

UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

ÁREA DE GENÉTICA

Organización del genoma en el Género *Mytilus*

MEMORIA
que para optar al grado de Doctor en
Biología presenta

Andrés Martínez Lage

La Coruña, Enero de 1994

JOSEFINA MÉNDEZ FELPETO, PROFESORA TITULAR DE GENÉTICA
DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA
UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA,

INFORMA:

Que el presente trabajo, **Organización del genoma en el género *Mytilus***, que para optar al grado de doctor presenta D. Andrés Martínez Lage, ha sido realizado bajo mi dirección y, considerándolo concluído, autorizo su presentación al tribunal calificador.

La Coruña, 4 de Febrero de 1994.

A handwritten signature in black ink that reads "Josefina Méndez". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.

Fdo. Dra. Josefina Méndez Felpeto

En un trabajo que se realiza durante tantos años existen muchas personas que de una forma u otra ayudan a la elaboración del mismo. Esperando no olvidarme de nadie deseo expresar mi agradecimiento:

A **Josefina Méndez** que me permitió formar parte de su equipo y empezar así a conocer en mayor profundidad la genética.

A **Manolo Gestoso y José "el de Corón"** por su amabilidad en todo momento y proporcionarme los mejillones cría o adultos de Galicia utilizados en este trabajo.

A **Hubert Hummel y Rudolf** que me permitieron utilizar su laboratorio en Yerseke (Holanda) como centro de recolección de *Mytilus edulis* y *M. trossulus*.

A **Ana Insua** que me ayudó a obtener los NORs y leyó y discutió muy constructivamente este trabajo.

A **Begoña Carril** que me ayudó a diseccionar, procesar, bandear, revelar, positivar, etc. Sin su inestimable ayuda este trabajo posiblemente aún no se hubiese terminado.

A **Maribel, Anuska y María José** por el gran número de horas que pasaron a oscuras revelando y fotografiando y, en otros casos, diseccionando branquias.

A **Ana** por enseñarme todas las técnicas que conoce, principalmente con las endonucleasas, y por el gran número de horas en que discutimos y elaboramos los resultados en el laboratorio y en casa.

a todos ellos, gracias.

A mis padres,
A Ana y Antón

Este trabajo se llevó a cabo mediante la concesión por parte del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de La Coruña de dos ayudas para la realización de Tesis Doctorales, una en 1991 para la recogida de material por el litoral mediterráneo y otra en 1993 para muestrear ejemplares de *M. edulis* y *M. trochus* del litoral europeo.

Por otra parte está encuadrado dentro de los proyectos de investigación:

- Cuantificación de ADN y distribución de secuencias repetitivas del mejillón gallego. 1989-1991. XUGA 7110489. Consellería de Educación e Ordenación Universitaria. Xunta de Galicia.

- La organización del genoma en moluscos: aspectos citogenéticos y moleculares. 1991-1993. D.G.I.C.Y.T. PB 90-0323.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Distribución y taxonomía del Género <i>Mytilus</i>	2
1.2. Organización del genoma.....	6
1.2.1. Bando por métodos convencionales.....	6
1.2.2. Bando por fluorocromos.....	8
1.2.3. Bando por endonucleasas de restricción.....	11
1.3. Caracterización de los cromosomas de bivalvos.....	12
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	18
3.1. Material de estudio.....	19
3.2. Mantenimiento de los mejillones.....	20
3.2.1. Obtención de metafases de individuos adultos.....	20
3.2.2. Obtención de metafases de larvas.....	20
3.3. Medidas de los cromosomas y tratamiento estadístico.....	21
3.4. Técnicas de bando cromosómico.....	22
3.4.1. Bando C.....	22
3.4.2. Bando G.....	22
3.4.3. Tinción con plata.....	23
3.4.4. Bando con fluorocromos.....	23
3.4.4.1. Quinacrina.....	23
3.4.4.2. Hoechst - 33258.....	23
3.4.4.3. DAPI.....	24
3.4.4.4. Cromomicina A ₃	24
3.4.4.5. Distamicina A/DAPI.....	24
3.4.4.6. Cromomicina A ₃ /Distamicina A/DAPI.....	24
3.4.4.7. Actinomicina D/DAPI.....	25
3.4.4.8. Actinomicina D/Hoechst - 33258.....	25
3.4.4.9. Verde de metilo/DAPI o Verde de metilo/Hoechst - 33258.....	25
3.4.5. Tratamiento con endonucleasas de restricción.....	25
3.5. Fotografiado.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Número y morfología de los cromosomas.....	31

