

LA UTILIZACION DEL POLIMORFISMO PARA LA HETEROCROMATINA
CONSTITUTIVA EN EL ANALISIS DEL COMPORTAMIENTO CROMOSOMICO
EN MEIOSIS.

Giráldez, R.

Departamento de Genética, Universidad de Oviedo.

Sin duda, desde el punto de vista genético, los tres fenómenos más importantes que tienen lugar en meiosis son el apareamiento, el sobrecruzamiento y la coorientación. Ellos determinan la formación de nuevas combinaciones genéticas y la reducción del número de cromosomas en los gametos.

Se sabe desde hace ya tiempo que los tres fenómenos se suceden en este orden y que cada uno de ellos determina en cierto modo el normal funcionamiento del que le sigue. Es necesario el apareamiento para que se produzca el sobrecruzamiento y probablemente, la existencia de quiasmas es una condición suficiente (aunque quizá no necesaria) para el mantenimiento de la unión entre los cromosomas que forman un bivalente en metafase I, lo que, a su vez, es fundamental para que tenga lugar la coorientación.

En el estudio de estos procesos, los resultados obtenidos con el enfoque citológico, es decir, a partir de su observación directa, serán más amplios cuanto mayor sea la capacidad de distinguir detalles en los cromosomas.

Las técnicas de bandeo ofrecen esta posibilidad. Aunque todo depende, en gran medida, del material en estudio, las técnicas de bandeo permiten distinguir al microscopio en muchas ocasiones los dos genomios presentes en un híbrido, los distintos pares de homólogos dentro de un mismo genomio,

los dos cromosomas homólogos dentro de un mismo par, los dos brazos de un cromosoma metacéntrico e incluso, empleando técnicas de bromosustitución, las dos cromátidas dentro del mismo cromosoma. Estas técnicas han revitalizado la Citogenética clásica permitiendo el estudio de viejos problemas con una nueva visión.

En concreto, la técnica de bandeo C hace que la heterocromatina constitutiva se tiña de forma más oscura que la eucromatina. La heterocromatina-C suele estar dispuesta en bloques o bandas más o menos grandes y eso permite distinguir, en determinadas ocasiones, unos cromosomas de otros dentro del genomio. Sin embargo, el patrón de bandeo que presentan los cromosomas con esta técnica no es muy rico en detalles. Las bandas de heterocromatina-C suelen ser escasas y muchas veces varios pares de cromosomas homólogos presentan el mismo patrón de bandeo. Además, en la mayor parte de las especies estudiadas hasta ahora, existe polimorfismo para la cantidad de heterocromatina-C presente en determinadas bandas. Para un mismo cromosoma pueden existir distintos patrones de bandeo-C, e incluso puede darse el caso de que dos cromosomas no homólogos sean más parecidos entre sí que dos homólogos. Todo esto hace que la técnica de bandeo-C no sea excesivamente eficaz en la elaboración de cariotipos a partir de cromosomas en mitosis. Sin embargo, la existencia de polimorfismo supone una gran ventaja en el estudio del comportamiento cromosómico en meiosis ya que permite distinguir citológicamente un cromosoma de su homólogo.

El objeto de estas páginas es el mostrar algunos ejemplos obtenidos en saltamontes y en centeno, de cómo el polimorfismo para la heterocromatina constitutiva puede servir

para estudiar determinados aspectos del apareamiento, el sobrecruzamiento y la coorientación.

1.- Apareamiento

En un organismo diploide y en situación normal, el apareamiento se produce exclusivamente entre cromosomas homólogos. Sin embargo, cuando se produce variación en el cariotipo la situación puede cambiar.

Teniendo en cuenta el grado de parecido de los cromosomas que intervienen en el apareamiento, se pueden considerar el apareamiento no-homólogo (producido, por ejemplo, en ciertos haploides), el apareamiento homeólogo (producido en híbridos entre especies afines), además del apareamiento homólogo mencionado anteriormente.

Ahora bien, dentro de la homología, los cromosomas pueden mostrar diferente grado de parecido, desde la identidad total (equiparable al grado de parecido de cromátidas hermanas) hasta las diferencias más o menos grandes que se hayan ido acumulando tras sucesivas mutaciones y que, en principio pudieran haber afectado a cualquier secuencia dentro del cromosoma.

