

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPTO. DE BIOLOGÍA.

ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE CITOGENÉTICA  
DE DOS ESPECIES DE TRUCHAS (Salmo gairdnerli, R. y  
Salvelinus fontinalis, M. PISCIS- SALMONIDAE).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO PRESENTA

José Antonio Elorza Sánchez

1968



FACULTAD DE CIENCIAS  
Biblioteca



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

t é s i s P r o f e s i o n a l

A MIS SEÑORES PADRES:

SR: MANUEL ELORZA CEBALLOS.

SRA: AMPARO S. DE ELORZA.

CON RESPETO Y GRATITUD.

A MI SEÑORA ESPOSA:

SRA: MARGARITA C. DE ELORZA

CON CARÍÑO.

A MIS HERMANOS.

VÍCTOR MANUEL;  
SALVADOR FRANCISCO;  
CARLOS ENRIQUE;  
JORGE EDUARDO;  
RUBÉN DARÍO;

CON HERMANDAD.

a todos los hombres de  
ACCIÓN

ESTA TESIS FUÉ DESARROLLADA EN EL  
LABORATORIO DE CITOLOGÍA Y PATOLOGÍA  
DE TRUCHA DE LA ESTACIÓN PISCÍCOLA  
"EL ZARCO" (D.G.P.) - S.I.C.

" LA CIENCIA ES PARA TODOS Y LA GLORIA DE LOS QUE  
LA FABRICAN, ESTÁ EN SUMERGIRSE EN EL ANONIMA  
TO DE LOS HECHOS, QUE POR SER SOBERANAMENTE  
UTILES PASEN A SER DE LA PROPIEDAD COMÚN SIN  
FIRMA AL PIE, COMO LA OBRA DE DIOS".

( G MARAÑÓN )

## I N T R O D U C C I O N

La Revolución en la Citología Cromosómica de Mamíferos iniciada por Tjio y Levan ( 1956 ), no ha sido acompañada por un interés comparable en los cromosomas de otros vertebrados. En contraste con los cientos de Laboratorios que se dedican a la investigación de cromosomas en mamíferos, sólo unos pocos Laboratorios se encuentran estudiando Citología Cromosómica de vertebrados no mamíferos.

Puesto que el interés general en la Biología de los Osteichthyes es probablemente secundario de aquél que existe en los mamíferos, parece deseable examinar los estatutos comunes de la Citología Cromosómica de los peces y su potencial para futuras contribuciones.

### HISTORIA.

En la mitosis y la meiosis, son los cuerpos cromosómicos los que más minuciosamente han sido estudiados. Su presencia fué demostrada mucho antes de que Waldeyer los denominara " Cromosomas " en el año de 1888.

Cuarenta años antes, el botánico Hofmeister, estudiando las células maternas del pólen de Tradescantia, los había dibujado directamente de la células vivientes. Esta fué la primera representación gráfica y concreta de apareció en la Literatura de estos componentes nucleares.

A partir de estas fechas, mucho es lo que se ha avanzado en el estudio de los cromosomas, de tal manera que se ha logrado integrar una nueva Ciencia, la Citogenética, nacida de la interacción de la Genética con la Citología.

Integrada esta nueva Ciencia, los estudios sobre el cariotipo de las especies adquiere cada vez, más importancia, siendo los primeros beneficiados los mamíferos y el hombre.

Hasta antes del año de 1960, los estudios cariotípicos no seguían un patrón común para integrarse, los autores ordenaban, clasificaban y medían los cuerpos cromáticos según su criterio y se encontraba en la Literatura muchas formas de integrar los cariotipos.

Fué precisamente en el año de 1960, cuando un grupo de especialistas reunidos en un Congreso en Denver Colorado, E.U., discutió y adoptó una clasificación y ordenamiento de los cromosomas haciéndolo extensivo para todas las especies. Según los Acuerdos de la Convención de Denver, los cromosomas se clasifican en tres tipos, tomando en cuenta la posición del centrómero, lo que da por resultado la morfología que presentan durante la metafase y anafase: 1. - Acrocéntricos, cromosomas bastiniformes que tienen uno de sus brazos muy pequeño y aún imperceptible. 2. - Submetacéntricos, cromosomas que tienen -- brazos desiguales. 3. - Metacéntricos, cromosomas que tienen ambos brazos iguales o casi iguales.

Los distintos tipos cromosómicos son constantes para cada cromosoma homólogo.

Por otra parte, el sistema adoptado en Denver, ordena los pares cromosómicos de acuerdo con su tamaño y en orden decreciente, de tal manera que el par más grande será el número 1 y el más pequeño será el par último.

Este sistema ha sido bien adaptado para el cariotipo de los mamíferos y del hombre; en otras especies es poco común y en los peces no existe reporte alguno de haber clasificado a los cromosomas siguiendo este patrón.

Sin embargo, en este trabajo, se ordenan y clasifican a los cuerpos cromosómicos de las dos especies de truchas seleccionadas, hasta donde fué posible, según los principios que integran el sistema discutido en Denver.

Los estudios cromosómicos en el hombre y en los mamíferos están, en este momento, en su máximo desarrollo y madurez, tanto en el sentido técnico, como en el de las interpretaciones. En otros organismos, como por ej., en los teleósteos los estudios cromosómicos están aún en su infancia, también han habido avances, aunque en muy pequeña escala, ya que en estos estudios los autores se han concretado, --- cuando más, a reportar el número cromosómico diploide, por ejemplo:

En el año de 1904, Moenkhaus estudiando el embrión de Fundulus heteroclitus ( Cyprinodontidae ), encuentra un número diploide de 36. Este trabajo constituye uno de los más antiguos estudios sobre -- cromosomas en peces de agua dulce.

En el año de 1918, Pinney estudiando el embrión de Ctenolabrus adspersus ( Labridae ), encuentra un número cromosómico variable - de  $2n = 34-38$ .

En 1937, Makino, estudiando los estadios embrionarios del salmón Onchorhynchus keta ( Salmonidae ), encuentra un número diploide de 74.

En el año de 1964, Roberts, inicia los estudios sobre la Citogenética de la familia Centrarchidae, utilizando la moderna técnica del cultivo de células, haciendo incapié en la enorme importancia que estos estudios tienen, tanto desde el punto de vista económico y patológico como del biológico.

En el año de 1934, Prokofieva, estudiando el embrión de la trucha de arroyo ( Salvelinus fontinalis M. ), encuentra el número diploide cromosómico de 80.

En el año de 1963, Simon y Dollar estudiando el embrión de la trucha "Arco-iris" ( Salmo gairdnerii R. ), encuentran un número cromosómico diploide de 60.

En el año de 1965, Ohno, Stenius, Faisst y Zenzes, proponen el fenómeno de Robertson para los diferentes tejidos de la trucha " Arcoiris ", asentado que los diferentes tejidos de dichos organismos no presentan un número cromosómico constante, sino que hay pequeñas variaciones, haciendo responsable de este fenómeno a la fusión céntrica y a la disociación de los cromosomas.

En el aspecto técnico, también han habido avances para el estudio de los cromosomas en peces y así tenemos:

Los primeros reportes técnicos para efectuar estudios citogenéticos en peces, emplean el " aplastamiento " ( squash ) de la célula para extraer los cromosomas, naturalmente que como toda técnica que se inicia, los resultados no fueron muy satisfactorios; los primeros tejidos que se emplearon para hacer el " squash " fueron tejidos embrionarios, difíciles de trabajar ya que se presentaba el problema de la interferencia con las sustancias grasas del vitelo.

Sin embargo, con la utilización de las soluciones hipotónicas, el empleo de la aceto-orceína y de los colorantes panópticos, las técnicas han avanzado considerablemente, por ej., en el año de 1964, Simon integró un procedimiento en el cual la célula embrionaria sufre un aplastamiento parcial, de tal manera que los cromosomas no salen fuera de ella sino que quedan repartidos en el citoplasma. Disuelve los materiales grasos del vitelo del embrión con acetona y tiñe con orceína acética

#...a la cual se le ha agregado una cantidad conocida de ácido propiónico. De este modo, se elimina el problema de la interferencia con los materiales grasos del vitelo y se refuerza la coloración con el ácido propiónico.

En el año de 1966, Mcphail y Jones, emplean por vez primera el epitelio branquial como fuente citológica para obtener los cromosomas, utilizan el "squash" y tiñen con la aceto-orceína.

Del año de 1964 para adelante, Roberts emplea el cultivo de células para efectuar estudios cromosómicos en peces.

#### IMPORTANCIA DE LA INFORMACION CARIOTIPICA. ( \* )

Los cromosomas son los principales conductores de la información genética, vía su ADN y los cambios cariotípicos son generalmente acompañados por marcadas modificaciones fenotípicas.

De hecho, la constancia cariotípica mantenida de generación en generación, vía la línea germinal, es quizás, uno de los mejores principios biológicos. Sin embargo, en un reporte reciente, se ha discutido acerca de que la diferenciación normal orgánica de la trucha "Arco iris" puede estar asociada con cambios en el cariotipo, incluyendo ligeros cambios en el número cromosómico ( Ohno et al., 1965 ).

(\*) Complementado de Roberts, F.L. 1967

Chromosome Cytology of the Osteichthyes.