4.2. Bandeos convencionales.....	37
4.2.1. Bandas G.....	37
4.2.2. Bandas C.....	37
4.2.3. Tinción con plata.....	43
4.3. Bandeos con compuestos fluorescentes.....	43
4.3.1. Bando con quinacrina.....	43
4.3.2. Bando con Hoechst; Actinomicina D/Hoechst y Distamicina A/Hoechst.....	46
4.3.3. Bando con DAPI, Distamicina A/DAPI y Actinomicina D/DAPI.....	46
4.3.4. Bando con Cromomicina A ₃	47
4.4. Bandeos con endonucleasas de restricción.....	47
5. DISCUSIÓN.....	62
5.1. Número y morfología de los cromosomas.....	63
5.2. Estudio de la heterocromatina.....	66
6. CONCLUSIONES.....	76
7. BIBLIOGRAFÍA.....	79

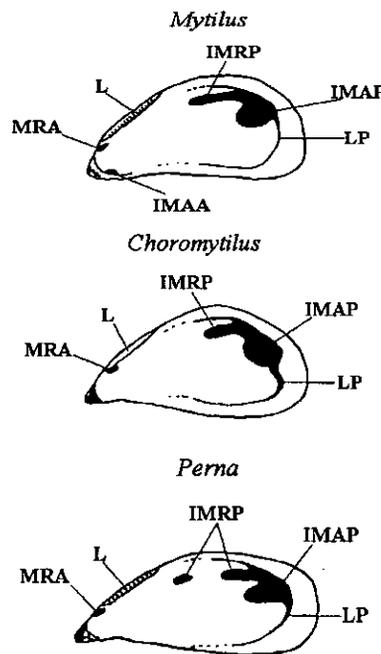
1. INTRODUCCIÓN

1.1. DISTRIBUCIÓN Y TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Mytilus*

La familia Mytilidae se originó al final del Devónico hace unos 400 millones de años (Soot-Ryen, 1969). El género *Mytilus* se diferencia de otros de la misma familia, como *Choromytilus* y *Perna*, por la presencia de un músculo aductor anterior y la más o menos continuada impresión del músculo retractor posterior (figura 1).

Figura 1

Morfología de la concha de los géneros *Mytilus*, *Choromytilus* y *Perna*.



MRA: Músculo retractor anterior; **L:** Ligamento; **IMRP:** Impresión del músculo retractor posterior; **IMAP:** Impresión del músculo aductor posterior; **IMAA:** Impresión del músculo aductor anterior; **LP:** Línea paleal.

En Europa existen tres especies pertenecientes al género *Mytilus*: *M. edulis* (Linnaeus, 1758), que se originó en el Plioceno (Soot-Ryen, 1955), *M. galloprovincialis* (Lamarck, 1819) que aparecería durante la glaciación del Pleistoceno hace uno o dos millones

INTRODUCCIÓN

de años en el Mar Mediterráneo (Barsotti y Meluzzi, 1968), y *M. trossulus* (Gould, 1850) que se originaría en la misma glaciación en el Mar Báltico (Varvio et al., 1988).

