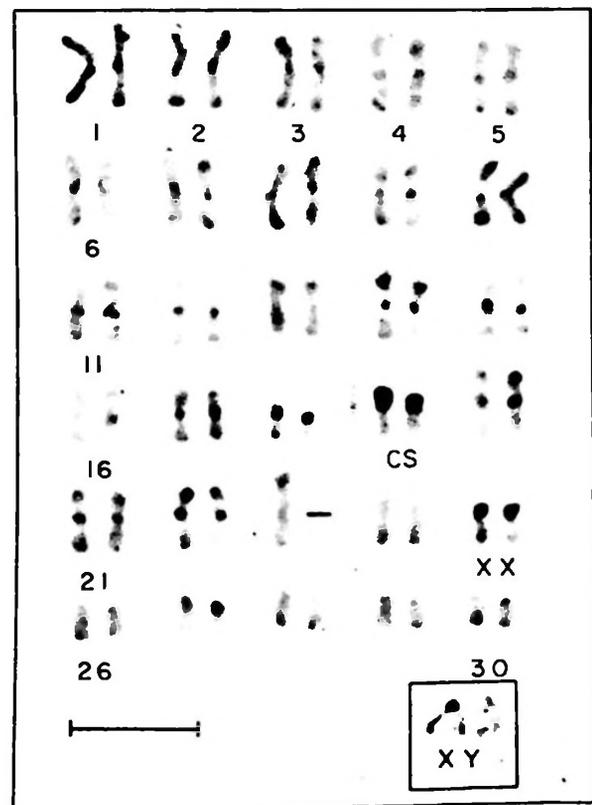


Figura 4. Cariotipo de hembra $2n = 59$ Aguas Claras con bandeo C. En el recuadro el par XY de un macho. CS = constricción secundaria. La barra corresponde a 10 μ m.

La tinción con AgAsNOR revela la correspondencia entre constricción secundaria y localización de los cistrones 18 y 28 S de DNAr activos (Fig. 5).

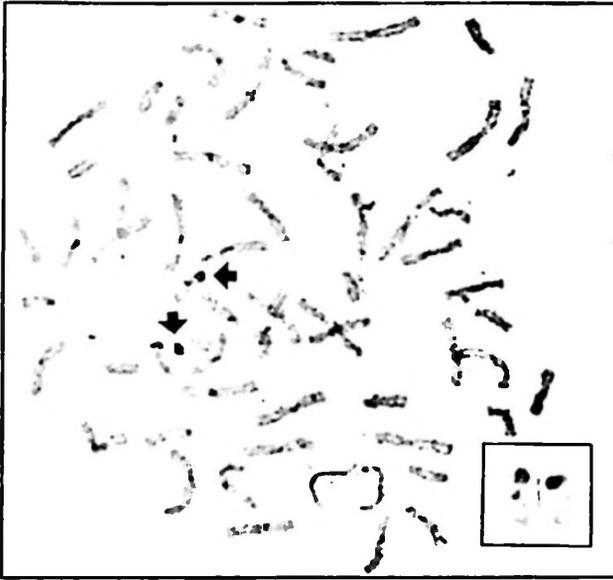


Figura 5. Placa metafásica de hembra de *Oncorhynchus mykiss* con AgAsNOR. Las flechas indican la localización de la Zona NOR. En el recuadro el par de cromosomas nucleololares.

DISCUSION

La morfología de los cromosomas representados en trucha arcoiris de piscicultura y asilvestrada es similar a la reportada por otros autores. El análisis de los cariotipos obtenidos muestra que todos los ejemplares analizados tienen un mismo NF 104.

En alrededor de un 15% de los ejemplares de ambos sexos se encontró variación intraindividual del número cromosómico, pero manteniendo un mismo NF 104. Esto correspondería al polimorfismo intraindividual descrito para trucha arcoiris por diversos autores. Thorgaard (1976, 1983), atribuye estas variaciones a posibles errores en el análisis de las placas metafásicas, ya que en algunas de ellas resulta difícil determinar si se trata de cromátidas que se están separando tempranamente en la metafase (Busack *et al.*, 1980), o bien si son cromosomas telocéntricos que se asocian en forma reiterada. En todo caso, esta posible variación cromosómica intraindividual no daría cuenta por sí sola del polimorfismo interindividual que se observa en el análisis comparativo.

La variación interindividual de los números cromosómicos es explicable en términos de reordenamientos robertsonianos del tipo fisión o fusión céntrica, que determinan la variación de la morfología pero con mantención del NF. La similitud en el tamaño y la morfología de los cromosomas dificulta el apareamiento de los homólogos y en algunos casos su ordenamiento en los cariotipos puede resultar arbitrario. El análisis de estos cariotipos mediante bandeado C, si bien ayuda a precisar el reconocimiento de estos homólogos, es aún insuficiente para poder establecer un cariotipo estándar en *O. mykiss*. No obstante estas limitaciones, independientemente del número diploide determinado, es posible reconocer inequívocamente 3 pares de cromosomas metacéntricos pequeños, uno de los cuales corresponde al par nucleololar. Además, es posible individualizar 3 pares de cromosomas submetacéntricos de tamaño mediano, un primer par de telocéntricos (según tamaño) y un par de subtelo-céntricos que corresponde al par sexual. El reconocimiento de estos cromosomas marcadores permite precisar que los cromosomas participantes en los reordenamientos que se traducen en variación del número cromosómico, serían los metacéntricos de mayor tamaño y los cromosomas telocéntricos, con excepción del primer par. A un mayor número diploide, corresponde un mayor número de cromosomas telocéntricos (Fig. 1). En esta variación del número cromosómico no participarían cromosomas subtelo-céntricos, como lo señala Thorgaard (1983), en poblaciones de Norteamérica. Otra diferencia con lo encontrado por este autor es la estabilidad del par sexual en todos los ejemplares, pudiéndose encontrar una correspondencia estricta entre sexo cromosómico y sexo gonadal.