The Progressive Fish-culturist. Vol.29-2, P 75-83

Un patrón de diferenciación cariotípica como el descrito -- por Ohno, es desconocido en los vertebrados; además los datos son -- ciertamente no concluyentes y se estiman necesarias más investiga -- ciones.

Las utilidades de la información cariotípica son muchas. -- Los más obvios valores, quizás, están en la Citotaxonomía y en las relaciones Filogenéticas de los organismos. La información cariotípica ha sido grandemente usada en estudios Filogenéticos de plantas é insectos, y está siendo usada extensivamente para trazar relaciones evolutivas en mamíferos y otros animales. Los detalles de la -- formación cariotípica pueden dar considerable luz en el estudio de -- la Filogenia de los peces

Diferencias intraespecíficas, así como también diferencias interespecíficas, han sido reportadas en los peces, y parece que los peces están más inclinados al polimorfismo cromosomas intraespecíficos que otros vertebrados

Las diferencias intraespecíficas pueden ser mantenidas alopátricamente, aunque aquí pueden representar pasos iniciales de especiación.

Las diferencias simpátricas, por otro lado, dan excelentes evidencias de que la especiación ha sido completada, puesto que ta --

#..les diferencias no podrían ser mantenidas en una población híbrida.

La posibilidad de utilización de las diferencias cariotípicas como marcadores raciales deberá ser investigada.

En vista de las dificultades de separar razas con criterios morfológicos y fisiológicos, ambos de los cuales pueden estar sujetos a modificación ambiental, el valor de las marcas cariotípicas para este propósito no deberá ser sobreestimado.

Las implicaciones genéticas de los estudios cromosómicos son múltiples y están fuera del enfoque de este trabajo. Excepto de los estudios en ciertos peces tropicales, la genética de peces está en su infancia, y la posibilidad de los estudios cromosómicos en esta área es considerable.

Las asociaciones entre cambios cariotípicos y algunas anomalías y condiciones patológicas en peces son de una alta posibilidad. Tales asociaciones han sido descubiertas en el hombre, y en algunos casos los estudios del cariotipo son usados como diagnósticos útiles. Una aplicación comparable en la patología de peces es posible, pero en este momento los cariotipos normales son tan pobremente conocidos que sólo los cambios cariotípicos extremos pueden ser detectados. La patología de los salmónidos es de mayor interés para los

#. .biólogos pesqueros, y los cromosomas de los salmónidos son relativamente grandes y tienen numerosas variaciones en tamaño y forma. Consecuentemente, la oportunidad para los trabajos básicos en esta área es excelente.

En estudios experimentales de hibridación, los hallazgos -- cromosómicos pueden ser usados para confirmar que la actual hibridación, más bien que la gynogénesis ( esto es, la inducción de la segmentación por el espermatozoide sin la contribución de los cromosomas paternos ) ha ocurrido. Más allá, el análisis cromosómico hace posible la prueba de hibridación en el embrión y también suplementa finamente cualquier dato morfológico que pueda ser obtenido en especímenes adultos.

Si la historia de la Citología Cromosómica puede ser usada -- como una guía, parece probable que muchos otros beneficios serán -- derivados de los estudios cromosómicos. Las técnicas adecuadas son ahora aprovechables y la tradicional suposición de que los cromosomas de peces son difíciles de investigar, puede ahora ser descartada.

Las dos más recientes revisiones de números cromosómicos en animales ( Makino, 1956; Altman y Dittmer, 1962 ) entre los vertebrados una mayoría de conteos para aves y mamíferos y vertebrados de sangre fría, incluyen en su gran mayoría especies de Asia y Europa. Aunque se estima que el número total de especies de peces sobre

#..pasa las 40 000, la lista de Makino incluye sólo 63 especies de -- peces, 8 de las cuales son indígenas de Norteamérica. Recientes -- trabajos y reportes omitidos en estas revisiones extienden a 47 el -- número de especies de Norteamérica cuyo número cromosómico de -- conoce.

Como puede verse, falta todo un camino por recorrer para -- que sepamos algo acerca de la Citogenética de los Teleósteos, y si -- a esto agregamos que los pocos autores que se han dedicado a inves -- tigar cromosomas en peces, no se han puesto de acuerdo en el núme -- ro cromosómico de las especies, como es en el caso particular de -- las truchas, y que, por otra parte, la metodología empleada, a pe -- sar de estar notablemente mejorada, no ha permitido esclarecer con -- certeza los números cromosómicos, es evidente pues, que el objeti -- vo primordial de este trabajo está concentrado en dos puntos: 1. - La -- elaboración de un procedimiento que permita encontrar, por un lado, -- un alto índice de mitosis en metafase; por otro, separación é indivi -- dualización al máximo de los cromosomas así como finura en los de -- talles de sus estructuras. 2. - Averiguar en base a la metodología a -- seguir, los números diploides correctos, evitando en lo posible, los -- errores de técnica.

## GENERALIDADES

### TECNICAS.

Los recientes avances en la Citología de mamíferos, son primeramente el resultado de una metodología mejorada, la cual ha dado nuevas fuentes de células utilizables en división y nuevos procedimientos para la separación y tinción de los cromosomas. La Citología de los peces tiene a su vez, cuatro fuentes de células: 1.- Embriones; 2.- Materia Testicular; 3.- Cultivo de células y 4.- Epitelio de la córnea y de la conjuntiva. Cada fuente ha requerido sus propias innovaciones técnicas.

### EMBRIONES.

Los salmónidos, los cuales son los más conocidos que cualquier otro tipo de peces, han sido grandemente estudiados en embriones tempranos. La rápida división de los blastómeros tempranos del embrión de los Salmonidae, son fácilmente separados del vitelo y pueden ser teñidos con la acetoorceína sin previa fijación.

Los huevecillos pueden ser también fijados, almacenados y posteriormente ser teñidos. Las preparaciones hechas a partir de blastómeros han suministrado mucho al conocimiento de lo observado en el cariotipo de los Salmonidae, pero estas técnicas tienen dosdesventajas. Primero, los cromosomas tienden a ser elongados, lo

#..cual hace frecuentemente el conteo y la determinación de la posición del centrómero muy dificultosa. Segundo, el citoplasma del ---blastómero tiene una cierta afinidad por los colorantes cromosómi--cos presumiblemente debido a su contenido de ácido desoxiribonuclei--co ( ADN ) y consecuentemente se obtienen contrastes engañosos entre el citoplasma y supuestos cromosomas que no han sido obtenidos.

En otros peces, con huevecillos muy pequeños, los blastóme--ros son removidos del vitelo sólo con grandes dificultades é invaria--blemente algo de vitelo es llevado en ellos, lo cual interfiere con la--tinción y se presentan figuras mitóticas muy oscurecidas imposibles de analizar. Los embriones tardíos pueden ser completamente remo--vidos de el vitelo, pero en este punto el porcentaje de células en divi--sión se encuentra grandemente reducido. La colchicina causa una --acumulación de figuras mitóticas en embriones de Centrarchidae en--todos los estados, pero estos son en su mayor parte cromosomas pic--nóticos aglutinados; esto es c-mitosis, las cuales son insatisfactorias para el análisis cromosómico. Tal tipo de c-mitosis son el resultado de una hipersensibilidad a la colchicina. En contrate, Ohno et al., --( 1965 ) han reportado que las figuras mitóticas del " huevo oculado " de la " trucha " Arco-iris" ( Salmo gairdnerii ), no fueron afectadas por la colchicina. Células de trucha " Arco-iris " de un mes de edad muestran buenas metafases colchicinizadas, así como también en es--pecímenes de más edad.

Una dificultad mayor con otras especies es el problema de la obtención de los embriones. Los huevecillos fertilizados pueden ser colectados en condiciones naturales, pero la identificación del parentesco no siempre es posible. Las épocas de desove frecuentemente se sobreponen. Entre los Centrarchidae, los huevecillos son muy semejantes en apariencia y aquéllos que pueden ser fácilmente identificados como los de Lepomis auritus, dan sólo identificación maternal. La fecundación artificial nos da un reconocimiento positivo de ambos padres, así como también el preciso conocimiento del tiempo de fecundación.

#### MATERIAL TESTICULAR.

Los "aplastamientos" (squash), han sido usados en varios estudios de peces. Las preparaciones con material testicular son -- particularmente usadas en la determinación del número cromosómico, puesto que se obtienen preparaciones tanto de meiosis como de mitosis. La calidad de las figuras es considerablemente mejor haciendo inyecciones intramusculares de colchicina, aunque en algunos casos los cromosomas mitóticos salen altamente contraídos como para hacer análisis cariotípicos. En peces grandes el estroma del tejido conjuntivo del material testicular, frecuentemente hace difícil la separación satisfactoria de las células. Sin embargo, la principal -- desventaja de utilizar material testicular, es la naturaleza estacional

#. .del material. El tejido testicular puede ser manejado aun en estado fresco, pero para obtener los mejores resultados deberá ser fijado simultáneamente en aceto-orceña. La Fijación antes de la tinción da un adecuado esparcimiento de los cromosomas. Consecuentemente, esta técnica es aplicable sólo en los momentos de activa proliferación espermatogonial, lo cual en muchas especies es en el mes justo antes de la estación del desove.

