

LOS CROMOSOMAS Y LAS REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO EN *Amphisbaena kingii* (BELL, 1833) (SQUAMATA: AMPHISBAENIDAE) DEL NORTE DE ARGENTINA

JOSÉ AUGUSTO RUIZ GARCÍA y ALEJANDRA B. HERNANDO

Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste, Av. Libertad 5450 (Campus), W 3404 AAS, (3400) Corrientes, Argentina. E-mail: ruizgarciaja@yahoo.com.ar

RESUMEN

Con el objetivo de ampliar el conocimiento citogenético de los anfisbénidos, describimos el cariotipo y la localización de los organizadores nucleolares de *Amphisbaena kingii* y analizamos los resultados en el contexto de una filogenia molecular reciente. Las preparaciones cromosómicas obtenidas a partir de epitelio intestinal y testículo fueron teñidas con coloración convencional y argéntica. El número diploide es 26, el más bajo conocido para los Amphisbaenia. La tinción Ag-NOR reveló la localización de los organizadores nucleolares en la región telomérica del par 3. Los macrocromosomas tienen la misma longitud relativa que *A. darwini*, *A. trachura* y *A. heterozonata* y la posición del NORs es un carácter compartido con *A. microcephalum*. *A. kingii* integra un clado formado por especies que poseen 12 macrocromosomas bibraquiados.

Palabras clave:

Amphisbaenia, cariotipo, Ag-NOR.

**CHROMOSOMES AND NUCLEOLAR
ORGANIZER REGIONS IN
Amphisbaena kingii (BELL, 1833)
(SQUAMATA: AMPHISBAENIDAE)
FROM NORTH OF ARGENTINA**

JOSÉ AUGUSTO RUIZ GARCÍA & ALEJANDRA B. HERNANDO

Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura,
Universidad Nacional del Nordeste, Av. Libertad 5450 (Campus), W 3404 AAS,
(3400) Corrientes, Argentina. E-mail: ruizgarciaja@yahoo.com.ar

ABSTRACT

Chromosomes and nucleolar organizer regions in *Amphisbaena kingii* (Bell, 1833) (Squamata: Amphisbaenidae) of the North of Argentina. We analyzed the karyotype of *Amphisbaena kingii* in order to increase the cytogenetic information of Amphisbaenia. Chromosome spreads from intestinal epithelium and testes were studied after conventional Giemsa and Ag-NOR staining. A diploid number of 26 and Ag-NOR on macrochromosomes pair 3 were found. Relative length of macrochromosomes is similar to those of *A. darwini*, *A. trachura* and *A. heterozonata* while NORs position is the same as *A. microcephalum*. *A. kingii* belongs to a clade that includes species with 12 biarmed macrochromosomes.

Key words:

Amphisbaenia, karyotype, Ag-NOR.

INTRODUCCIÓN

Amphisbaenia o “viboritas de dos cabezas” es un linaje monofilético de reptiles fosoriales distribuidos en el sur de Europa, norte de África, Asia Menor, América e Islas del Caribe (Vidal *et al.*, 2007). Aquellos de América del Sur están reunidos en una única familia, Amphisbaenidae, que comprende dos géneros: *Mesobaena* con *M. huebneri* y *M. rhachicephala* y *Amphisbaena* con 165 especies (Uetz, 2012). De este total, en general usando como muestra un único ejemplar sólo el 13 % fueron analizadas citogenéticamente. Desde este punto de vista, *Amphisbaena* es el clado más diverso entre los Amphisbaenia (Gans, 1978) y los caracteres del cariotipo revelados con coloración convencional y Ag-NOR son considerados filogenéticamente informativos (Cole & Gans, 1987; Laguna *et al.*, 2009). El rango de números diploides varía entre $2n=26$ a 50 y los números fundamentales entre 42 a 64 (Huang *et al.*, 1967; Huang & Gans, 1971; Beçak *et al.*, 1972; Cole & Gans, 1987; Hernando, 2005; Laguna *et al.*, 2009; Falcione & Hernando, 2010). La condición primitiva para los Amphisbaenia, un cariotipo formado por $2n=12$ macrocromosomas (M) y 22 o 24 microcromosomas (m) (Cole & Gans, 1987), está presente en *A. caeca*, *A. fenestrata*, *A. manni*, *A. microcephalum* y *A. xera* (Huang *et al.*, 1967; Huang & Gans, 1971; Hernando, 2005). La posición de los organizadores nucleolares conocida en seis especies (*A. bolivica*, *A. heterozonata*, *A. hiata*, *A. mertensi*, *A. microcephalum* y *A. ridleyi*) muestra una localización especie específica del NOR. Sólo en *A. ridleyi* se detectaron señales en regiones teloméricas a través de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) (Laguna *et al.*, 2009).

