

# Aplicación de la nigrosina acética al estudio de los cromocentros salivales

por

**RAMÓN PARÉS FARRÁS**

(Laboratorio de Histología, Barcelona)

Estados a los cromocentros, constituido por un cuerpo especial denominado cromocentro. Con un estudio de todas las especies estudiadas en el presente trabajo.

Las regiones en el estudio de que se trata son heterocromáticas con la cromatina o el equivalente, durante la interfase de la mitosis.

No toda la heterocromatina se halla incluida en el cromocentro. En la mayor parte de las cromosomas de las especies de *Drosophila* parece probable que haya segmentos cortos heterocromáticos en los extremos distales e incluso intermedios (Papanicolaou-Bancroft, 1937-1938). En *D. virilis*, Liang (1934) pudo establecer la distinción entre dos tipos distintos de heterocromatina: 1) heterocromatina compacta y no desarrollada, 2) heterocromatina desarrollada y difusa.

En las cromosomas salivales, las longitudes de las zonas heterocromáticas son relativamente menores que en los cromosomas mitóticos. Así, en *D. melanogaster*, la porción heterocromática del cromosoma X en la interfase constituye una tercera parte del total, mientras que en las glándulas salivales es tan sólo una décima parte (Muller, Papanicolaou-Bancroft, 1937). En el cromosoma II, una porción comprendida entre el centromero y la nucleación secundaria queda reducida a una sola banda en las glándulas salivales (Harris, 1937). Si el estrechamiento de los cromosomas salivales se debe a un proceso de desorganización, las porciones heterocromáticas no se desorganizarán o lo harán incompletamente.

La heterocromatina extra-nuclear se muestra con configuración en bandas definidas, cromosomas mayores e intermedios más o

## INTRODUCCIÓN

Uno de los fenómenos más característicos de los cromosomas salivales de *Drosophila* es el de estar fusionados en las regiones inmediatas a los centrómeros, constituyendo un cuerpo especial denominado *cromocentro*. Con un corto número de excepciones, todas las especies estudiadas presentan cromocentro.

Las regiones que rodean a los centrómeros son heterocromáticas, en el sentido de que presentan heteropiconosis con la orceína o el carmín, durante la profase de la mitosis.

No toda la heterocromatina se halla incluida en el cromocentro. En la mayor parte de los cromosomas de las especies de *Drosophila* parece probable que haya segmentos cortos heterocromáticos en los extremos distales e incluso intercalados (PROKOFIEVA-BELGOWSKAYA, 1937-1938). En *D. virilis*, HEITZ (1934) pudo establecer la distinción entre dos tipos distintos de heterocromatina: 1)  $\alpha$ -heterocromatina, compacta y no desarrollada; 2)  $\beta$ -heterocromatina, desarrollada y difusa.

En los cromosomas salivales, las longitudes de las zonas heterocromáticas son relativamente menores que en los cromosomas mitóticos. Así, en *D. melanogaster*, la porción heterocromática del cromosoma X en la mitosis constituye una tercera parte del total, mientras que en las glándulas salivales es tan sólo una décima parte (MÜLLER, PROKOFIEVA-BELGOWSKAYA, 1935). En el cromosoma II, una porción comprendida entre el centrómero y la constricción secundaria queda reducida a una sola banda en las glándulas salivales (HINTON, 1942). Si el estiramiento de los cromosomas salivales se debe a un proceso de desespiralización, las porciones heterocromáticas no se desespiralizan o lo hacen incompletamente.

La heterocromatina extracromocéntrica no muestra una configuración en bandas definidas; cromómeros mayores y dispuestos más o

menos irregularmente aparecen sobre un fondo difusamente teñido con el carmín o la orceína.