#### CULTIVO DE CELULAS.

Mejores resultados son obtenidos con el cultivo de células. - Muchos citólogos que se dedican a estudiar cromosomas en tejidos de mamíferos utilizan los cultivos de leucocitos de sangre periférica y un estimulante mitótico de origen vegetal, la Phytohemaglutinina, - pero intentos extensivos para cultivar sangre de trucha " Arco-iris " con este procedimiento en el Laboratorio de el Zarco, han fallado. - Los cultivos preparados empleando previa tripsinización de tejidos sólidos de acuerdo con la técnica de Wolf ( Wolf, 1965 ), producen -- buenas células en división muy adecuadas para los estudios cromosómicos y son sólo ligeramente más tardados que los cultivos de sangre periférica.

La técnica del cultivo de células es superior en varios aspectos al uso de embriones y al " aplastamiento " del material testicular. Mayores detalles de los cromosomas son revelados y la separara

#. .ción de los mismos es más satisfactoria. Un alto porcentaje de -  
placas metafásicas puede ser obtenido periódicamente corroborando  
el índice mitótico antes y después del tratamiento con la colchicina.

#### EPITELIO DE LA CORNEA Y DE LA CONJUNTIVA.

Las células epiteliales del ojo han sido usadas en estudios de  
cromosomas de peces. Las divisiones celulares no son particular--  
mente abundantes en el epitelio de la córnea y de la conjuntiva adul-  
ta, pero estos tejidos tienen la ventaja de ser fácilmente obtenibles-  
en todos los momentos. Algunos autores han aumentado el porcenta-  
je de células en división induciendo el daño del ojo, otros más, han -  
usado el pretratamiento con colchicina para facilitar el conteo. En el  
Laboratorio de el Zarco, esta técnica fué ensayada, se selecciona--  
ron crías de 7 meses de edad de trucha de arroyo ( Salvelinus Fonti-  
nalis M. ) y se les dañaron los ojos, enseguida, se les aplicó una --  
inyección intramuscular de colchicina, dejándolas por un tiempo de -  
4 horas en recipientes bien oxigenados. Al término de este tiempo, -  
se hizo la técnica citológica de extracción de cromosomas con resul-  
tados bastante satisfactorios.

#### M A T E R I A L Y M E T O D O S.

##### MATERIAL BIOLÓGICO.

El material biológico utilizado en este trabajo está represen-



#. .tado por dos especies de truchas, que son: Salmo gairdnerii R., conocida vulgarmente como " Trucha Arco-iris ", y Salvelinus fontinalis M. , conocida vulgarmente como " Trucha de Arroyo".

La edad y la longitud promedio de los ejemplares utilizados - en ambas especies, se presenta en la tabla siguiente:

ESPECIE	EDAD	LONGITUD PROMEDIO
<u>Salmo gairdnerii</u> R.	6 meses	6. 0 cms.
<u>Salmo gairdnerii</u> R.	7 meses	7. 0 cms.
<u>Salmo gairdnerii</u> R.	8 meses	7. 5 cms.
<u>Salvelinus fontinalis</u> M.	5 meses	4. 0 cms.
<u>Salvelinus fontinalis</u> M.	6 meses	4. 5 cms.
<u>Salvelinus fontinalis</u> M.	7 meses	5. 0 cms.

La fuente citológica para la obtención de los cuerpos cromáticos consistió de epitelio branquial y aunque algunos autores recomiendan la utilización del último arco branquial para la obtención de los cromosomas ( Mcphail y Jones, 1966 ), en este trabajo fué posible obtener buenas y abundantes figuras mitóticas utilizando los demás arcos.

El epitelio de las branquias de los teleósteos, se caracteriza por ser un epitelio que se encuentra en constante regeneración, lo cual hace que su tasa mitótica sea elevada y además permite efectuar estudios cromosómicos en cualquier momento de la vida del pez.

MATERIAL DE OTRO TIPO.

El material de laboratorio propiamente dicho, utilizado en la ejecución de este trabajo consta de lo siguiente:

Material quirúrgico:

- Equipo completo de disección.
- Pinzas de punta aguda.
- Agujas para disección de punta recta.
- Agujas para disección de punta curva.

Cristalería:

- Vidrios de reloj.
- Matraces Erlemmeyer.
- Cajas de Petri.
- Probetas.
- Cajas de Coplin, para 5 preparaciones.
- Porta-objetos y cubre-objetos desengrasados.

Reactivos y colorantes:

- Mezcla colorante de Giemsa ( Merck )
- Mezcla de colorante de Leishmann ( Merck ).
- Acido acético glacial, ( Merck ).
- Metanol absoluto ( Merck ).
- Colchicina, Q.P. ( Merck ).
- Alcohol etílico absoluto ( Merck ).
- Xilol ( Reasol ).

- Bálsamo del Canadá ( Harleco ).

Material fotográfico:

- Película High contrast copy, de 36 mm. ( Kodak ).

Papel para positivos Kodabromide del No. 3 ( 5 x 7 ).

- Revelador Kodak D-19.

- Fijador ácido ( Kodak ).

- Tanque revelador, para 1 rollo de película.

Material óptico:

- Fotomicroscopio marca Zeiss, con óptica de contraste de fases; objetivo: 100x, ocular: 12. 5x.

- Filtros: verde, interferencia, azul. ( Zeiss ).

Otros:

\_ Mechero de gas.

METODO

En la ejecución de la metodología, la selección de las crías -  
fué de gran importancia para obtener resultados positivos; la utiliza-  
ción de crías sanas, vigorosas y bien alimentadas, permitió una so-  
brevivencia mayor a la manipulación. Las instalaciones de la sala -  
de incubación de la Estación Piscícola " El Zarco ", permitieron ---  
aprovechar al máximo los especímenes en experimentación.

Los resultados y la discusión de una nueva técnica desarrollada  
para el estudio de cromosomas en epitelio branquial, constituyen-

#. .uno de los puntos principales de este trabajo. La introducción de una técnica de este tipo permite observar detalles más finos y precisos, sin recurrir a pasos tan drásticos como el " squash " tan co--múnmente empleado.

La técnica empleada fué integrada por la convergencia de dos técnicas modernas; por una parte, la colchicinización y la hipotonización del material a estudiar, fueron tomadas de la técnica original - de Mcphail y Jones ( 1966 ); mientras que la fijación, el rompimiento celular y la tinción se tomaron de las técnicas modernas para estudios cromosómicos en cultivo de tejidos.

Cinco técnicas se ensayaron antes de integrar completamente la final y definitiva.

Los objetivos que se pueden alcanzar con este tipo de técnica son los siguientes: 1. - Evitar el tratamiento brusco del material, el cual puede romper ó distorsionar a los cuerpos cromáticos. 2. - Obtener cromosomas bien detallados y con contrastes elegantes. 3. - - Evitar confusiones en la elaboración de los cariotipos.

A continuación se presenta una descripción detallada del procedimiento desarrollado para la obtención de los cromosómas utilizando el epitelio branquial.

Para la mejor comprensión de esta nueva técnica, el autor -

#. .lo ha dividido en cinco fases, que son: Fase I, tratamiento preliminar del material; Fase II, colchicinización del material; Fase III, Disección é hipotonización del material branquial; Fase IV, fijación y rompimiento celular; y Fase V, Tinción; cada una de ellas será descrita con detalle.

#### FASE I, TRATAMIENTO PRELIMINAR DEL MATERIAL.

El manejo adecuado de las crías de trucha, es de gran importancia para obtener buenos resultados, se llega a dominar con el trato continuo y cuidadoso de los especímenes, el tratamiento preliminar es por tanto, uno de los puntos claves en el procedimiento, éste consiste en alimentación intensiva de las crías durante ocho días antes de utilizarlas; este paso es de suma importancia ya que les puede permitir a los ejemplares dos grandes ventajas: primera, es posible que crías bien alimentadas puedan resistir más la inyección de colchicina y segunda, es probable que la alimentación les permita introducir a su organización nueva materia prima con que efectuar mayor síntesis, lo que repercute que en los órganos con regeneración continua, el índice mitótico pueda ser más elevado.

Se recomienda utilizar para cada especie su alimento favorito; en el caso de las crías de trucha, consiste en " pulgas de agua " o bien hígado de res perfectamente molido.

## FASE II, COLCHICINIZACION DEL MATERIAL.

La colchicinización constituye un paso delicado, el cual requiere de cierta práctica y experiencia; la función principal de aplicar la colchicina es que la célula en mitosis se detenga en la metafase; la colchicina actúa bloqueando la formación del huso acromático por interferencia de los grupos sulfhidrilo de la constitución química del mismo é impide la migración de los cromosomas hacia los polos de la célula en división.

La concentración de la colchicina empleada y que se recomienda usar, cuando menos en crías de las edades antes citadas es de 0.05% en solución salina isotónica de cloruro de sodio. En las primeras experiencias, el autor había utilizado agua destilada en lugar de la solución salina isotónica, sin embargo, las comparaciones entre lotes inyectados con colchicina en solución salina, demostración claramente, por el número de metafases, que es más adecuado utilizar la solución salina isotónica de cloruro de sodio en lugar del agua destilada; ésto tiene su probable explicación en el hecho de que, siendo la solución salina un medio semejante a los líquidos del cuerpo desde el punto de vista osmótico, es probable que facilite la incorporación del alcaloide hacia el torrente sanguíneo.