La pregunta que cabe plantearse en este punto es ¿Existen diferencias en el apareamiento entre estos distintos tipos de cromosomas homólogos? o bien ¿Hasta que punto el apareamiento entre cromosomas homólogos depende del grado de parecido de los cromosomas que participan en él?

Una posible forma de intentar contestar estas preguntas se basa en el estudio de la competencia en el apareamiento en situaciones especiales. Esta competencia podrá

establecerse si un determinado cromosoma o segmento cromosómico está presente en más de dos dosis dentro de una célula, de tal forma que existan diferencias en el grado de parecido entre las distintas dosis. La técnica de bandeo-C puede permitir el reconocimiento citológico de los distintos cromosomas en competencia, haciendo posible tal estudio.

Uno de los casos en los que puede encontrarse este tipo de situación es en células autoploiploides que hayan surgido a partir de células diploides normales (mosaicos diploide-tetraploide espontáneos o, en el caso de las plantas, inducidos mediante tratamiento con colchicina).

La figura 1 muestra un ejemplo en un mosaico diploide-tetraploide en el saltamontes *Euchorthippus pulvinatus gallicus* (Giraldez & Santos, 1981).

A partir de un par de cromosomas homólogos A y A' de una célula diploide, se formará un grupo de cuatro cromosomas en la tetraploidización de dicha célula. Este grupo de cuatro cromosomas (A A A' A') estará formado por dos pares de cromosomas idénticos, siendo homología la relación existente entre miembros de distinto par. Si estas células tetraploides entran en meiosis, para cada uno de los grupos de cuatro cromosomas presentes podrán distinguirse dos tipos de apareamiento: entre cromosomas idénticos (A-A y/o A'-A') y entre cromosomas homólogos (A-A').

Los datos obtenidos en este tipo de estudios en mosaicos $2n-4n$ de saltamontes (Giraldez & Santos, 1981; Santos, Orellana & Giraldez, 1983) indican una preferencia del apareamiento idéntico frente a lo esperado en el supuesto de apareamiento al azar. Sin embargo, en mosaicos diploide-tetraploide de centeno la situación es algo más complicada

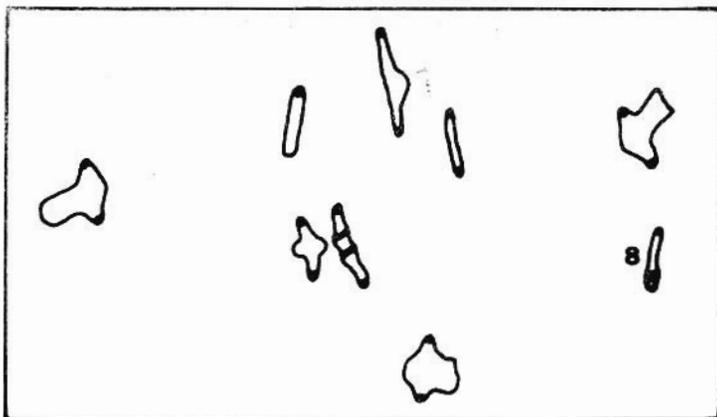


Figura 1a.- Célula diploide en metafase I de un individuo mosaico diploide-tetraploide de *Euchorhippus pulvinatus*. Los dos cromosomas que forman el bivalente 8 muestran diferente patrón de bandeado-C.

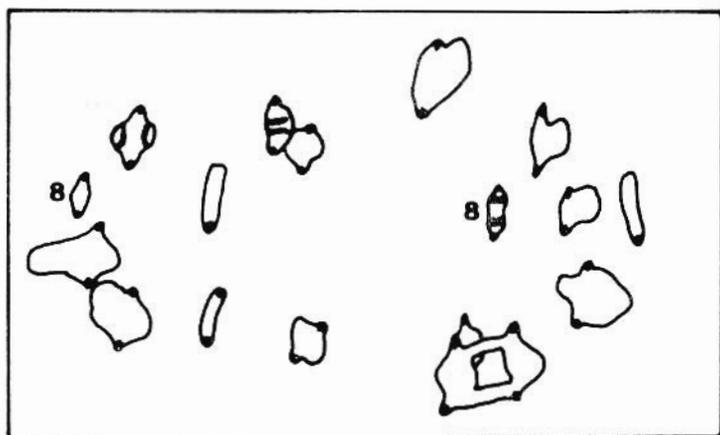


Figura 1b.- Célula tetraploide en metafase I del mismo individuo. Los cuatro cromosomas 8 presentes muestran apareamiento entre cromosomas idénticos.