La reciente hipótesis filogenética molecular de Mott & Vieites (2009) plantea una evolución homoplásica de los caracteres morfológicos usualmente utilizados en la diagnosis de los anfibénidos de América del Sur. En este contexto, los caracteres del cariotipo cuando se contrastan como caracteres independientes y dependiendo del nivel de análisis, pueden contribuir a inferir tanto la relación entre los anfibénidos sudamericanos como su evolución cromosómica. Por ello, con el objetivo de ampliar el conocimiento citogenético de estos reptiles, analizamos el cariotipo y la localización de los organizadores nucleolares de *Amphisbaena kingii*, comparamos los caracteres cuantitativos de los macrocromosomas con otras especies del género y evaluamos nuestros resultados en un contexto filogenético. *Amphisbaena kingii* es un taxón que posee el cráneo comprimido lateralmente y según la hipótesis de Mott & Vieites (2009), integra un clado con *A. darwini*, *A. lesserii*, *A. munoai* y *A. angustifrons*, especies con cabeza redondeada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron seis adultos (cuatro machos y dos hembras) de *A. kingii* recolectados en la localidad de Napenay (26°42'97"S; 60°36'34"O) Departamento Independencia, Provincia del Chaco (Argentina). Los ejemplares están depositados en la Colección Herpetológica Corrientes de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNEC), Corrientes (Argentina) identificados con los siguientes números: 08371, 08373 (♀), 08372, 08374, 08375, 08376 (♂).

Los individuos fueron pretratados con colchicina al 0,1 %. Se obtuvieron las preparaciones cromosómicas a partir de un homogeneizado de epitelio intestinal y de células testiculares (Kezer & Sessions, 1979). Fueron coloreadas con una solución de Giemsa (pH 6,8) y tratadas según la técnica de Howell & Black (1980). Medimos 15 metafases de tres individuos machos y una hembra usando el software libre MicroMeasure, versión 3.3 (Reeves & Tear, 2000). Para comparar con otras especies del género, calculamos la proporción entre los brazos (r) y la longitud relativa de los macrocromosomas (LR). Para describir el cariotipo se siguió la propuesta de Peccinini–Seale (1981): $2n =$ número de macrocromosomas metacéntricos/submetacéntricos + número de macrocromosomas subtelocéntricos/acrocéntricos + número de microcromosomas.

RESULTADOS

El cariotipo de *A. kingii* presentó $2n = 26, 12 + 0 + 14$, todos los macrocromosomas fueron metacéntricos y cada par se distinguió por su longitud. Fueron identificados cinco pares de microcromosomas como bibraquiados (Fig. 1a). En 22 células testiculares contabilizamos seis macrobivalentes y siete microbivalentes (Fig. 1b). No observamos constricciones secundarias ni diferencias entre los cariotipos de machos y hembras. Asimismo, identificamos la localización de los organizadores nucleolares en posición terminal en el par 3 (Fig. 2).

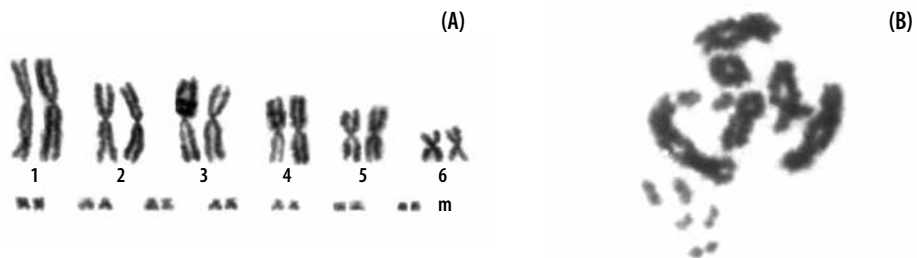


Figura 1. (A) Cariotipo de *Amphisbaena kingii* coloreado con Giemsa ($2n = 26, 12 + 0 + 14$).
(B) Célula meiótica de testículo de *A. kingii* mostrando 13 bivalentes.