La aplicación de la inyección es intramuscular y consiste en inyectar al espécimen en la masa muscular inmediatamente detrás -

#. .de la cabeza y fuera de la línea media, sujetándolo con tres dedos dentro del agua. Se le aplica una décima de mililitro de la solución de colchicina; hay que tener cuidado de no lesionar nervios ó médula espinal. El hecho de inyectar al espécimen en esta forma tiene su fundamento en que de esta manera no se le priva en ningún momento de oxígeno y pueda soportar más la inyección, además de que no se maltrata como cuando los peces son sacados fuera del agua. El tiempo de colchicina es de 4 horas. Una vez inyectados los peces, deben ponerse en recipientes perfectamente oxigenados. En la Estación Piscícola "El Zarco", las tinas de incubación son ideales para poner a las crías recién inyectadas, ya que constan de dos elementos, una tina superior de sedimentación abastecida por un cuerpo de agua que sale de un tubo, y la tina de incubación propiamente dicha, abastecida con agua por la primera por medio de un vertedor facilitando su oxigenación inmediata, lo cual permite que las crías inyectadas se encuentren en un medio exhuberante en oxígeno ( 8 p.p.m., de oxígeno disuelto). En estas condiciones las crías se reponen de inmediato y permiten la actuación del alcaloide.

### FASE III, DISECCION E HIPOTONIZACION DEL MATERIAL BRANQUIAL.

Una vez cumplido el plazo de la actuación de la colchicina, se sacan las crías de la tina y se hace la disección del aparato branquial

" In vivo " hasta extraerlo completamente, una vez extraído, se cortan los arcos en fragmentos correspondientes a medios arcos. La disección debe de hacerse en caja de Petri empapado el espécimen con solución salina.

Acto seguido, se colocan los arcos branquiales fragmentados en el medio hipotónico, el cual consiste de agua bidestilada tibia, por un tiempo de 40 minutos o bien hasta que hayan desaparecido indicios de sangre, de tal manera que los arcos presenten un color blanquecino, lo que indica que el hinchamiento celular ha sido concluído.

#### FASE IV, FIJACION Y ROMPIMIENTO CELULAR.

La fijación del material branquial hinchado, se efectúa en alcohol-acético, que se prepara de la siguiente manera:

Alcohol metílico anhidro	3 partes.
Acido acético glacial	1 parte.

El fijador se prepara justo antes de usarlo para evitar lo menos posible la evaporación del alcohol. El tiempo de actuación del fijador va de 15 minutos a 4 horas, haciendo dos cambios.

Una vez concluída la fijación, con una pinza muy fina y sobre un porta-objetos perfectamente limpio y desengrasado se " sacude " el arco, golpeándolo suavemente sobre el porta-objetos, hasta lograr

#. .una capa de células que puede ser notada a simple vista por la -- presencia de pequeños grumos, la descamación del epitelio branquial debe de hacerse sobre una gota de fijador para permitir el esparci-- miento celular. Una vez descamado el epitelio sobre la gota del fija-- dor, se le agregan dos más y se lleva a la flama hasta su completa - combustión, se elimina el resto del fijador que consiste sólo de ácido acético, empleando papel filtro y se seca completamente abanicando-- el porta-objetos. Hay que tener mucho cuidado de que la combustión - no sea excesiva, ya que ésto puede interferir en la tinción y lo que -- es más grave, puede destruir los cromosomas.

#### FASE V, T I N C I O N.

La tinción puede efectuarse ya sea utilizando colorantes panópticos o bien tiñendo con la aceto-orceña; sin embargo, el autor re-- comienda usar la coloración a base de panópticos como es la tinción de Giemsa-Leishmann, por ser una tinción que, entre otras ventajas, tiene el de ser muy clara y elegante en sus contrastes, además de -- que son colorantes más baratos; por el contrario, la aceto-orceña, - es un colorante de preparación más minuciosa, de difícil obtención -- por su precio bastante elevado. A continuación se darán ambas tincio-- nes.

#### TINCION DE GIEMSA-LEISHMANN

Preparación del colorante.

Colorante de Giemsa

5 c.c. ( Merck )

Colorante de Leishmann	2 c.c. ( Merck )
Agua bidestilada hervida neutra	40 c.c.

Se reparte en vasos de coplin de 5 preparaciones de capacidad. La tinción dura 30 minutos.

#### TINCION DE LA ACETO-ORCEINA.

##### Preparación del colorante.

Orceína sintética ( G.T. Gürr )	3 gramos.
Acido acético glacial ( Merck )	70 c.c.
Agua bidestilada	30 c.c.

Para la preparación de esta mezcla es indispensable el empleo de un refrigerante de reflujo. La tinción dura 20 minutos.

Las fotomicrograffías fueron hechas en un fotomicroscopio de la Casa Zeiss, empleando óptica de contraste de fases, siendo el objetivo de 100x neofluar y el ocular de 12. 5x. La película empleada fué alto contraste de la Casa Kodak ( High Contrast copy film ). En la elaboración de las fotomicrograffías se emplearon diferentes filtros, los más usados fueron el filtro verde y el filtro de interferencia. El papel para la elaboración de los positivos fué Kodabromide del número 3 ( 5 x 7 centímetros).

Todas las placas fotográficas fueron tomadas en el centro del campo, además se contaron 100 metafases por cada especie de trucha, y de donde pudo ser definido el número cromosómico modal.

De cada una de las dos especies estudiadas se construyó un -

#..cariotipo, que incluye la clasificación de los cromosomas de ---  
acuerdo con la posición del centrómero, el ordenamiento de ellos --  
por pares y tamaños.

RESUMEN DE LA TECNICA.

1. - Seleccionar crías en buen estado de salud, de una edad desde 1 - mes hasta 8. Alimentarlas intensivamente durante 8 días antes de utilizarlas, con el alimento favorito del pez.
2. - Hacer una inyección intramuscular de .1 ml., de una solución - de colchicina en medio isotónico de cloruro de sodio al 0.05% - en la región anterior y lateral del dorso, teniendo el cuidado de no lesionar nervios ó médula espinal, dejarlas por 4 horas en - recipientes bien oxigenados.
3. - Disecar "In vivo", completamente el aparato branquial y recor - tarlos en fragmentos correspondientes a medios arcos.
4. - Colocarlos en medio hipotónico ( agua bidestilada tibia ), por un tiempo de 40 minutos o bien hasta que presenten aspecto blanque - cino.
5. - Fijar en el licor alcohol-acético ( 3 a 1 ) por un tiempo de 15' a - 4 horas, haciendo dos cambios. Preparar el fijador justo antes - de usarlo.
6. - Efectuar la descamación del epitelio branquial, golpeando el arco suavemente, sobre un porta-objetos perfectamente limpio y des - engrasado, en una gota de alcohol-acético; agregar dos más y lle - var a la flama.
7. - Tefir en la mezcla Giemsa-Leishmann, 30'. O bien en la aceto - - orceña 20'.

8. - Lavar en agua destilada.
9. - Un cambio de alcohol de 50%.
10. - Otro lavado rápido en agua destilada.
11. - Dejar secar al aire.
12. - Aclarar en xilol y montar en bálsamo del Canadá o resina sinté-  
tica.

## RESULTADOS

En el aspecto técnico, el procedimiento construido resultó adecuado para efectuar estudios cromosómicos en peces, cuando menos en los de agua dulce; ésto permitió desde luego, alcanzar el segundo objetivo de este trabajo, ya que se averiguaron los números cromosó-  
micos modales de las dos especies seleccionadas.

- Salmo gairdnerii R., presenta  $2n=60$ .

- Salvelinus fontinalis M., presenta  $2n=80$ .

El criterio para fundamentar tales números, está basado en el conteo de 100 metafases por cada una de las especies y de donde se definió el número modal de acuerdo con las gráficas 1 y 2.

Sin embargo, para complementar este estudio, aparte de averiguar los números cromosómicos, se construyeron los cariotipos -- respectivos, clasificando los cromosomas de acuerdo con el sistema discutido en Denver, o sea ordenándolos por pares, tamaño decrecien-

#. .te y morfología tomando en cuenta la posición del centrómero; -- respecto a este último punto, se encontraron cromosomas dicéntricos ( por primera vez reportados en estas especies ), metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos.

En la tabla 1 y 2, se presenta la descripción de los pares -- cromosómicos, en estas tablas se incluyen los datos siguientes: 1. - Grupo a que pertenecen; 2. - Número del cromosoma; 3. - Morfolo-- gía; y 4. - Tamaño. Además se incluye, una descripción con más de-- talle de cada uno de los pares cromosómicos. Se anexan a estas ta-- blas los cariotipos construídos y una fotografía total de los cromoso-- mas estudiados.

En algunos casos, aparecen en los cromosomas individuales, falsas estructuras, ésto corresponde a zonas cromosómicas que se cruzaron en el mismo plano, pero que de ninguna manera son estruc-- turas reales.