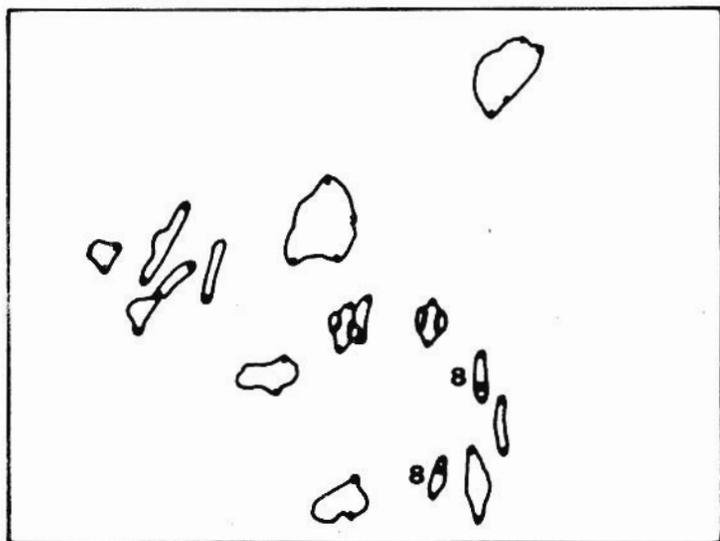


Figura 1c.- Célula tetraploide en metafase I del mismo individuo. Los cuatro cromosomas 8 presentes muestran apareamiento entre cromosomas homólogos.

ya que existe variación entre plantas e incluso entre cromosomas dentro de una misma planta (Santos, Orellana & Giraldez, 1983). En unos casos se observa un exceso de apareamiento homólogo, mientras que en otros el apareamiento parece producirse al azar.

Otro caso en el que puede estudiarse la competencia en el apareamiento entre distintos segmentos cromosómicos dentro de la homología se presenta en los heterocigotos para duplicaciones que aparecen en la descendencia de heterocigotos para determinadas translocaciones.

La translocación 242 del 'Wageningen Tester Set' (Sybenga & Wolters, 1972) afecta a los cromosomas 2R y 6R del centeno y parece ser no-recíproca. En la descendencia por autofecundación de heterocigotos para esta translocación aparecen, entre otros, individuos que contienen tres dosis del segmento translocado (Figura 2).

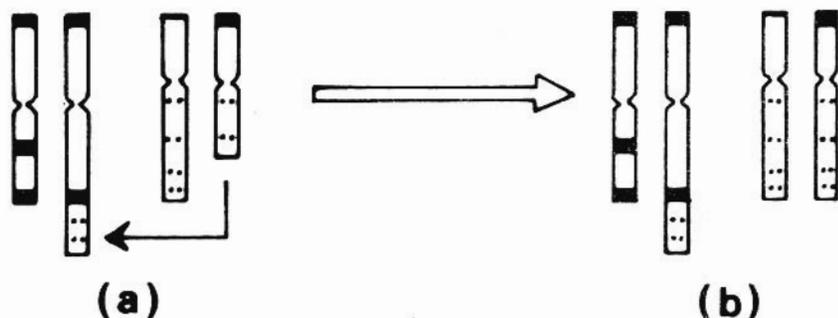


Figura 2.- (a) Heterocigoto para la translocación 242 en el centeno. (b) Plantas con tres dosis del segmento translocado obtenidas en la descendencia por autofecundación de heterocigotos para la translocación 242. En ambos casos las plantas son heterocigotas para dos bandas de heterocromatina-C, una de ellas en el telómero del brazo corto del cromosoma 6R y la otra situada intersticialmente en el brazo largo del cromosoma 2R.