La estructura de la heterocromatina cromocéntrica es poco conocida. Los métodos antes mencionados, que son los que se utilizan mayormente, la ponen de manifiesto de un modo difuso e indiferenciado. En *D. melanogaster*, separando por presión las porciones incluidas en el cromocentro, aparece una estructura muy regular y más o menos parecida a la de las zonas eucromáticas (PROKOFIEVA-BELGOWSKAYA, 1935).

Con el método de la nigrosina acética (PARÉS, 1953) el cromocentro no aparece como una masa indiferenciada, sino como una estructura definida y dotada de cierta especificidad. Este resultado tiene, además, el interés de esclarecer algunos aspectos del problema general de la heterocromatina de los salivales.

#### TÉCNICA

A) *Nigrosina acética*. — La nigrosina se obtiene en forma de clorhidrato o nigrosina soluble al alcohol, como base libre o nigrosina soluble a la grasa y como nigrosina sulfonada o soluble al agua. La soluble al alcohol es la utilizada para la tinción de los cromosomas. Con este fin fué introducida por GÖSTA v. ROSEN en 1946, como colorante acético. Desde entonces en Suecia viene utilizándose en gran escala para recuentos cromosómicos en vegetales, pero, al parecer, no había sido empleada en estudios de cromosomas salivales.

La nigrosina soluble al alcohol es expandida por I. G. FARBENINDUSTRIE (Alemania), A. B. KEBO (Suecia) y EDWARD GURR (Inglaterra). En el presente trabajo se ha utilizado la de esta última procedencia.

Como sucede con los demás colorantes acéticos, para conseguir resultados correctos y constantes se requiere preparar escrupulosamente la solución de nigrosina. Puede seguirse la siguiente fórmula:

Ácido acético glacial . . . . .	50 cc.
Agua destilada. . . . .	50 cc.
Nigrosina soluble al alcohol. . . . .	4 g.

La mezcla de los componentes se hierve suavemente a reflujo hasta disolución completa, y, una vez fría o enfriada, se filtra. La disolución se realiza en quince o veinte minutos, un tiempo muy inferior al necesario para preparar carmín u orceína.

La solución colorante debe madurar en la obscuridad o en frasco

topacio, durante unas dos semanas antes de que pueda ser utilizada. Conservadas en la nevera o en un lugar fresco, las soluciones de nigrosina tienen una vida muy prolongada.

A continuación se indica esquemáticamente el proceder según el cual se han llevado a cabo las preparaciones de los salivales:

a) Disección de las glándulas salivales en ácido acético al 45 por 100. Cuando se tienen aisladas, se eliminan los restos de la larva y el exceso de acético mediante un papel de filtro.

b) Alcohol clorhídrico (ClH conc. y alcohol de 95 por 100, 1:2) durante uno o dos minutos, cuidando que el material esté siempre bien cubierto, puesto que el contacto con el aire disgrega los cromosomas.

c) Lavado rápido con agua destilada dos o tres veces. Luego dejar una gruesa gota de agua sobre el material durante unos cinco minutos.

d) Se escurre completamente el agua. Colocar una gota de colorante, el cubre y, finalmente, aplastar suavemente con la punta de una aguja. A continuación, levantar un poco el cubre por uno de sus vértices mediante la aguja, para que el colorante bañe completamente al material.

e) A los diez o quince minutos, aplastar definitivamente y colocar una gruesa gota de glicerina sobre uno de los bordes del cubre.

f) La preparación puede estudiarse inmediatamente, pero a las veinticuatro horas, cuando la glicerina ha penetrado por completo, conviene eliminar el líquido sobrante y bordear con cera.

Manejándose con cuidado, las preparaciones así obtenidas duran largo tiempo.

B) *Orceína acética*. — Conjuntamente con los ensayos de la nigrosina se ha llevado un control de los resultados con el clásico método de la orceína. Se ha utilizado el colorante de The British Drug Houses, el cual no se disuelve en un tiempo inferior a dos horas. La solución al 2 por 100 tiñe deficientemente, por lo que, al igual que en la nigrosina, se utilizó el alcohol clorhídrico como mordiente. De este modo se obtienen preparaciones correctas con una tinción de cinco minutos como término medio.