En el aspecto de los cromosomas sexuales, habrá que preci-- sar más el cariotipo en este sentido, por el momento sólomente bas-- te indicar, que se encontraron en las dos especies de truchas, dos - cromosomas impares en cada uno de los sexos.

Por lo tanto, los resultados pueden resumirse en:

1. - Se diseñó una nueva técnica para efectuar estudios cromosómicos en peces.

2. - Se logró, gracias a tal procedimiento, averiguar el número diploide modal de las especies estudiadas.

3. - Se construyó el cariotipo para cada una de las especies en cuestión.

## IDENTIFICACIÓN DE LOS CROMOSOMAS DE Salmo gairdnerii, R.

GRUPO	GRUPO	No DEL CROMOSOMA	MORFOLOGÍA	TAMAÑO
A	1 5	1 4 5 (●) 2 3	Dicéntrico. Metacéntrico. Submetacéntrico.	Grande Grande. Grande.
B	6 16	6 10 11 12 14 (i) 7 8 9 13 15 16	Metacéntrico. Submetacéntrico.	Mediano. Mediano.
C	17 20	18 19 20 (+) 17	Metacéntrico. Submetacéntrico.	Pequeño. Pequeño.
D	21 22	21 22 (i)	Acrocéntrico.	Grande.
E	23 25	23 25	Acrocéntrico.	Mediano.
F	26 27	26 27	Acrocéntrico.	Más mediano que los an teriores.
G	28 29	28 29	Acrocéntrico.	Pequeño.

### Cromosomas Impares

metacéntrico pequeño.	( + )	♂
acrocéntrico grande.	(   )	♂
metacéntrico grande.	( ● )	♀
metacéntrico mediano.	(   )	♀

- n. de dicéntricos. . . . . 2 ( 1 par ).
- n. de metacéntricos. . . . . 20 ( 10 pares ).
- n. de submetacéntricos. . . . . 18 ( 9 pares ).
- n. de acrocéntricos. . . . . 18 ( 9 pares ).
- + 2 impares para cada sexo.

2n 60.

Tabla 1

DESCRIPCION DE LOS PARES CROMOSOMICOS EN Salmo gairdnerii R

GRUPO: 1-5.

No. 1. - Este par de cromosomas es muy característico, ya que es dicéntrico. Presenta un centrómero en la parte media y otro más o menos subterminal.

No. 2. - El más grande de los submetacéntricos y el segundo en tamaño total relativo.

No. 3. - Submetacéntrico, un poco menor en longitud total relativa, que el par anterior.

No. 4-5. Son los siguientes cromosomas en tamaño relativo, por su morfología son metacéntricos, generalmente son casi iguales.

GRUPO: 6-16.

No. 6. - Metacéntrico mediano, el siguiente en longitud total relativa y que puede, a veces, detectársele una constricción secundaria.

No. 7. - El más grande los submetacéntricos medianos.

No. 8-9. Submetacéntricos medianos, los siguientes en tamaño relativo, casi iguales en tamaño, nada más que -

#..en el par 9 los brazos superiores son más pequeños.

No. 10-11-12. - Metacéntricos medianos, casi iguales en longitud total relativa.

No. 13. - Submetacéntrico mediano, el más característico de este grupo. Se distingue muy bien la constricción primaria.

No. 14. - Moderadamente metacéntrico mediano, el primero de ellos presenta en los brazos anteriores estructuras que no son reales, sino que corresponden a zonas cromosómicas cruzadas.

No. 15-16. - Submetacéntricos medianos, el par 15 ligeramente un poco más grande que el 16.

GRUPO: 17-20.

No. 17. - El más pequeño de los submetacéntricos.

No. 18-19. - Metacéntricos pequeños, pero más grandes que el par 20.

No. 20. - El más pequeño de los metacéntricos.

GRUPO 21-29.

No. 21. - Acrocéntrico grande, el más grande los acrocéntricos.

No. 22. - Acrocéntrico un poco menor que el anterior. En el primero de ellos, la parte superior se unió de tal ma

#. .nera que no se distinguen los brazos en esta zona.  
na.

No. 23. - Acrocéntrico mediano, el mayor de los medianos. -  
Se le distingue muy bien la constricción primaria.

No. 24. - Acrocéntrico un poco menor en longitud total relativa que el par anterior. Se nota muy bien el centrómero.

No. 25. - Acrocéntrico mediano, un poco menor que el par anterior.

No. 26-27. - Acrocéntricos más medianos que los anteriores.

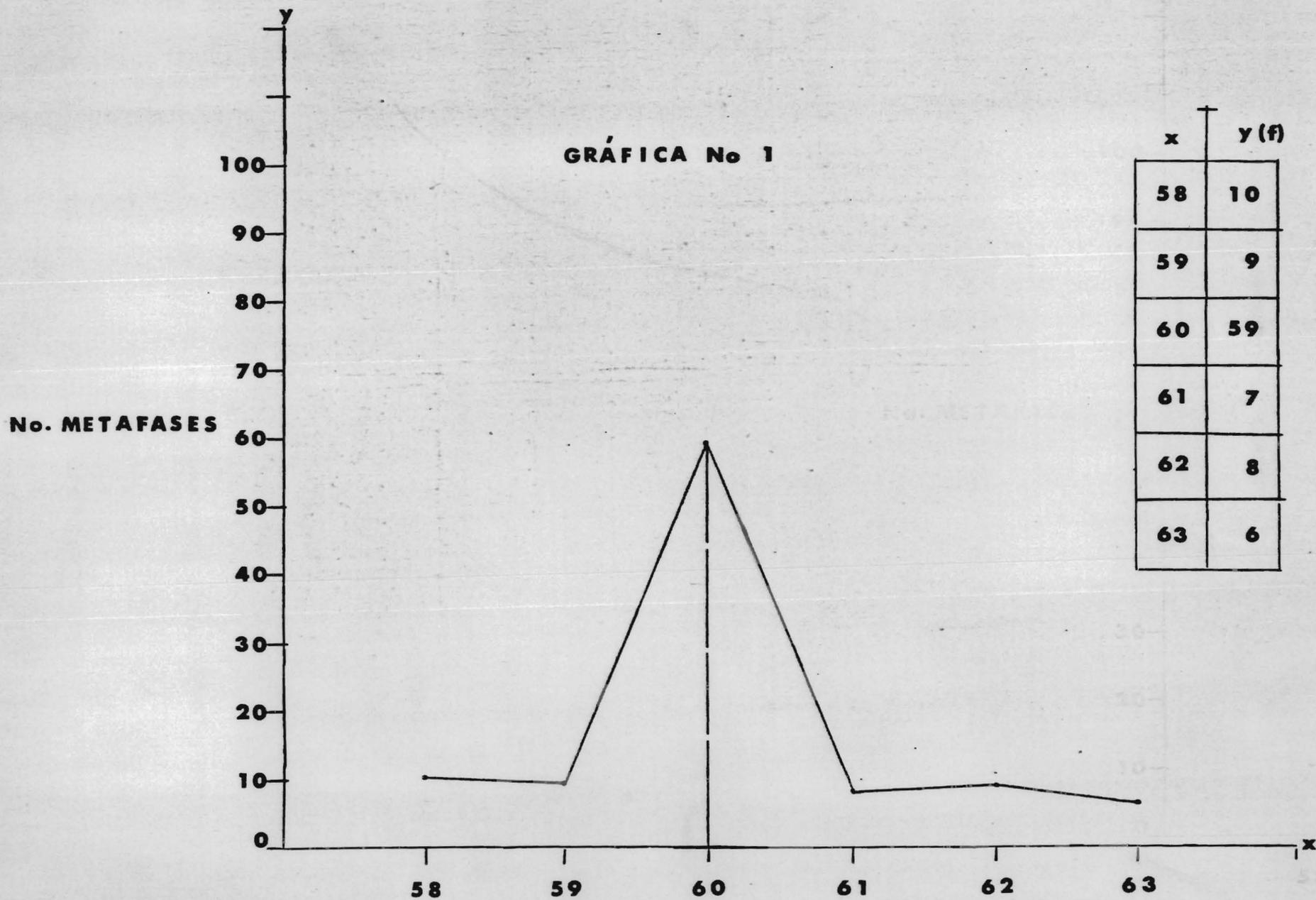
No. 28-29. - Acrocéntricos pequeños, el par 29 ligeramente más pequeño que el par 28.

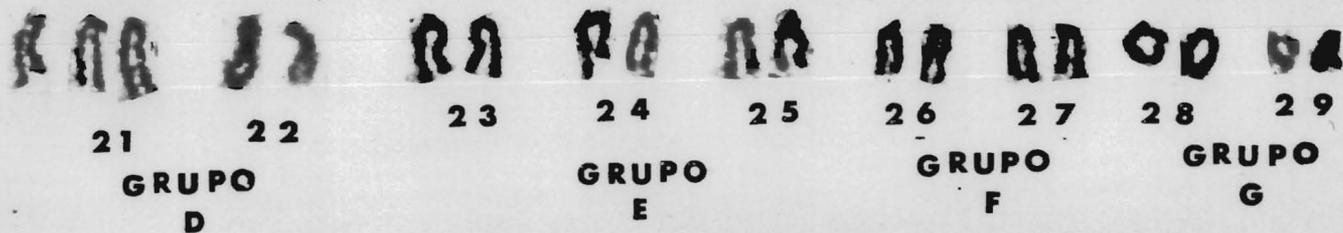
Cromosomas impares: corresponden a 1 metacéntrico pequeño y 1 acrocéntrico grande en el macho 1 metacéntrico grande y 1 metacéntrico mediano en la hembra.