Utilizando como marcadores las bandas de heterocromatina constitutiva que muestran polimorfismo, pueden distinguirse citológicamente los tres cromosomas portadores del segmento translocado que, en estos individuos, está en dosis triple y, por tanto, puede analizarse la frecuencia con la que se producen los tres tipos posibles de apareamiento.

Los dos ejemplos presentados (autotetraploides y heterocigotos para duplicaciones) son dos de las muchas situaciones (triploides, Benavente & Orellana, 1984; trisómicos, etc.) en las que el polimorfismo para la heterocromatina constitutiva permite analizar el problema de la competencia en el apareamiento entre cromosomas cuyo grado de parecido es más o menos grande dentro de la homología.

2.- Sobrecruzamiento

2.1.- Frecuencia

En los Ortópteros, la frecuencia de sobrecruzamiento puede ser estimada con suficiente fiabilidad a partir de células en diplotena. En estos organismos la presencia de bandas de heterocromatina constitutiva que muestren polimorfismo puede ser útil en la delimitación de diferentes segmentos dentro de un mismo brazo cromosómico pero no ayuda especialmente en la determinación de la frecuencia de sobrecruzamiento.

Sin embargo, en la mayor parte de los organismos la situación no es tan favorable. El centeno es uno de estos organismos en los que el número de quiasmas no puede determinarse en diplotena. Las observaciones se realizan, normalmente, en metafase I, y sólo puede apreciarse la existencia de uniones entre brazos cromosómicos en esta fase. Cada unión supondría, en principio, la existencia de al menos un sobrecruzamiento

en dicho brazo, no pudiéndose determinar con exactitud el número de sobrecruzamientos producidos.

El polimorfismo para la heterocromatina constitutiva puede ser utilizado con este objetivo. Si un par de cromosomas homólogos muestra heterocigosis para una banda de heterocromatina C, podrán aparecer células en anafase I con cromosomas que muestren evidencia de recombinación entre la banda C y el centrómero (cromosomas con una de sus cromátidas con la banda y la otra cromátida sin ella) y células con cromosomas de tipo parental (con las dos cromátidas iguales) que no muestran evidencia de recombinación.

Las frecuencias de cromosomas recombinantes y parentales en anafase I dependerán de las frecuencias de 0 (f_0), 1 (f_1), 2 (f_2), etc. sobrecruzamientos producidos entre la banda C y el centrómero (figura 3).

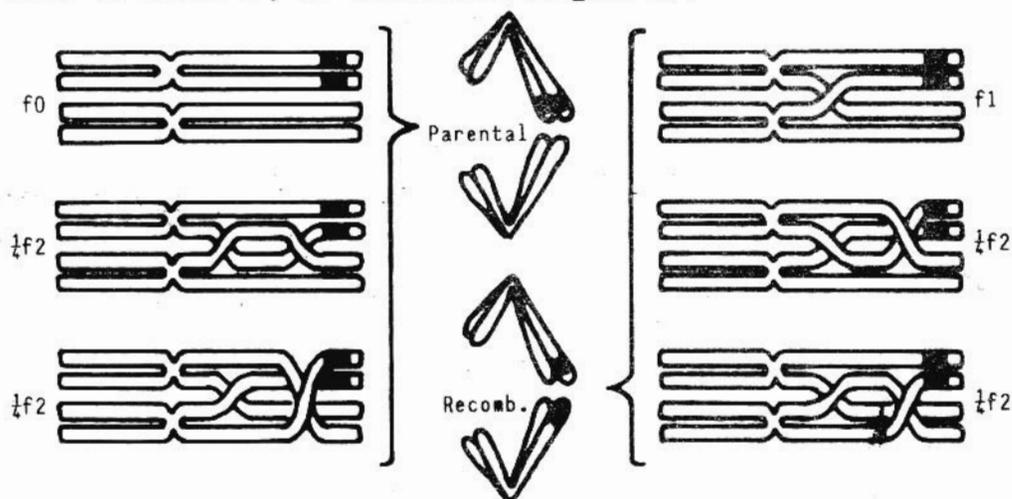


Figura 3.- La aparición de células en anafase I con cromosomas recombinantes y parentales en función del número de sobrecruzamientos producidos entre la banda de heterocromatina y el centrómero, así como de las cromátidas implicadas en tales sobrecruzamientos.