Para hacer permanentes las preparaciones también se ha utilizado el procedimiento de la glicerina.

## MATERIAL

Se han estudiado varias especies de *Drosophila*, al objeto de valorar mejor los resultados y obtener datos comparativos. Dos especies genéticamente tan parecidas como *D. melanogaster* y *D. simulans* permiten conseguir un resultado interesante por lo que respecta a la constancia estructural del cromocentro.

Se han estudiado series de diez individuos para cada especie. A continuación se indican las procedencias de las distintas cepas.

<i>D. funebris</i> . . . . .	Astegio (procedente de la Universidad de Pavía).
<i>D. immigrans</i> . . . . .	Barcelona.
<i>D. mercatorum</i> . . . . .	Barcelona.
<i>D. simulans</i> . . . . .	Barcelona.
<i>D. melanogaster</i> . . . . .	Oregón.

## DESCRIPCIÓN DE LAS PREPARACIONES

a) *D. funebris* (figs. 1 y 2). — El cromocentro está constituido por heterocromatina muy floja, que, por efecto de la presión, se deshace con facilidad y se extiende mucho e irregularmente. Por tanto, la forma del cromocentro es muy variable de uno a otro núcleo.

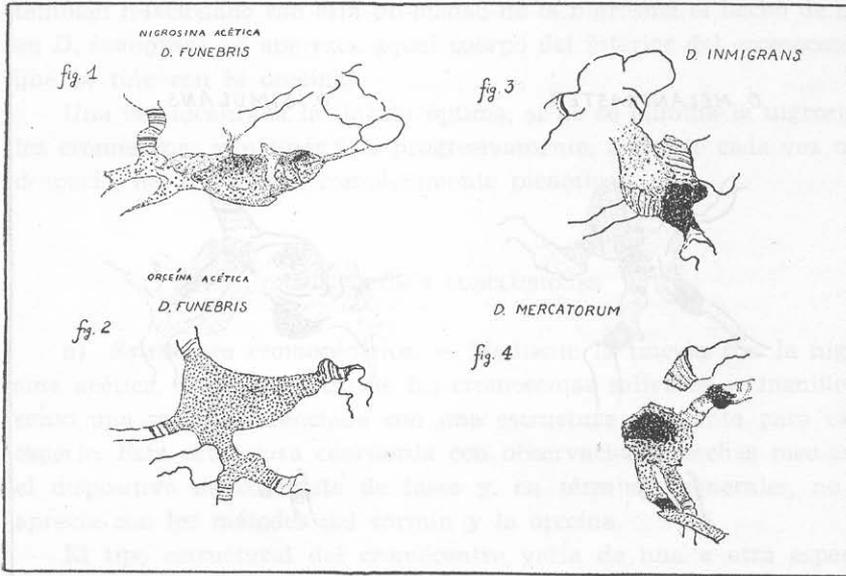
Con la orceína presenta una estructura arenosa, bastante homogénea y que guarda gran parecido con la descrita para *D. melanogaster* (PROKOFIEVA-BELGOWSKAYA, 1935). Por el contrario, con la nigrosina presenta una estructura constante y claramente diferenciada. Los heterocromómeros, muy teñidos y de tamaño variable, se distribuyen con gran irregularidad. El fondo se tiñe ligeramente y con distinta intensidad de uno a otro punto.

En ningún caso se presenta algún cuerpo central más teñido que pudiese representar los extremos cortos de los cinco pares de cromosomas acrocéntricos.

b) *D. immigrans* (fig. 3). — Con la orceína, el mismo aspecto que en el caso anterior. Con la nigrosina aparece muy complejo. Tiene una área de estructura floja, heterocromómeros irregularmente dispuestos y poco densos. Dos zonas con los heterocromómeros dispuestos en bandas de configuración parecida a las zonas eucromáticas. Finalmente, una

cuarta porción compacta que se colorea más intensamente y se extiende poco. Esta última, sin heterocromómeros aparentes, exceptuando algunas vesículas heterogéneamente distribuidas (¿heterocromómeros de BAUER?).