# NÚMERO CROMOSÓMICO MODAL.

Salmo gairdnerii, R.

GRÁFICA No 1





Salmo gairdnerii, R.

100x 12.5x

2n 60

trucha arco-iris



1 2 3 4 5  
GRUPO A

♀.



6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16  
GRUPO B



GRUPO C



21 22 23 24 25 26 27 28 29  
GRUPO D GRUPO E GRUPO F GRUPO G

♀

Salmo gairdneri, R.

100x 12.5x 2n:60

trucha  
arco-iris



Salmo gairdnerii, R.

100x12.5x

2n 60

epitelio branquial.



trucha arco-iris.

**IDENTIFICACIÓN DE LOS CROMOSOMAS DE *Salvelinus fontinalis*, M.**

<b>GRUPO</b>	<b>GRUPO</b>	<b>No del CROMOSOMA</b>	<b>MORFOLOGÍA</b>	<b>TAMAÑO</b>
<b>A</b>	<b>1,5</b>	<b>1 2-4 ( + ) 3-5</b>	<b>Dicéntrico Metacéntrico Submetacéntrico.</b>	<b>Grande. Grande. Grande.</b>
<b>B</b>	<b>6,7</b>	<b>6 ( ! ) ( ! ) 7</b>	<b>Metacéntrico- Submetacéntrico.</b>	<b>mediano. mediano.</b>
<b>C</b>	<b>8,15</b>	<b>8-15</b>	<b>Acrocéntrico.</b>	<b>grande.</b>
<b>D</b>	<b>16,19</b>	<b>16-19</b>	<b>Acrocéntrico.</b>	<b>mediano.</b>
<b>E</b>	<b>20,25</b>	<b>20-21 22-25</b>	<b>Submetacéntrico Acrocéntrico.</b>	<b>pequeño. más mediano que el grupo D.</b>
<b>F</b>	<b>26,34</b>	<b>26-34</b>	<b>Acrocéntrico.</b>	<b>más mediano que el grupo E.</b>
<b>G</b>	<b>35,37</b>	<b>35-37</b>	<b>Acrocéntrico.</b>	<b>Pequeño.</b>
<b>H</b>	<b>38</b>	<b>38</b>	<b>Acrocéntrico.</b>	<b>más pequeño que el an terior.</b>
<b>I</b>	<b>39</b>	<b>39 ( .. )</b>	<b>Acrocéntrico.</b>	<b>más pequeño que el an terior.</b>

cromosomas impares: un grande metacéntrico. ( + )  
un mediano dicéntrico. ( ! ) ♀  
un mediano dicéntrico. ( ! ) ♂  
un pequeño acrocéntrico. ( .. )

**R E S U M E N**

No de DICÉNTRICOS	2 ( 1 par )
No de METACÉNTRICOS	6 ( 3 pares )
No de SUBMETACÉNTRICOS	10 ( 5 pares )
No de ACROCÉNTRICOS	60 ( 30 Pares )
+ dos impares en cada sexo.	

2n 80

DESCRIPCION DE LOS PARES CROMOSOMICOS DE Salvelinus Fontinalis M.

GRUPO: 1-5.

- No. 1. - En Salvelinus fontinalis M., este par es acentuadamente dicéntrico. Presenta un centrómero en la parte media y otro casi en posición subterminal. Presenta, -- además, constricciones secundarias y telómeros. En tamaño relativo, es el par más grande de todos.
- No. 2. - En tamaño relativo, el más grande de los metacéntricos, presenta constricciones secundarias. El centrómero se encuentra aproximadamente en posición media.
- No. 3. - Los submetacéntricos más grandes en tamaño relativo, en el segundo de ellos, no se nota el centrómero debido al efecto de la técnica.
- No. 4. - Metacéntrico grande, un poco menor que el par 2, se nota muy bien la constricción primaria ó centrómero, el primero de ellos, es más pignótico que el segundo.
- No. 5. - Submetacéntrico grande, un poco menor que el par 3, se nota bien la constricción primaria en el primero - de ellos, en el segundo miembro debido al cruzamiento de zonas cromosómicas en el mismo plano, no se

#..distingue con precisión dicha estructura.

GRUPO: 6-7.

No. 6. - Metacéntrico mediano, la constricción primaria se encuentra aproximadamente en posición central.

No. 7. - Submetacéntrico mediano; el primero de ellos más pignótico que el segundo. El centrómero en el primero de ellos, no se distingue con claridad, por cruzamiento de zonas cromosómicas en el mismo plano.

GRUPO 8-15.

No. 8-15. - Todos acrocéntricos grandes en tamaño relativo, - en algunos, como en los pares 8, 10, 11, se distingue muy bien el centrómero. Los pares, 11, 14, 15, son más pignóticos que los demás.

GRUPO: 16-19.

No. 16-19. - Acrocéntricos medianos todos, en el primer par se nota muy bien la constricción primaria, los pares 17, 18, más pignóticos que los demás.

GRUPO: 20-25.

No. 20-21. - Submetacéntricos pequeños, más o menos iguales en tamaño, el primer miembro del par 20 y los dos - del par 21, presentan la configuración en "8", resul-

#. .tante de la unión de los extremos de los brazos,  
debido a efectos de técnica.

No. 22-25. - Todos acrocéntricos medianos, se nota pignosis  
en los pares 24, 25.

GRUPO: 26-34.

No. 26-34. - Todos acrocéntricos, un poco menores que los -  
del grupo E. Los pares 26, 29, 32, 33, 34, presen-  
tan pignosis, en el cariotipo de la hembra.

GRUPO: 35-37.

No. 35-37. - Todos los acrocéntricos, más pequeños que los  
que integran el grupo F. Los pares 35, 37, presentan pigno-  
sis, en el cariotipo de la hembra.

GRUPO: 38.

No. 38. - Acrocéntrico más pequeño que los anteriores, este  
par se puso en un grupo aparte, por tener diferentes  
medidas y no encajar en ninguno de los grupos ante-  
riores.

GRUPO: 39.

No. 39. - El más pequeño de los acrocéntricos y el más peque-  
ño de todos los pares cromosómicos, por eso se le -

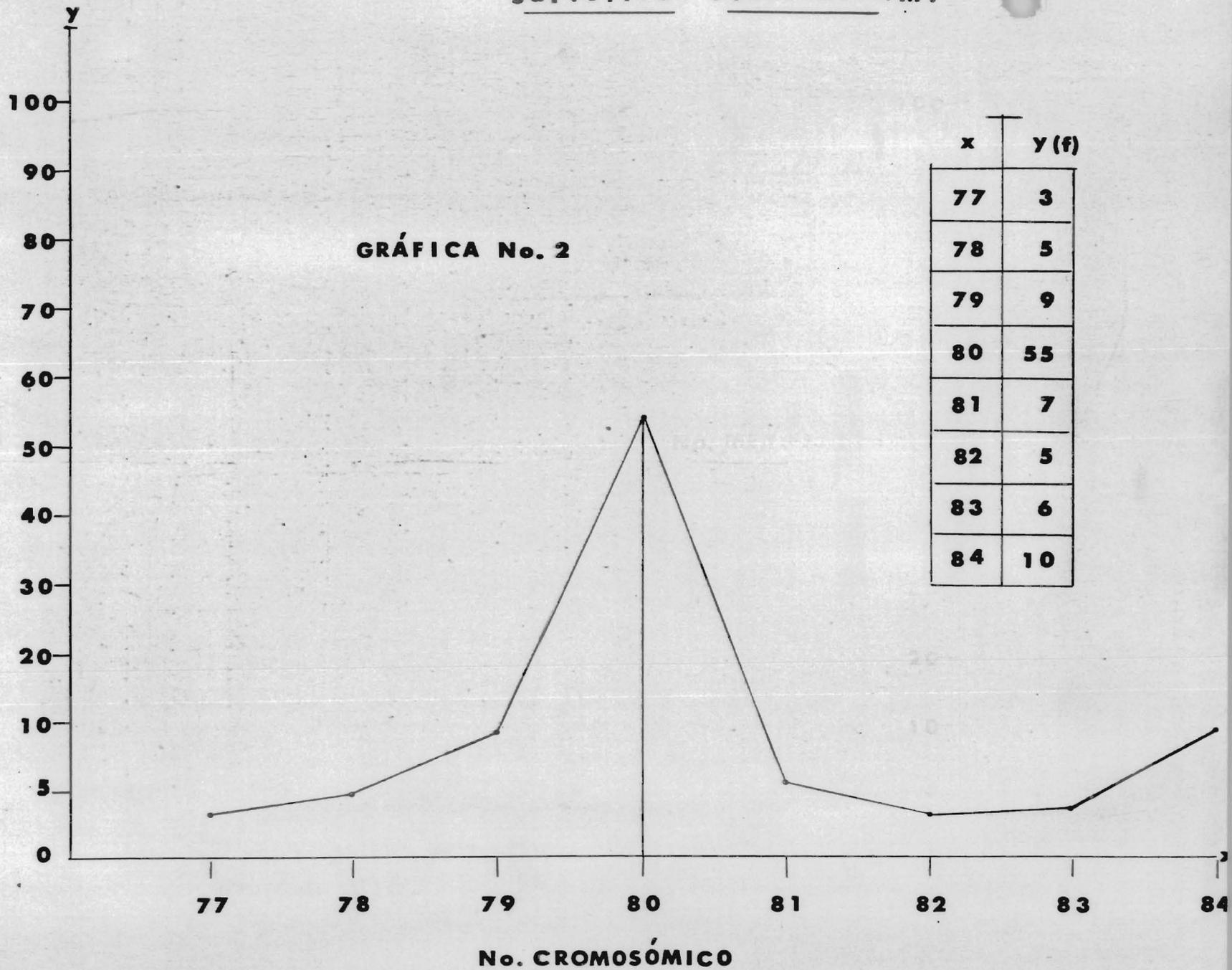
#..puso en un grupo aparte.