Si se producen un máximo de n sobrecruzamientos entre la banda de heterocromatina y el centrómero, las frecuencias de células anafásicas con cromosomas parentales (F_p) y recombinantes (F_r) serán (Mather, 1935):

$$F_p = f_0 + 1/2 f_2 + 1/3 f_3 + \dots + 1/3 (1 - (-1/2)^{n-1}) f_n$$

$$F_r = f_1 + 1/2 f_2 + 3/4 f_3 + \dots + 2/3 (1 - (-1/2)^n) f_n$$

Si se supone un máximo de dos sobrecruzamientos las ecuaciones se reducen a:

$$F_p = f_0 + 1/2 f_2$$

$$F_r = f_1 + 1/2 f_2$$

y los valores de f_1 y f_2 pueden estimarse, ya que f_0 es la frecuencia con la que los correspondientes segmentos cromosómicos no están unidos en metafase I y F_p y F_r pueden estimarse a partir de las observaciones en anafase I.

El método ha sido aplicado en diferentes situaciones como son las F_1 entre líneas consanguíneas (Giraldez & Orellana, 1979), o los cultivares de centeno (Orellana & Giraldez, 1981), en las que se ha podido deducir una frecuencia de dobles sobrecruzamientos relativamente elevada en determinados brazos o segmentos cromosómicos, mientras que para otros brazos específicos una unión en metafase I es el resultado de un sólo sobrecruzamiento. Por otra parte, en plantas con desinapsis (Orellana & Giraldez, 1983; Cermeño, Orellana & Lacadena, 1984), o en híbridos Triticale-centeno (Orellana & Giraldez, 1984) el exceso de células anafásicas con cromosomas parentales observado pone de manifiesto la existencia de

uniones no quiasmáticas en metafase I. Este hecho supondría que, en el centeno (como ocurre en organismos aquiasmáticos), la existencia de quiasmas no sería imprescindible para el mantenimiento de la unión entre los cromosomas que forman un bivalente en metafase I.

La frecuencia de sobrecruzamiento puede modificarse con la existencia de cambios estructurales. En la mayor parte de las translocaciones en el centeno, la frecuencia de quiasmas en los segmentos intersticiales del cuadrivalente que forman los heterocigotos (es decir, en los segmentos comprendidos entre los centrómeros y el punto de translocación) suele ser muy baja o incluso nula. Sin embargo este no es un hecho general. En la figura 4 aparecen algunos ejemplos de células anafásicas observadas en heterocigotos para la translocación 242 del centeno cuyas características aparecen en la figura 2a. En este caso, la existencia de heterocigosis para una banda de heterocromatina intersticial en el cromosoma 2R (además de la heterocigosis para la translocación) permite demostrar citológicamente la existencia de dobles sobrecruzamientos en dos segmentos diferentes situados entre el centrómero del cromosoma 2R y el punto de translocación (Goicoechea, 1985). La frecuencia de dobles sobrecruzamientos entre la banda-C intersticial y el punto de translocación resultó ser alrededor del 20%, coincidiendo las estimaciones de la frecuencia global de sobrecruzamiento con lo esperado a partir de la fracción de recombinación observada en la descendencia.

2.2.- Terminalización de quiasmas.

La existencia de terminalización de quiasmas es otro de los fenómenos que podría, en principio, ser detectado mediante la utilización del polimorfismo para la heterocromatina constitutiva.

Si un par de cromosomas muestra heterocigosis para una banda de heterocromatina intersticial y se forma un quiasma entre la banda y el centrómero, las figuras que ese bivalente originará en metafase I dependerán de la existencia de terminalización (figura 5).