Las investigaciones taxonómicas en el género *Mytilus* se han orientado al establecimiento de una relación sistemática entre *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*. Desde 1860 se planteó una controversia con respecto a la sistemática de este género. Así, en la revisión de Lamy (1936) figuran 7 especies diferentes pertenecientes al género *Mytilus*, entre las que aparecen *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*. Sin embargo, en la posterior revisión de Soot-Ryen (1955), únicamente se reconocen 3 especies, una de las cuales es *M. edulis*, figurando *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* como subespecies de esta última. Actualmente mientras algunos autores consideran los tres tipos más ampliamente distribuidos como especies distintas, otros los consideran como subespecies, razas o ecotipos (Gosling, 1984; Koehn, 1991; Gosling, 1992a, Gardner, 1992).

Las diferencias entre *M. edulis* y *M. galloprovincialis* se basaron en un principio en los caracteres morfológicos de la concha (Verduin, 1979; Gosling, 1984; Beaumont et al., 1989), ya que *M. galloprovincialis* suele presentar una concha más ancha, con la zona de la boca más curvada, la impresión del músculo aductor anterior más pequeña y circular y con la charnela de menor tamaño. Sin embargo Seed (1978) ya había señalado la gran plasticidad de estos caracteres, influenciados principalmente por la edad del mejillón, la densidad de la población y la altura que ocupa en la zona intermareal. Las diferencias entre *M. edulis* y *M. trossulus* están basadas en que la concha de *M. trossulus* es más alargada y el músculo aductor posterior más pequeño. Además el tamaño inferior de la concha y el color suelen ser caracteres que facilitan la identificación de *M. trossulus* (Remane y Schlieper, 1971; Theisen, 1982).

La utilización de técnicas electroforéticas y parámetros morfométricos para caracterizar individuos y poblaciones y la aplicación de técnicas de análisis multivariante, permitieron analizar el status taxonómico y sistemático del mejillón (McDonald y Koehn, 1988; Varvio et al., 1988; McDonald et al., 1991). Para diferenciar estas posibles especies se han utilizado además marcadores alozímicos, entre los cuales, la manosa 6-fosfato isomerasa (Mpi), la peptidasa II (Aap) y la glucosafosfato isomerasa (Gpi) son los loci más discriminantes, aunque ninguno se puede considerar como locus diagnóstico (Koehn, 1991,

INTRODUCCIÓN

Gosling, 1992b, Seed, 1992). Las frecuencias alélicas de cada una de las poblaciones son generalmente homogéneas para cada especie de mejillón, pero cuando comparamos individuos de la misma especie pero de poblaciones diferentes existen, invariablemente, diferencias sustanciales entre ellos (Gosling, 1992b). La distancia genética (D) calculada por Skibinski et al. (1980) entre una población de *M. edulis* (Gran Bretaña) y otra de *M. galloprovincialis* (Italia) es de 0'172 basándose en estudios de la frecuencia de 16 loci. Comparando *M. edulis* de Dinamarca y *M. galloprovincialis* de Sudáfrica, Grant y Cherry (1985) observan una distancia $D = 0'162$ en los resultados de la frecuencia de 23 loci. Por otra parte, Väinölä y Hvilson (1991) encuentran una $D = 0'28 \pm 0'12$ al comparar *M. trossulus* del Mar Báltico con *M. galloprovincialis* de Galicia. Estos valores indicados se encuentran en el rango esperado para la comparación entre subespecies de invertebrados ($D = 0'228$, Ferguson, 1980), lo cual nos llevaría a nombrar los tres tipos de mejillón como *M. edulis*, *M. edulis galloprovincialis* (Jeffreys, 1863) y *M. edulis trossulus*, como ya habían sido consideradas por Soot-Ryen (1955).