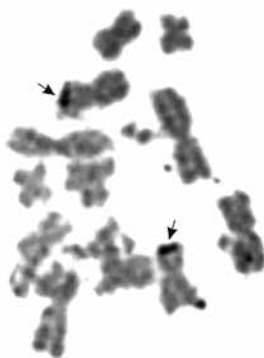


Figura 2. Metafase intestinal de *A. kingii* con Ag-NOR en el par 3 (se indica con una flecha).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se confirmó el cariotipo de *A. kingii* $2n= 26, 12 + 0 + 14$, previamente descrito a partir de siete metafases de un único ejemplar recolectado en Tramandaí (Brasil) (Huang & Gans, 1971). Estos autores, a diferencia de nuestros resultados, describieron el par 1 como submetacéntrico y de tamaño similar al par 2.

Con sólo 21 taxones analizados, el género *Amphisbaena* es remarcable por su variabilidad cromosómica (Gans, 1978). Hasta el momento, se describieron una especie polimórfica (*A. dubia*) y 13 fórmulas cariotípicas de las cuales nueve son especie específicas (Tabla 1). Cinco fórmulas están caracterizadas por poseer seis pares de macrocromosomas metacéntricos y submetacéntricos y entre 7 a 12 pares de microcromosomas. En las restantes fórmulas, el rango de números diploides está comprendido entre 38 y 50 con número variable de macrocromosomas uni y bibraquiados y de microcromosomas (Huang *et al.*, 1967; Huang & Gans, 1971; Laguna *et al.*, 2009; Falcione & Hernando, 2010).

Amphisbaena kingii tiene un cariotipo distintivo por el número diploide ($2n= 26$), el más bajo conocido para *Amphisbaena* debido al reducido número de microcromosomas (siete pares). Con respecto a los macrocromosomas, *A. kingii* comparte con 11 especies de *Amphisbaena* una fórmula cariotípica con seis pares de macrocromosomas bibraquiados. En *A. kingii*, *A. darwini*, *A. trachura* y *A. heterozonata* los macrocromosomas son metacéntricos y tienen un tamaño relativo similar (Tabla 2).

La fórmula frecuentemente observada en los *Amphisbaena* y considerada la condición primitiva es $2n= 12 + 0 + 22$ o $24 m$ (Huang & Gans, 1971; Cole & Gans, 1987). Asumiendo esta hipótesis, el cariotipo de *A. kingii* posee condiciones primitivas (número y morfología de los macrocromosomas) y derivadas (número de microcromosomas).

Entre las especies con 12 macrocromosomas bibraquiados y analizadas con tinción argéntica, *A. heterozonata* tiene regiones Ag-NOR positivas en los pares 1, 3 y 4, *A. hiata* posee un único par cromosómico portador de organizadores nucleolares (par 4) mientras que *A. microcephalum* y *A. kingii* comparten la localización telomérica en el par 3 (Hernando, 2005). Entre las especies con macrocromosomas acrocéntricos, en *A. bolivica* y *A. mertensi* el par portador del NOR es de tamaño mediano mientras que en *A. ridleyi* corresponde al par 2, en ambos casos en la región telomérica (Hernando, 2005; Laguna *et al.*, 2009; Falcione & Hernando, 2010). Esta variabilidad sugiere que los Ag-NORs son marcadores filogenéticamente informativos y deberían considerarse en estudios cromosómicos sobre anfisbénidos (Laguna *et al.*, 2009).

Fórmulas cariotípicas	Especies
26 = 12+0+14	<i>A. kingii</i>
25 = 12+3+10	<i>A. dubia</i>
26 = 12+2+12	
27 = 12+1+14	
28 = 12+0+16	
30 = 12+0+18	<i>A. heterozonata</i> , <i>A. angustifrons</i> , <i>A. darwini</i> , <i>A. hiata</i> , <i>A. trachura</i>
32 = 12+0+20	<i>A. microcephalum</i>
34 = 12+0+22	
36 = 12+0+24	<i>A. xera</i> , <i>A. manni</i> , <i>A. caeca</i> , <i>A. fenestrata</i>
38 = 14+8+16	<i>A. alba</i>
40 = 6+12+22	<i>A. mertensi</i>
44 = 0+24+20	<i>A. bolivica</i>
44 = 2+20+22	<i>A. vermicularis</i>
44 = 4+20+20	<i>A. camura</i>
46 = 14+4+28	<i>A. ridleyi</i>
48 = 6+16+26	<i>A. fuliginosa</i>
50 = 8+14+28	<i>A. innocens</i> , <i>A. leberi</i>

Tabla 1. Fórmulas cariotípicas conocidas para el género *Amphisbaena*.