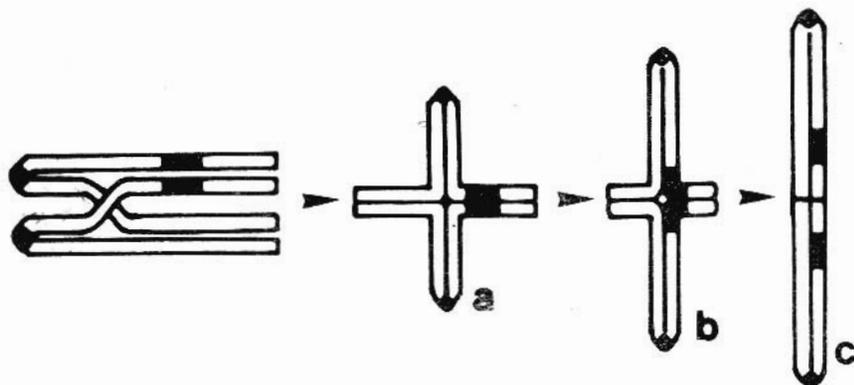
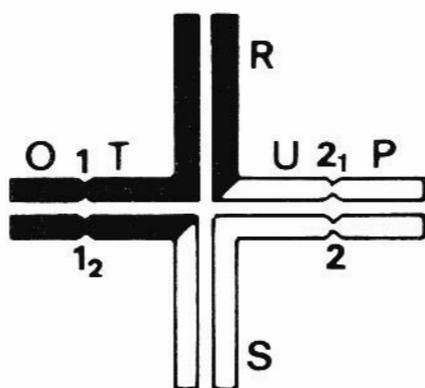


Figura 5.- Si existiese terminalización de quiasmas, podrían observarse en metafase I las figuras (b) y (c) originadas por un bivalente heterocigoto para una banda de heterocromatina intersticial en el que se hubiera formado un quiasma entre la banda y el centrómero. Sólo sería observada la figura (a) (además de las figuras resultado de un quiasma distal) si la terminalización no fuera posible.

Los datos obtenidos en *Chorthippus biguttulus* (Santos & Giraldez, 1978) y en el centeno (Orellana & Giraldez, 1981) parecen estar en contra de la existencia de terminalización, al menos a través de las correspondientes bandas de heterocromatina intersticial con las que se hicieron los dos estudios.

3.- Coorientación

Los cuatro cromosomas implicados en una translocación recíproca en heterocigosis forman en paquitena la cruz que se representa en la figura.



Los segmentos O, P, R, S, T y U pueden tener mayor o menor longitud e incluso faltar por completo dependiendo de que la translocación afecte a un brazo completo (faltarían los segmentos intersticiales T y/o U), la translocación sea no-recíproca (faltaría el segmento R o el S), o bien de que los cromosomas implicados

sean o no telocéntricos (faltarían los segmentos O y/o P).

Básicamente, en coorientaciones 2:2, los cuatro centrómeros (1, 2, 1₂ y 2₁) del cuadrivalente formado en un heterocigoto para una translocación pueden orientarse hacia los polos de tres formas distintas:

Adyacente I:	$\frac{1 \quad 2_1}{1_2 \quad 2}$	(centrómeros homólogos hacia polos opuestos; centrómeros de los dos cromosomas no implicados en la translocación hacia polos opuestos)
Adyacente II:	$\frac{1 \quad 1_2}{2 \quad 2_1}$	(centrómeros homólogos hacia el mismo polo)
Alternada:	$\frac{1 \quad 2}{1_2 \quad 2_1}$	(centrómeros homólogos hacia polos opuestos; centrómeros de los dos cromosomas no implicados en la translocación hacia el mismo polo)

Al margen de la polémica sobre la existencia o no de más de un tipo de coorientación alternada (revisión por Rickards, 1983), si no se produce sobrecruzamiento en los segmentos T y U, es posible en muchas ocasiones distinguir citológicamente los tres tipos de coorientación incluso utilizando técnicas de tinción tradicionales.

Los resultados obtenidos en cuanto a las frecuencias de los distintos tipos de coorientación, en estos casos, suelen mostrar un exceso de coorientaciones alternadas frente al tercio esperado si la coorientación se produjese al azar.

Ahora bien, cuando se producen quiasmas en los segmentos intersticiales T y/o U no es posible distinguir citológicamente las coorientaciones adyacente I y alternada con métodos de tinción tradicionales, si bien los resultados en cuanto a la segregación de marcadores genéticos sugiere que, en estos casos, adyacente I y alternada se producen con frecuencias relativas 1:1, no originándose en ningún caso la coorientación adyacente II (de Vries, 1983).