M. edulis y *M. galloprovincialis* fueron observados ocupando el mismo nicho ecológico en el S.O. de Inglaterra por Lewis y Seed (1969) y por Seed (1971). La separación entre los dos tipos de mejillón se realizó en base a criterios morfológicos, anatómicos, fisiológicos y alozímicos. La hibridación natural en dichas poblaciones fue confirmada unos años después en base a estudios alozímicos (Ahmad y Beardmore, 1976), e investigaciones posteriores han detectado la coexistencia de ambos tipos de mejillón en amplias zonas de las Islas Británicas y oeste de Francia (Skibinski et al., 1978, 1983; Skibinski y Beardmore, 1979; Gosling y Wilkins, 1981; Skibinski, 1983; Coustau et al., 1991) ocupando un área de más de 1400 Km.

Por lo que respecta a *M. edulis* y *M. trossulus* ambas especies parecen habitar la región de confluencia del Mar Báltico con el Océano Atlántico, donde Väinölä y Hvilson (1991) detectaron híbridos en un área de unos 150 Km.

En Galicia el mejillón se encuentra ampliamente distribuido y sometido a cultivo, existiendo una discrepancia en cuanto a la especie que habita estas costas. Algunos autores señalaron la presencia de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (Nobre, 1938-1940; Hernández y Jiménez, 1971; Lubet, 1973; Ortea, 1977; Ramonell, 1985). Posteriormente se consideró la

INTRODUCCIÓN

existencia de únicamente *M. edulis* (Hidalgo, 1971; Figueras, 1976; Seed, 1976, 1978; Aguirre, 1980; Mariño et al., 1982; Tenore et al., 1982; Suchanek, 1985), y, actualmente, los últimos trabajos confirman la presencia de tan sólo *M. galloprovincialis* (Lubet, 1976; Sanjuan et al., 1986, 1990; Pasantes et al., 1990; Crespo et al., 1990).

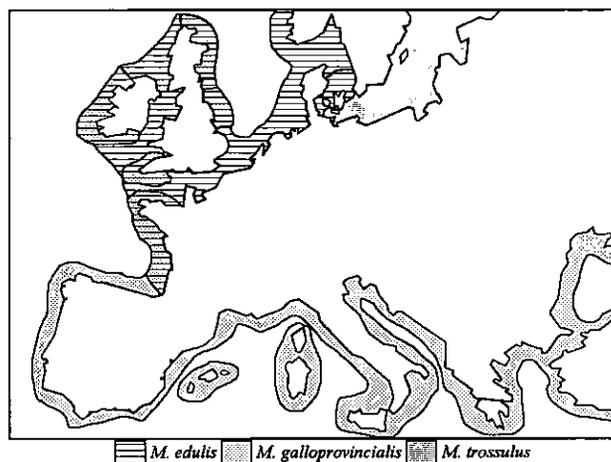
Los resultados obtenidos a partir de cruzamientos entre *M. edulis* y *M. galloprovincialis* permitieron comprobar la ausencia de barreras reproductivas o incompatibilidades genéticas (Lubet et al., 1984; Gardner y Skibinski, 1988), pero aunque aparentemente no se detectó ningún efecto adverso en viabilidad, crecimiento o mortalidad de los híbridos de la primera generación, en investigaciones posteriores se encontraron diferencias significativas en la supervivencia después de 9 días de vida entre los híbridos de la primera generación con respecto a larvas procedentes de cruzamientos controles de individuos *M. galloprovincialis* entre sí y *M. edulis* entre sí (Beaumont, comunicación personal).

A nivel citogenético, Lubet (1959) observó en células haploides, que la dotación cromosómica de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* era de $n = 14$, y, posteriormente, Ahmed y Sparks (1970) comprobaron que la dotación diploide era de $2n = 28$. En los últimos años varios autores han realizado estudios en estas dos especies de mejillón y corroboran dichas observaciones (Ieyama y Inaba, 1974; Thiriou-Quévrex y Ayraud, 1982; Moynihan y Mahon, 1983; Dixon y Flavell, 1986; Pasantes et al., 1990). Por lo que respecta a la dotación de *M. trossulus* se ha confirmado recientemente también como $2n = 28$ (Insua Pombo, 1992).