En algunos casos, cuando el núcleo se extiende adecuadamente, en las preparaciones de orceína se llega a vislumbrar algo de la estructura

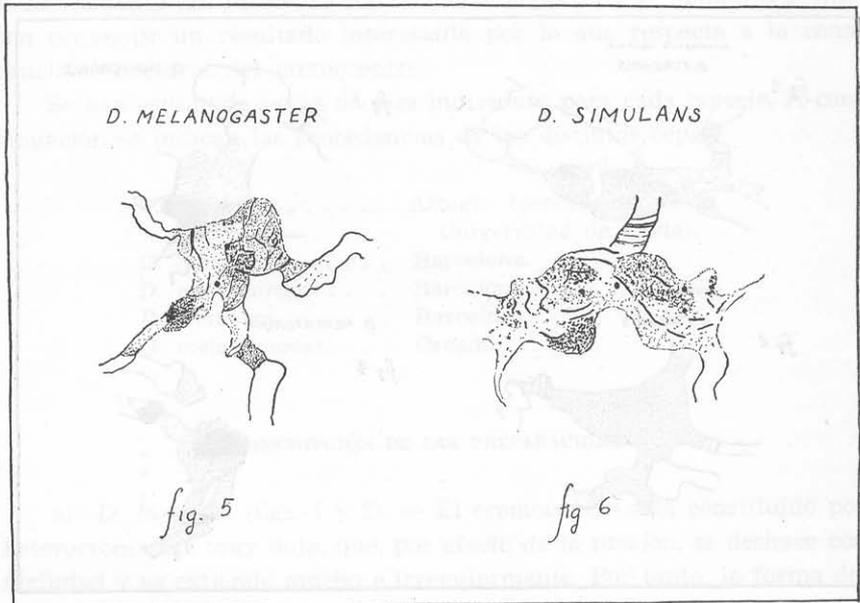


descrita. Además, es interesante notar que aparece un cuerpo central más teñido (¿a-heterocromatina de *D. virilis*?). Este cuerpo no se manifiesta con la nigrosina.

c) *D. mercatorum* (fig. 4). — El cromocentro de esta especie presenta regiones compactas y flojas, ambas con heterocromómeros muy teñidos y distribuidos al azar. La densidad en la distribución de los cromómeros es notablemente mayor que en los casos anteriores.

d) *D. melanogaster* (fig. 5). — No presenta cromómeros, a excepción de un corto número de ciertos corpúsculos mayores, particularmente dos de muy destacados. No sabemos la significación de estos heterocromómeros gigantes, pero su presencia es constante, no sólo en esta especie, sino también en *D. simulans* y en *D. funebris*. Además, presenta unas porciones compactas con algunas vesículas y, otras, surcadas por bandas que no llegan a resolverse en cromómeros, al igual que las de los brazos.

e) *D. simulans* (fig. 6). — Las características cromocéntricas de *D. simulans* son visiblemente semejantes a las de *D. melanogaster*. Es posible que existan diferencias, pero éstas resultan prácticamente imposibles de apreciar, desde el momento que el distinto modo con el cual han sido aplastados los cromocentros hace variar el detalle dentro de cada una de las dos especies. En cada caso, lo constante y característico



es el tipo estructural que, en la especie que describimos, es idéntico al de *D. melanogaster*.

Con la orceína se muestra el aspecto homogéneamente granuliento a que varias veces nos hemos referido.

#### ALGUNAS CARACTERÍSTICAS DE LA TINCIÓN

Se desconoce la naturaleza del proceso por el cual la nigrosina tiñe a los cromosomas. No obstante, esta tinción presenta algunas peculiaridades que vale la pena mencionar.