La figura 6 muestra las dos posibilidades observadas en cuadrivalentes de este tipo. Los datos obtenidos (Goicoechea, 1985) concuerdan con los resultados del análisis genético en otras translocaciones: adyacente I, adyacente II y alternada se producen con frecuencias relativas 1:0:1 cuando el cuadrivalente contiene quiasmas intersticiales.

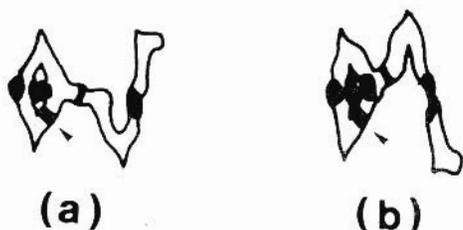


Figura 6.- Cuadrivalentes en metafase I en una planta heterocigótica para la translocación 242 y para una banda intersticial en el brazo largo del cromosoma 2R (flechas). Los segmentos cromosómicos O, T2, S y P están unidos (véase figura de la página anterior).
 (a) Coorientación alternada.
 (b) Coorientación adyacente I.

BIBLIOGRAFIA

- BENAVENTE, E. y ORELLANA, J. 1984. Meiotic pairing of specific chromosome arms in triploid rye. Can. J. Genet. Cytol. 26, 717-722
- CERMEÑO, M.C., ORELLANA, J. y LACADENA, J.R. 1984. Evidence of non-chiasmate bonds at metaphase I in inbred rye. Can. J. Genet. Cytol. 26, 409-414
- GIRALDEZ, R. y ORELLANA, J. 1979. Metaphase I bonds, crossing over frequency and genetic length of specific chromosome arms of rye. Chromosoma (Berl.) 72, 377-385
- GIRALDEZ, R. y SANTOS, J.L. 1981. Cytological evidence for preferences of identical over homologous but not identical meiotic pairing. Chromosoma (Berl.) 82, 447-451

- GOICOECHEA, P.G. 1985. Análisis del comportamiento meiótico y la transmisión de un heterocigoto para una translocación en el centeno. Tesina de Licenciatura, Facultad de Biología, Universidad de Oviedo.
- MATHER, K. 1935. Reductional and equational separation of the chromosomes in bivalents and multivalents. J. Genet. 30, 53-78
- ORELLANA, J. y GIRALDEZ, R. 1981. Metaphase I bound arms and crossing over frequency in rye. I. Open pollinated varieties. Chromosoma (Berl.) 84, 439-449
- ORELLANA, J. y GIRALDEZ, R. 1983. Metaphase I bound arms and crossing over frequency in rye. III. Non chiasmate bonds in desynaptic plants. Heredity 51, 383-394
- ORELLANA, J. y GIRALDEZ, R. 1984. Metaphase I bound arms and crossing over frequency in rye. IV. Triticale-rye hybrids. Heredity 52, 265-271
- RICKARDS, G.K. 1983. Orientation behaviour of chromosome multiples of interchange (reciprocal translocation) heterozygotes. Ann. Rev. Genet. 17, 443-498
- SANTOS, J.L. y GIRALDEZ, R. 1978. The effect of C-heterochromatin in chiasma terminalisation in *Chorthippus biguttulus* L. (Acrididae; Orthoptera). Chromosoma (Berl.) 70, 59-66
- SANTOS, J.L., ORELLANA, J. y GIRALDEZ, R. 1983. Pairing competition between identical and homologous chromosomes in rye and grasshoppers. Genetics 104, 677-684
- SYBENGA, J. y WOLTERS, A.H.G. 1972. The classification of the chromosomes of rye (*Secale cereale* L.): A translocation tester set. Genetica 43, 453-464

VRIES, J.N. de 1983. High recombination between the breakpoint of a reciprocal translocation in rye (*Secale cereale* L.) and an interstitially located gene. Theor. Appl. Genet. 66, 329-339