Fuente bibliográfica: Huang *et al.* (1967), Huang & Gans (1971), Beçak *et al.* (1972), Cole & Gans (1987), Hernando (2005), Laguna *et al.* (2009), Falcione & Hernando (2010) y este trabajo.

Pares de macrocro- mosomas	Especies							
	<i>A. kingii</i>		<i>A. darwini</i>		<i>A. trachura</i>		<i>A. heterozonata</i>	
	LR ± DE	r ± DE	LR	r	LR	r	LR	r
1	23,81 ± 0,85	1,29 ± 0,17	23,9	1,47	24,3	1,44	23,5	1,50
2	20,83 ± 1,30	1,2 ± 0,12	22,2	1,19	21,9	1,25	22,4	1,11
3	18,01 ± 0,50	1,3 ± 0,12	16,6	1,18	17,6	1,18	16,4	1,26
4	15,65 ± 0,73	1,12 ± 0,07	15,1	1,21	15,2	1,19	15,3	1,15
5	12,54 ± 0,68	1,09 ± 0,05	12,7	1,09	12,0	1,15	12,8	1,12
6	9,13 ± 0,82	1,13 ± 0,08	9,5	1,10	9,0	1,13	9,6	1,12

Tabla 2. Comparación de la longitud relativa (LR) y proporción de brazos (r) de *A. kingii* con otras especies de *Amphisbaena*. DE: desviación estándar. Fuente bibliográfica: Huang *et al.* (1967) y este trabajo.

La filogenia molecular de Mott & Vieites (2009) incluye en el análisis 10 especies de *Amphisbaena* con cariotipo conocido. En la hipótesis de estos autores, el clado que integra *A. kingii* comprende taxones con 12 macrocromosomas bibraquiados (*A. darwini*, *A. angustifrons* junto a *A. microcephalum*); en otro clado están agrupadas *A. fuliginosa*, *A. vermicularis*, *A. bolivica*, *A. camura* y *A. alba*, especies con mayor número macrocromosomas uni y bibraquiados mientras que *A. mertensi* forma parte del linaje más divergente de anfisbénidos sudamericanos (Fig. 3).

Los datos obtenidos a partir de coloración convencional sugieren que las diferencias en el número de macrocromosomas involucran fisiones céntricas (Cole & Gans, 1987). Sin embargo, para establecer homeologías e inferir los reordenamientos cromosómicos que ocurrieron en la evolución de los anfisbénidos sudamericanos es necesario el análisis de un mayor número de especies y de sus patrones de bandas.