Los cromosomas se colorean con gran especificidad. En los salivales, excepto en las regiones heterocromáticas, se tiñen exclusivamente las bandas. Sin embargo, cuando la preparación envejece, se colorean débilmente las interbandas y el citoplasma.

Para la nigrosina, la afinidad tintorial es homogénea a lo largo de todo cromosoma. Como consecuencia de este hecho, la nigrosina no detecta la heteropicnosis. Esta conclusión ha sido comprobada en los cromosomas mitóticos de *Allium* y *Vicia*. Es posible que la propiedad de revelar la estructura de los cromocentros resida precisamente en esta peculiaridad. Téngase presente que los colorantes que tiñen diferencialmente las dos cromatinas sobrecolorean los cromocentros. Quizás esté también relacionado con esta propiedad de la nigrosina el hecho de que en *D. immigrans* no aparezca aquel cuerpo del interior del cromocentro que se tiñe con la orceína.

Una vez alcanzada la tinción óptima, si no se elimina la nigrosina, los cromosomas van tiñéndose progresivamente, aun que cada vez más despacio, hasta volverse completamente picnóticos.

#### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

a) *Estructura cromocéntrica*. — Mediante la tinción con la nigrosina acética, el cromocentro de los cromosomas salivales se manifiesta como una masa diferenciada con una estructura constante para cada especie. Esta estructura concuerda con observaciones hechas mediante el dispositivo de contraste de fases y, en términos generales, no se aprecia con los métodos del carmín y la orceína.

El tipo estructural del cromocentro varía de una a otra especie. Dado el corto número de especies estudiadas, es difícil fijar hasta qué punto se extiende esta variación estructural.

El caso de *D. melanogaster* y *D. simulans* sugieren una correspondencia entre la proximidad filogenética y la estructura cromocéntrica. Este resultado precisa de una extensa confirmación.

b) *Elementos estructurales de la heterocromatina*. — En *D. nebulosa*, C. PAVAN (1946) encontró que, mientras la porción heterocromática del cromosoma X es mucho menor que la del cromosoma II en las glándulas salivales, en los cromosomas mitóticos son iguales. Esto le permitió llegar a la conclusión de que en *D. nebulosa* existen dos tipos de heterocromatina: uno que se reduce relativamente poco en las glándulas salivales y otro, no distinguible del anterior por sus propiedades tintoriales, que se reduce mucho. El cromosoma Y está totalmente constituido por este último tipo de heterocromatina. Esta interpretación pudo ser plenamente confirmada mediante dos translocaciones recíprocas entre el Y y el II.

Estos dos tipos de heterocromatina parecen coincidir con los  $\alpha$  y  $\beta$  de HEITZ. No obstante, Pavan cree que es más probable que entre ambos exista cierta distinción, por cuanto la  $\alpha$ -heterocromatina de *D. virilis* carece de cromómeros, mientras que la heterocromatina no desarrollada de *D. nebulosa* manifiesta una clara estructura cromomérica.

Teniendo en cuenta los datos estructurales estudiados en este trabajo, parece ser que la  $\alpha$ -heterocromatina puede indistintamente poseer cromómeros o no. Así, en *D. funebris* existen cromómeros, en tanto faltan en *D. melanogaster*. Parece más lógico suponer que la  $\alpha$ -heterocromatina satisface la condición general de no desarrollarse nunca, en tanto que, dentro de dicha condición, caben distintas estructuras. Ya hemos visto como con sólo cinco especies elegidas al azar han aparecido cuatro elementos estructurales distintos:

- 1) Heterocromatina floja con cromómeros.
- 2) Heterocromatina floja sin cromómeros.
- 3) Heterocromatina compacta con cromómeros vesiculares.
- 4) Heterocromatina con cromómeros dispuestos en bandas más o menos regulares.