La distribución de la heterocromatina constitutiva en el par sexual, permite reconocer al cromosoma Y por su menor cantidad de HC. Esta diferencia podría determinar restricciones a la recombinación durante el apareamiento meiótico, como ha sido sugerido en anfibios (Iturra y Velloso, 1989). A la variación del número cromosómico, se agregan otras fuentes de variación cariotípica. En la Fig. 1^a, el par número 27 es heteromórfico, lo cual puede ser el resultado de una inversión pericéntrica que afecta a uno de los homólogos.

Los resultados del bandeado AgAsNOR, permiten reconocer un par cromosómico portador de

los cistrones 18 y 28 S de DNA ribosomal en correspondencia a la localización de la constricción secundaria y, por lo tanto, próximos al telómero. Al combinar estos resultados con los del bandeó C, el brazo portador de la CS aparece totalmente heterocromático, los cistrones ribosomales estarían incorporados en esta zona heterocromática, lo cual otorga características muy particulares a esta región organizadora del nucléolo (Hartley y Horne, 1984). Este resultado es diferente a lo observado en especies de anfibios (Veloso, 1979; Iturra y Veloso, 1979) y también lo señalado por Thorgaard (1976) en otros ejemplares de trucha arcoiris, en los cuales la región portadora de estos cistrones estaría sólo flanqueada por HC.

El polimorfismo de número cromosómico en las poblaciones de truchas arcoiris de Chile Central es sólo parte de la variabilidad del número cromosómico determinada en diversas poblaciones del hemisferio Norte. El significado de esta variación restringida y la determinación de un número modal de $2n = 59$, es la esperada en ejemplares de Aguas Claras, dada la procedencia de la cepa Kamloops originaria de la Costa Pacífica de Norteamérica. Sin embargo, la extensión del polimorfismo en truchas del Estero Del Arrayán requiere una explicación más elaborada. Esta población asilvestrada muestra el número modal $2n = 62$, el cual está poco representado en poblaciones de distribución en USA y Canadá, pero ampliamente presente en trucha arcoiris de Europa. Con la evidencia disponible a la fecha, no es posible determinar la procedencia de los ejemplares actualmente en desarrollo en el Estero Del Arrayán, no obstante, resulta atractivo considerar la posibilidad que el número modal mejor representado está en correspondencia con un origen europeo de los ejemplares fundadores.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado parcialmente por los Proyectos 2032-87 FONDECYT y 2209 DTI, Uni-

versidad de Chile. Especial agradecimiento al Sr. Cristián García, de la Piscicultura Aguas Claras y al Sr. Héctor Muñoz por las fotografías.

LITERATURA CITADA

- BUSACK, C.A.; G.H. THORGAARD; M.P. BANNON; G. A. E. GALL. 1980. An electrophoretic, karyotypic and meristic characterization of the Eagle Lake Trout, *Salmo gairdneri aquilarum*. Copeia 1980 (3): 418-424.
- CAMPOS, H. 1970. Introducción de especies exóticas y su relación con los peces de agua dulce de Chile. Not. Mens. Mus. Hist. Nat. 162: 3-8.
- HARTLEY, S. E., y M. T. HORNE. 1982. Chromosome Polymorphism in the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Chromosoma (Berl) 87: 461-468.
- HARTLEY, S. E. and M. T. HORNE. 1984. Chromosome relationships in the genus *Salmo*. Chromosoma 90: 229-237.
- ITURRA, P. y A. VELOSO. 1979. Localización de la zona organizadora del nucléolo (NOR) en cromosomas metafásicos de anfibios. Rev. Micr. Electr. Biol. Cel. 6: 53-60.
- LEVAN, A.; K. FREDGA, and A. SANDBERG. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52: 201-220.
- SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell. Res. 75: 304-306.
- OHNO, S.; C. STENIUS; E. FAISST y M. T. ZENZES. 1965. Postzygotic chromosomal rearrangements in rainbow trout (*Salmo irideus*. Gibbons). Cytogenetics 4: 117-129.
- QUACK, B. and B. NOEL 1977. The XY chromosome pair in man and human spermatocytes visualized by silver staining. Nature (Lond) 267: 431-433.
- THORGAARD, G. 1976. Robertsonian polymorphism and constitutive heterochromatin distribution in chromosomes of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Cytogenet. Cell. Genet. 17: 174-184.
- THORGAARD, G. 1977. Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. Science 196: 900-902.
- THORGAARD, G. 1983. Chromosomal Differences among Rainbow Trout Populations. Copeia 1983 (3): 650-662.
- VELOSO, A. 1979. Cytogenetics and Cytotaxonomic evidence of Chilean amphibians. En: Aspectos de la función y organización cromosómica. 188-197. M.E. Dretz, N. Brum-Zorrilla y G. A. Folle U (ed). UNESCO, Montevideo.
- WETZLAR, H. 1979. Beiträge zur Biologie und Bewirtschaftung von Forellen (*Salmo gairdnerii* und *S. trutta*) in Chile. Tesis Doctoral. Albert Ludwigs Universität, Freiburg.