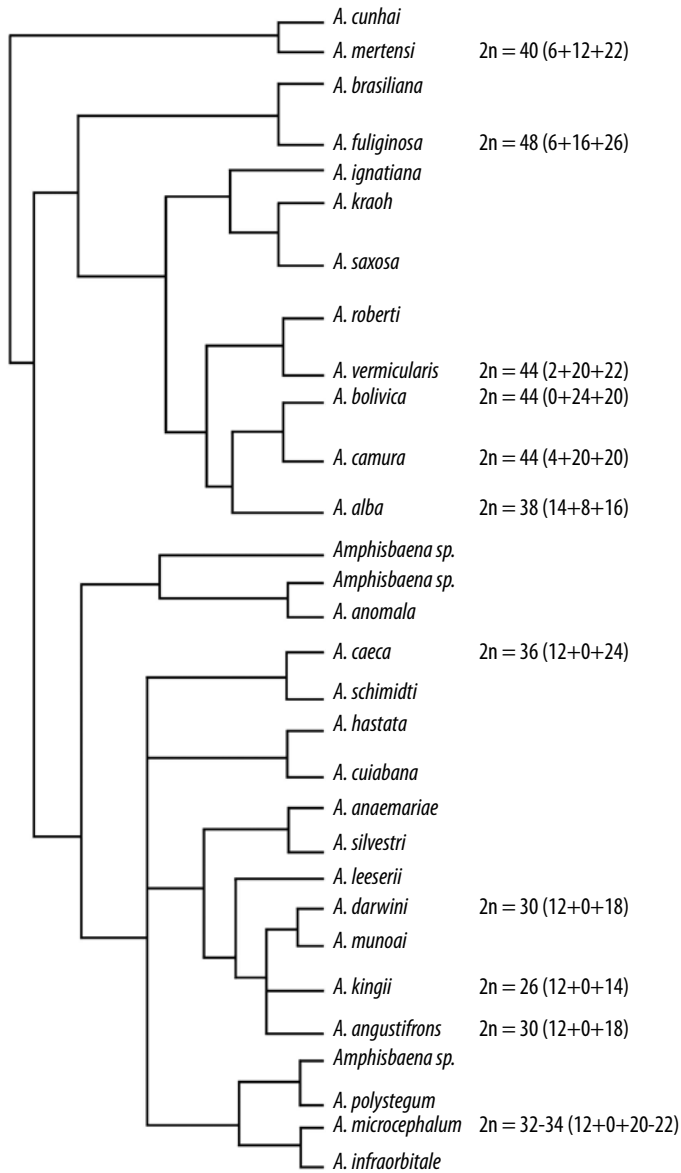


Figura 3. Relaciones filogenéticas entre especies de *Amphisbaena* según Mott & Vieites (2009) incluyendo la información cariotípica disponible.

AGRADECIMIENTOS

La Dirección de Fauna y Áreas Naturales Protegidas (Chaco, Argentina) autorizó la colecta de los ejemplares. La Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste financió este trabajo.

Recibido | Received: 09 de septiembre de 2014

Aceptado | Accepted: 02 de febrero de 2015

REFERENCIAS

- Beçak, M.L., W. Beçak & L. Denaro.** 1972. Chromosome polymorphism, geographical variation and karyotypes in Sauria. *Caryologia* 25: 313–326.
- Cole, C.J. & C. Gans.** 1987. Chromosomes of *Bipes*, *Mesobaena* and other amphisbaenians (Reptilia), with comments on their evolution. *Am. Mus. Novit.* 2869: 1–94.
- Falcione, C. & A. Hernando.** 2010. A new karyotypic formula for *Amphisbaena* Linné, 1758 genus (Squamata: Amphisbaenidae). *Phyllomedusa* 9:75–80.
- Gans, C.** 1974. Biomechanics: An approach to Vertebrate Biology. J.B. Lippincott Co., Pennsylvania, 261 pp.
- Gans, C.** 1978. The characteristics and affinities of the Amphisbaenia. *Tran. Zool. Soc. Lond.* 34: 347–416.
- Gans, C.** 2005. Checklist and bibliography of the Amphisbaenia of the world. *B. Am. Mus. Nat. Hist.* 289: 1–130.
- Hernando, A.** 2005. Cytogenetic study of *Leposternon* and *Amphisbaena* (Amphisbaenia: Squamata). *Caryologia* 58: 178–182.
- Huang, C.C., H.F. Clark & C. Gans.** 1967. Karyological studies on fifteen forms of amphisbaenians (Amphisbaenia: Reptilia). *Chromosoma* 22:1–15.
- Huang, C.C. & C. Gans.** 1971. The chromosomes of 14 species of amphisbaenians (Amphisbaenia, Reptilia). *Cytogenetics* 10:10–22.
- Howell, W.M. & D.A. Black.** 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1– step method. *Experientia* 36: 1014–1015.
- Kezer, J. & S.K. Sessions.** 1979. Chromosome variation in the plethodontid salamander, *Aneides ferreus*. *Chromosoma* 71: 65–80.
- Laguna, M.M., R.C. Amaro, T. Mott, Y. Yonenga-Yassuda & M.T. Rodrigues.** 2009. Karyological study of *Amphisbaena ridleyi* (Squamata, Amphisbaenidae), an endemic species of the Archipelago of Fernando de Noronha, Pernambuco, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 33: 56–61.
- Mott, T. & D.R. Vieites.** 2009. Molecular phylogenetics reveals extreme morphological homoplasy in Brazilian worm lizards challenging current taxonomy. *Molec. Phylogenet. Evol.* 51: 190–200.
- Peccinini-Seale, D.** 1981. New developments in vertebrate cytotaxonomy. IV. Cytogenetic studies in reptiles. *Genetica* 56: 123–148.
- Reeves, A. & J. Tear.** 2000. MicroMeasure for Windows, version 3.3. Free program distributed by the authors over the Internet from. URL: <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>. Consultado: Febrero 03, 2014.
- Uetz, P.** 2012. The TIGR reptile database. The EMBL reptile database. URL: <http://www.reptile-database.org/>. Consultado: Febrero 12, 2014.
- Vidal, N., Azvolinsky, C., Cruaud & S.B. Hedges.** 2007. Origin of tropical American burrowing reptiles by transatlantic rafting. *Biol. Lett.* 4: 5–118.