Además, cabe considerar que entre 1) y 2) existen toda una serie de términos intermedios. Así, en *D. mercatorum* la densidad de los heterocromómeros es mucho mayor que en *D. funebris*.

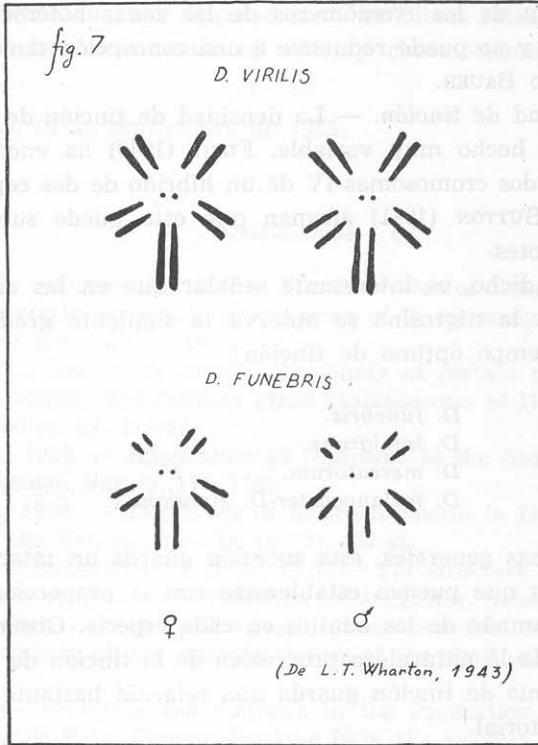
c) *La a-heterocromatina de HEITZ.* — También en *D. virilis*, HEITZ (1934) encontró un cuerpo más teñido en el interior del cromocentro que constituye la por él denominada a-heterocromatina. Con la orceína ya hemos dicho anteriormente que en *D. immigrans* también aparece un cuerpo con estas características. La cuestión de si realmente se trata de una formación homóloga a la hallada por HEITZ, permanece todavía por decidir.

WHITE (1947) cree que la a-heterocromatina de *D. virilis* debe representar el resultado de la fusión de los brazos cortos de los cromosomas, que en este caso son todos acrocéntricos. Ahora resulta difícil aceptar esta opinión, por cuanto en otras especies, como en *D. funebris*, teniendo todos los cromosomas acrocéntricos, no presentan ninguna formación de este género (figs. 1, 2 y 7).

d) *Heterocromatinas compacta y difusa de BAUER.* — En *D. pseudoscura*, BAUER (1936) pudo mostrar la existencia de una heterocromatina compacta y otra floja, respectivamente en la porción proximal derecha e izquierda del cromosoma X, separándolo del cromocentro por presión. En este caso, el Y resulta estar constituido por heterocromatina

floja en su totalidad. Sin necesidad de romper el cromocentro, ya hemos visto que con la nigrosina se hacen aparentes dos tipos de heterocromatina de esta naturaleza en *D. immigrans* y en *D. mercatorum*. En principio, estas dos estructuras heterocromáticas deben corresponder a las descritas por BAUER en *D. suboscura*.

e) *Heterocromómeros*. — De las observaciones de BAUER y PAINTER, hechas especialmente en los cromosomas politécnicos de los quironó-



midos, parecía deducirse que cuando las zonas heterocromáticas presentan cromómeros, éstos difieren de los de las zonas eucromáticas en su disposición desordenada y su forma vesicular. BAUER los denominó heterocromómeros, afirmando que son la característica fundamental de las regiones heterocromáticas de los salivales (WHITE, 1946).