**Cromosomas impares:** corresponden a 1 grande metacéntrico y 1 mediano dicéntrico en la hembra - 1 mediano dicéntrico, y 1 pequeño acrocéntrico en el macho.

NÚMERO CROMOSÓMICO MODAL.  
Salvelinus fontinalis, M.

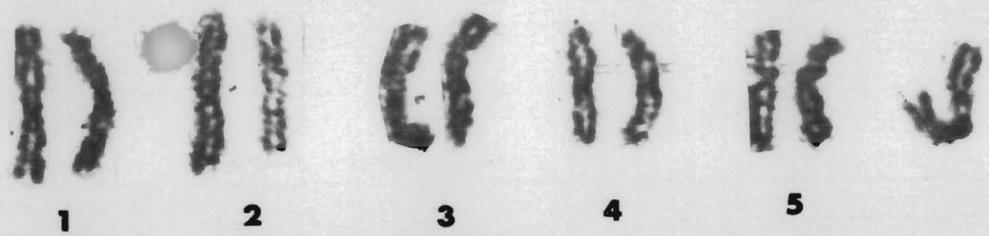
GRÁFICA No. 2

No. METAFASES



x	y (f)
77	3
78	5
79	9
80	55
81	7
82	5
83	6
84	10

No. CROMOSÓMICO



1 2 3 4 5

GRUPO A



6 7

GRUPO B



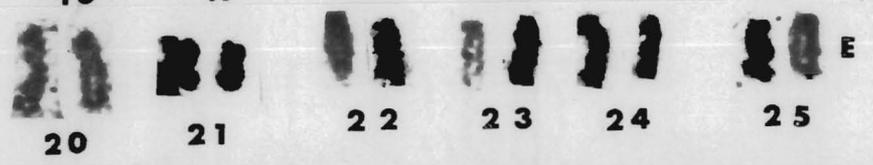
8 9 10 11 12 13 14 15

GRUPO C



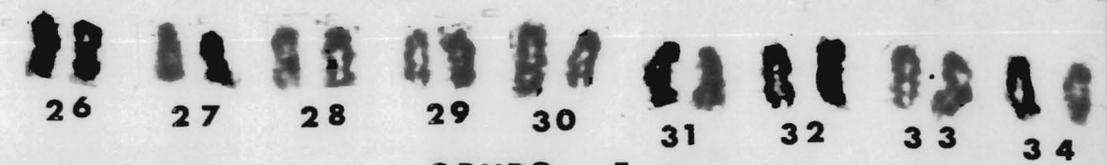
16 17 18 19

GRUPO D



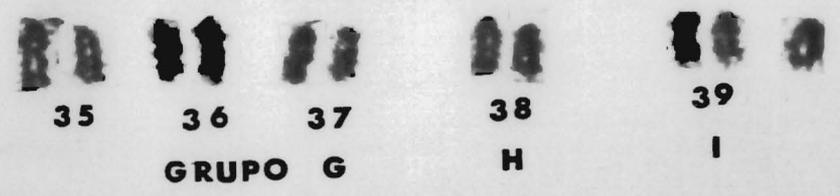
20 21 22 23 24 25

E



26 27 28 29 30 31 32 33 34

GRUPO F



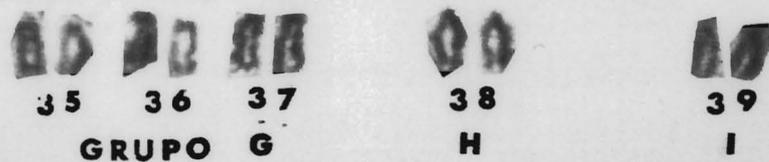
35 36 37 38 39

GRUPO G

H

I

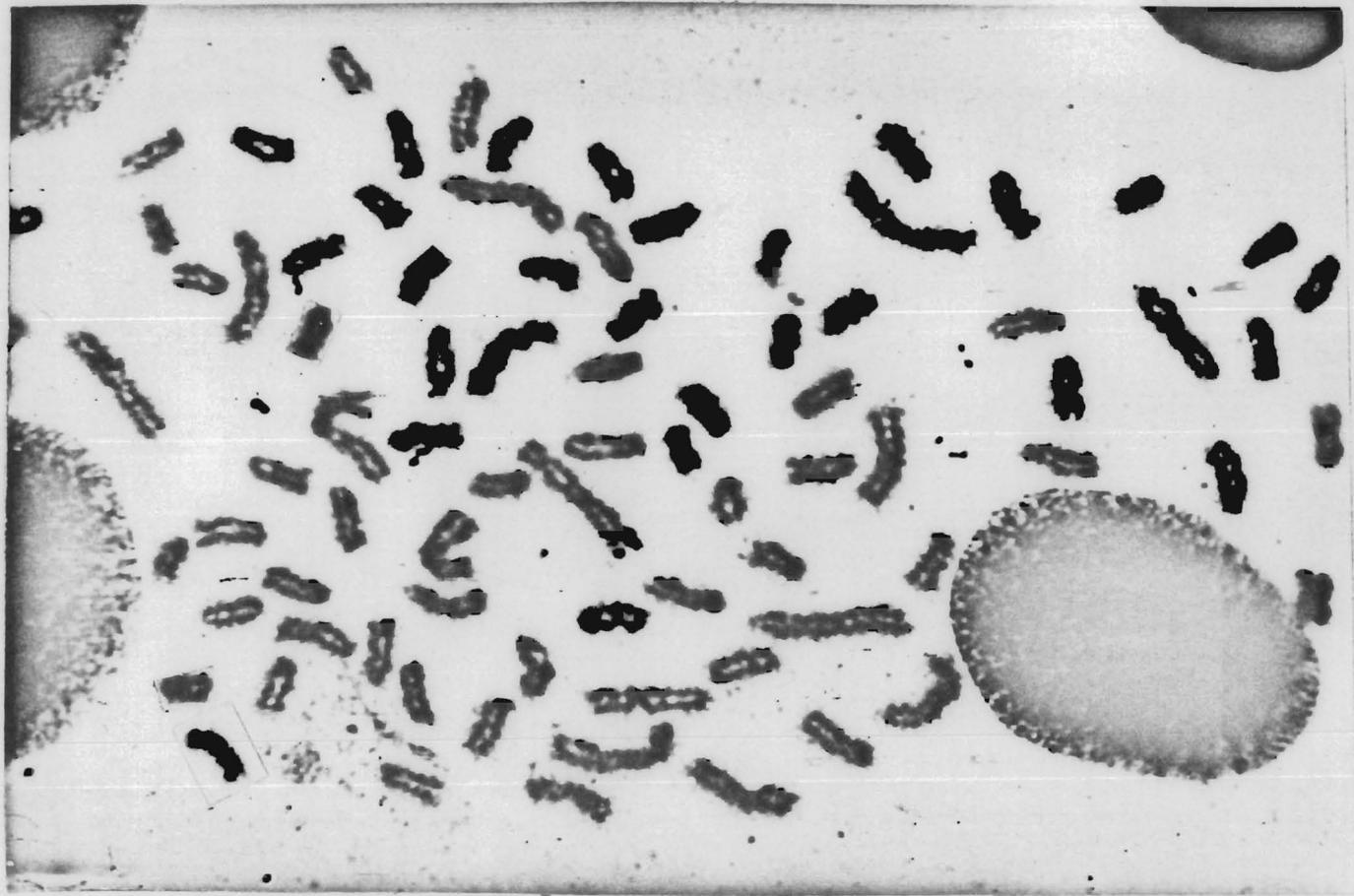
*Salvelinus fontinalis* Mitchell  
100x12.5x 2n 80 trucha de arroyo



♀

*Salvelinus fontinalis* Mitchell

100x 12.5x 2n 80 trucha de arroyo



Salvelinus fontinalis, Mitchell.

100x 12.5x

2n80

4

epitelio branquial.

"trucha de arroyo"

## D I S C U S I O N

Varios procedimientos para estudiar cromosomas en tejidos de peces, fueron empleados antes de definir el desarrollo de este trabajo. La mayor parte de las técnicas reportadas para peces se ensayó, sin llegar a resultados adecuados.