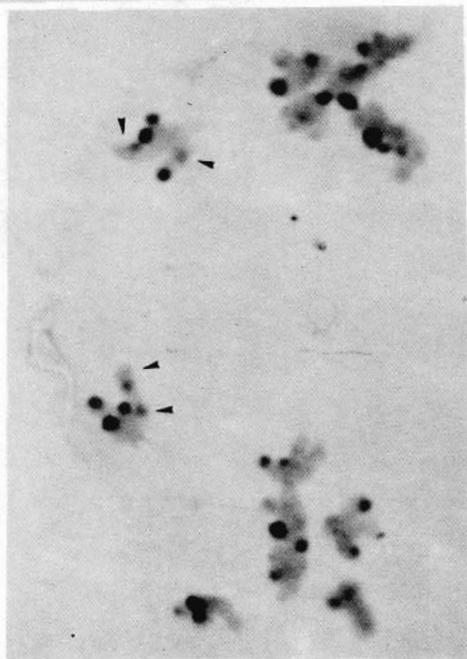
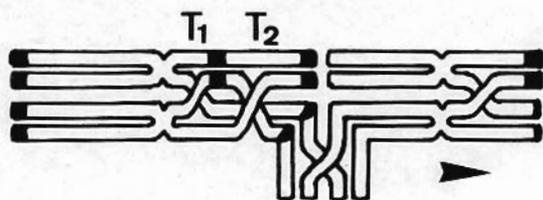
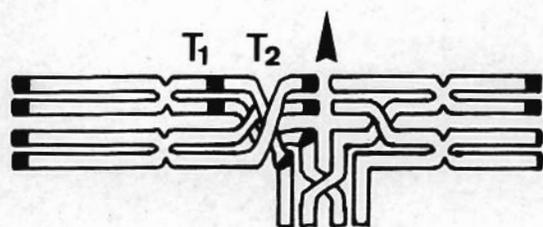
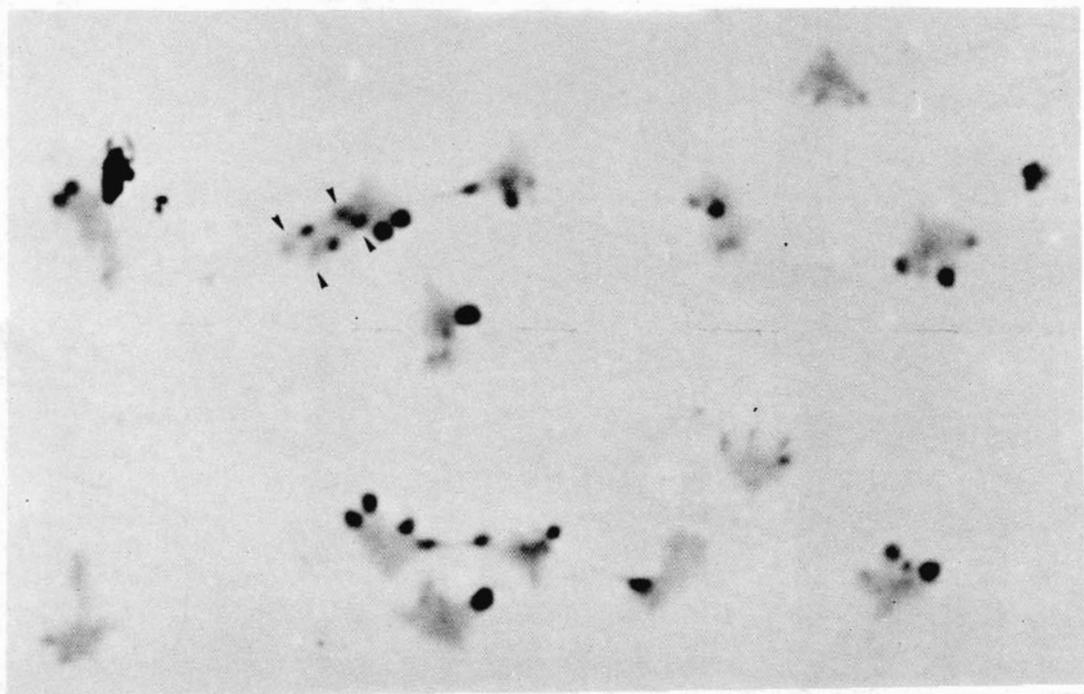


Figura 4.- Células en anafase I observadas en el heterocigoto para la translocación 242 (véase figura 2a) y número mínimo de quiasmas en los segmentos T1 y T2 necesarios para su aparición.