En los cromocentros que aquí se han estudiado aparecen gránulos que deben considerarse heterocromómeros. Sin embargo, difícilmente pueden encuadrarse en el modelo de BAUER. En efecto, en primer lugar, puede reconocerse la presencia de ciertas vesículas en la heterocroma-

tina compacta. Pero en cuanto a los heterocromómeros de la heterocromatina floja sólo hallamos la condición de la distribución irregular, puesto que aparecen completamente teñidos. Y, finalmente, en *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. immigrans*, existen bandas de heterocromómeros cuya única diferencia con los correspondientes a las zonas eucromáticas estriba en su tamaño ligeramente superior. En algún caso excepcional puede distinguirse alguna de estas bandas que no se diferencia en nada de las eucromáticas.

La cuestión de los cromómeros de las zonas heterocromáticas es muy compleja y no puede reducirse a una concepción tan simple como la que propuso BAUER.

f) *Densidad de tinción*. — La densidad de tinción de los salivales parece ser un hecho muy variable. FUJII (1940) ha encontrado diferencias en los dos cromosomas IV de un híbrido de dos cepas de *D. virilis*. COLE y SUTTON (1941) afirman que esto puede suceder incluso entre homocigotes.

Pese a lo dicho, es interesante señalar que en las cinco especies estudiadas con la nigrosina se observa la siguiente gradación ascendente en el tiempo óptimo de tinción:

*D. funebris*.

*D. immigrans*.

*D. mercatorum*.

*D. melanogaster*-*D. simulans*.

En las líneas generales, esta sucesión guarda un interesante paralelismo con las que pueden establecerse con la proporción de heterocromatina y tamaño de los adultos en cada especie. Obsérvese, al respecto, que, dada la naturaleza progresiva de la tinción de la nigrosina, el tiempo óptimo de tinción guarda una relación bastante regular con la afinidad tintorial.

#### RESUMEN

Se describe la técnica empleada para la tinción de los cromosomas salivales con la nigrosina acética. Como resultado de la misma, se señala el hecho de que los cromocentros muestran una estructura claramente diferenciada y constante para cada una de las cinco especies estudiadas. Finalmente, a la luz de los datos aportados, se discuten algunos problemas relacionados con la naturaleza de la heterocromatina de los salivales en el género *Drosophila*.

## SUMMARY

Here is described the method employed to stain salivary chromosomes with acetic-nigrosine. As its main result, it is indicated the fact that the chromocentre show an structure clearly differentiated and constant for each one of five species studied. To the light of data brought about by the new technique, are discussed some problems relationed with the nature of the heterochromatin of salivary chromosomes y *Drosophila* genus.

Barcelona, 14 de septiembre de 1953.

## BIBLIOGRAFÍA

COLE, P. A., y SUTTON, E., 1941. — The absorption of ultraviolet radiation by bands of the salivary gland chromosomes of *D. melanogaster*. *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 9, 66-71.

HINTON, T., 1942. — A comparative study of certain heterochromatic regions in the mitotic and salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 27, 119-27.

PARES, R., 1953. — Application of Nigrosine to the Study of the Salivary Chromosomes. *Nature*, 172, 1151.

PAVAN, C., 1946. — Two types of heterochromatin in *Drosophila nebulosa*. *Proc. of the Nat. Ac. Sci.*, 32, (n.º 5), 137-45.

PROKOFIEVA-BELGOWSKAYA, A. A., 1937. — The structure of the Ychromosome in the salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 22, 94, 103.

ROSEN, GOSTA, v., 1946. — The rapid nigrosine-method for chromosome-counts, applicable to all the growing tissues of the plant. *Hereditas*, xxxiii, 567-70.

— 1949. — Problems and methods in the Production of Tetraploids within the Genus Beta. *Communications from the swedish sugar corporation*, v. 5, 10.

WHARTON, L. T., 1943. — Analysis of the metaphase and salivary chromosome morphology within the genus *Drosophila*. *The University of Texas Publication*, n.º 4313, 282-319.

WHITE, M. J. D., 1947. — Citología animal y evolución. *Espasa Calpe*, 1951 (Trad. F. A. Sáez), Buenos Aires.