Esto, desde luego, obligó a efectuar la búsqueda de una técnica que permitiera encontrar todos los detalles que estos estudios requieren; afortunadamente, se logró integrar un procedimiento, que aunque sencillo en su ejecución, ha tomado muy en cuenta varias constantes biológicas.

A manera de establecer un parangón entre la nueva técnica establecida y las otras empleadas, se discuten los resultados obtenidos de cada una de ellas.

Así tenemos que la primera empleada fué la reportada por Ohno ( Ohno et al., 1965 ), recomienda el " squash " de pequeños fragmentos de órganos colchicinizados (hígado, bazo, gónadas, etc.), previa hidrólisis con ácido clorhídrico 1N, para teñir finalmente con la mezcla colorante de Giemsa.

Esta técnica se ensayó varias veces en el Laboratorio sin obtener ningún resultado. Se siguieron las indicaciones del autor con to

#. .da fidelidad (edad del huevo, alevino o juvenil, tiempo de colchicinización, etc.), pero no se logró obtener nada que pudiera indicar la presencia de cromosomas.

La técnica de la aceto-orceína, reportada por Kaufmann ---- ( Demeric y Faufmann, 1957 ), resulta excelente para tejidos vegetales, pero en este caso tampoco se obtuvieron resultados adecuados, - a pesar de que se lograron algunas metafases con cromosomas muy-juntos y distorsionados y en otros casos, muy separados y rotos.

Con la técnica de Mcphail y Jones, se hicieron varios ensayos en el Laboratorio con mejores resultados, nada más que se obtuvie--ron cromosomas distorsionados aunque fácilmente contables. La nueva técnica aquí introducida tomó de las de estos autores, como ya se-indicó, la colchicinización y la hipotonización.

La técnica lograda en nuestro laboratorio, elimina totalmente el " squash " y en su lugar, utiliza combustión para el rompimiento-celular. El tratar de esta manera a la célula tiene su ventaja, ya que, por una parte, la separación é individualización de los cuerpos cromáuticos es más precisa y por otra parte, al coagularse las proteínas celulares por la combustión, los cromosomas quedan fijos instantánea-mente en un sólo plano, lo que es de gran importancia, porque se evitan posibles aneuploidías tan comúnmente logradas por el " squash ",

#. . sobre todo cuando se trata de número diploide alto.

Ahora bien, en ninguna de las dos especies de truchas se han reportado cromosomas dicéntricos, lo que hace más interesante la investigación en el sentido de que hasta qué punto el tan discutido fenómeno de Robertson, sea un error de carácter técnico.

En el aspecto de los cromosomas sexuales, es importante -- mencionar lo encontrado, ya que tanto en el cariotipo de la hembra -- como en el del macho de las dos especies estudiadas, aparecen dos cromosomas que no hacen par con ningún otro, ni por su tamaño relativo, ni por su morfología, lo cual bien podría indicar, aunque con -- mucho margen de error, de que se tratan de los cromosomas sexuales. Habrá que programar más investigaciones en este aspecto.

Por otra parte, las dos especies de truchas estudiadas presentan enormes diferencias cariotípicas. Como puede apreciarse en los cariotipos construídos, la trucha "Arco-iris", presenta: 1 par de dicéntricos, 10 pares de metacéntricos, 9 pares de submetacéntricos, 9 pares de acrocéntricos, más dos cromosomas impares para cada -- sexo; en el macho, aparecen 1 metacéntrico pequeño y 1 acrocéntrico grande; en la hembra, aparecen 1 metacéntrico grande y 1 metacén--trico mediano.

En la trucha de arroyo encontramos: 1 par de dicéntricos, 3-

#..pares de metacéntricos, 5 pares de submetacéntricos, 30 pares de acrocéntricos, más dos cromosomas impares para cada sexo; en la hembra, un grande metacéntrico y 1 mediano dicéntrico; en el macho, encontramos 1 mediano dicéntrico y 1 pequeño acrocéntrico.

Es claro pues, que el cariotipo de la trucha "Arco-iris", es más heterogéneo que el de la de arroyo, lo cual posiblemente indique algún fenómeno evolutivo de especiación, ya que algunos autores denominan a el grupo a la cual la trucha "Arco-iris" pertenece, "complejo *Salmo gairdnerii*", por las subespecies que se han encontrado; este fenómeno bien podría tener un fundamento genético en cual estaría presente en la heterogeneidad del cariotipo de esta trucha.

No es difícil pues, que otras subespecies puedan presentar pequeñas diferencias cromosómicas, de la estudiada en este trabajo, -- aunque algunos autores como Needhan, crean que la existencia de estas subespecies son consecuencia de la influencia del medio, no es remota la posibilidad que acompañen a los cambios ambientales, modificaciones genéticas, que repercutan en la formación de dichas subespecies.

## C O N C L U S I O N E S

Algunas importantes conclusiones pueden derivarse de este trabajo, las más sobresalientes pueden ordenarse como sigue:

1. - Introducción de una nueva técnica para estudios de cromosomas en peces, utilizando el epitelio branquial, que por los resultados obtenidos, fué satisfactoria.

2. - Presencia en ambas especies de truchas, de cromosomas dicéntricos, que corresponden en las dos especies al primer par; ésto resulta interesante, porque en toda la Bibliografía que se consultó no se encuentran reportados.

3. - El número cromosómico diploide modal encontrado en las especies estudiadas, fué el siguiente:

<u>Salmo gairdnerii</u> R.	2n_60.
<u>Salvelinus fontinalis</u> M.	2n_80.

4. - Presencia de cromosomas impares en cada uno de los sexos de las especies estudiadas.

5. - Por los ensayos de técnica, por la presencia de dicéntricos y por el número cromosómico modal encontrado, habrá que estudiar el fenómeno de Robertson a nivel ontogenético, sostenido por algunos autores.

B I B L I O G R A F I A

1. - Wolf, Ken.  
1965, " Some Recent Developments and applica-  
tions of Fish Cell and Tissue Culture".  
The Progressive Fish-culturist. - Vol. -  
27. No. 2. P. 67-74, 5 L.
2. - De Buen, Fernando.  
1953, " Las Familias de Peces de Importancia -  
Económica ".  
Cursos de Capacitación Pesquera. FAO.  
No. 15460. P. 143-148.
3. - De Robertis, Nowinski,  
Sáes.  
1965, " Biología Celular ".  
Editorial El Ateneo. Cap. 13-18.  
P. 276-451.
4. - Jordan, D.S. Evermann, B.W.  
1963, " The Fishes of North and Middle América ".  
Bulletin of the United States.  
National Museum. No. 47. Vol. 1  
P. 497-500.
5. - Ohno, S.C. Stenius, E. Faisst and M.T. Zenzes.  
1965, " Post-zygotic Chromosomal rearrangement  
en rainbow trout ( Salmo iridius G. ) ".  
Cytogenetics, vol. 4. P. 117-129 6 L.

6. - Roberts, Franklin L.  
1967, " Chromosome Cytology of the Osteich--  
thyes ".  
The Progressive Fish-culturist. Vol. 29,  
No. 2. P. 75-83, 4 L.
7. - Simon, Raymond C.  
1964, " Fixation and Fat Extraction before Stai-  
ning and squashing for chromosomes of-  
fish embryo. "  
Stain Technology, Vol. 39. No. 1. P. --  
45-47. 1 L.
8. - Mcphail, J.D. Jones, R.L.  
1966, " A simple Technique for obtaining Chro-  
mosomes from teleost fishes".  
Journal Fisheries Board of Canada. Vol.  
23, No. 5. P. 767-768. 2 L.
9. - Swanson, Carl P. Mertz T. Young W. J.  
1967, " Cytogenetics ". Cap. 2. P. 19-46.  
Foundations of Moder Genetics Series.  
Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs,  
New Jersey. Cap. 2.
10. - Mckussiick, Victor A.  
1964, " Human Genetics ".  
Foundations of Modern Genetics Series.  
Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs,  
New Jersey. Cap. 2 P. 7-30. 19 L.

11. - Gray, Peter.  
1958, " Handbook of Basic Microtechnique ".  
Mcgraw-Hill Book Company, Inc.  
Cap. 4-13. P. 61-171.
12. - Hsu, T.C. and Zenzes, M.T.  
1964, " Mammalian Chromosomes In Vitro ----  
XVII. Idiogram of the Chinese Hamster ".  
Journal of the National Cancer Institute.  
P. 857-869. 2 L.

R E S U M E N

En este grabajo, se reporta la introducción de una nueva técnica para estudiar cromosomas en peces de agua dulce, utilizando el epitelio branquial; se reporta, además, el número cromosómico diploide modal de las dos especies de truchas seleccionadas (Salmo gairdnerii R. , y Salvelinus fontinalis M.), llegándose hasta la construcción de los respectivos cariotipos y la descripción de cada uno de los pares cromosómicos, en este punto, se encontraron cromosomas dicéntricos, metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos.

## I N D I C E

Introducción.	Pág.	1
Generalidades.	Pág.	11
Material y Métodos	Pág.	15
Resultados.	Pág.	28
Discusión.	Pág.	38
Conclusiones.	Pág.	42
Bibliografía.	Pág.	43
Resumen.	Pág.	46