Teniendo en cuenta los criterios morfológicos, alozímicos y citogenéticos descritos hasta la actualidad, la distribución de las tres especies del G. *Mytilus* en Europa es la siguiente: *M. edulis* se distribuye desde los mares Blanco y Báltico (McDonald et al., 1990, 1991) hasta el sur de las costas atlánticas francesas (Seed, 1972, 1978; McDonald et al., 1990); *M. galloprovincialis* desde el Mar Negro por todo el Mediterráneo, hasta amplias zonas del suroeste de Inglaterra (Hepper, 1957; Lewis y Seed, 1969), de la costa occidental francesa (Seed, 1972) y de Irlanda (Seed, 1974), y *M. trossulus* por el Mar Báltico (Bulnhein y Gosling, 1988; Varvio et al., 1988) (figura 2).

Figura 2

Distribución del mejillón en las costas europeas



1.2. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

1.2.1. BANDEO POR MÉTODOS CONVENCIONALES

La utilización de diversas técnicas de análisis cromosómico ha permitido un mayor conocimiento de la estructura y organización de los cromosomas, principalmente en mamíferos. El empleo de diferentes tinciones y pretratamientos ponen de manifiesto una discontinuidad en la tinción de la fibra de cromatina empaquetada, observándose cromosomas metafásicos no homogéneamente teñidos que permite localizar regiones cromosómicas concretas. Sumner (1990) considera que se pueden clasificar las bandas en cuatro tipos diferentes:

- 1) Bandas heterocromáticas (C),
- 2) Bandas que se manifiestan a lo largo de los brazos cromosómicos (G, Q y R),
- 3) Organizadores nucleolares (NOR), y
- 4) Cinetocoros .

INTRODUCCIÓN

El término heterocromatina fue introducido por Heitz (1928) para definir las regiones cromosómicas que aparecen condensadas durante el ciclo celular, que son heteropiconóticas a lo largo de la profase. Posteriormente Brown (1966) redefinió este término para distinguirlo de la heterocromatina facultativa. Se ha considerado la heterocromatina constitutiva como aquella que puede ser detectada citológicamente mediante bandeo C y que suele estar localizada a nivel centromérico. Su característica principal es que está constituida por secuencias altamente repetidas (ADN satélite) cuya composición suele ser heterogénea en la mayoría de las especies y su función evolutiva no está todavía clara. Algunos autores señalan que el ADN satélite podría considerarse como ADN parásito (Doolittle y Sapienza, 1980; Orgel y Crick, 1980), si bien es preciso indicar que la heterocromatina contiene muchas veces ADN funcional, centrómeros, telómeros o ADN ribosómico (Babu y Verma, 1987). También hay que señalar que no todas las regiones heterocromatínicas se visualizan después del bandeo C convencional.

Las bandas G tienen como primera y más importante aplicación la identificación precisa y detallada de los cromosomas individuales de los cariotipos (Sumner, 1990). La organización del ADN en el cromosoma puede definirse en función de las características de las bandas G y R (Wagner et al., 1993). La tabla I muestra las características generales más importantes de las bandas G y R (Bernardi, 1989).

TABLA I

Bandas G	Bandas R
Ricas en A+T	Ricas en G+C
Replicación tardía	Replicación temprana
Condensación temprana	Condensación tardía
Relativa escasez de secuencias Alu	Abundancia de secuencias Alu
Insensibilidad a la DNAasa I	Sensibilidad a la DNAasa I
Escasez de secuencias CpG	Abundancia de secuencias CpG

Las regiones organizadoras del nucleolo (NOR) se localizan específicamente en el cromosoma e inducen la formación del nucleolo en la interfase (Schwarzacher y Wachtler,

1983). Sus localizaciones específicas se consideran esenciales para caracterizar el cariotipo de una especie. El conocimiento de la organización de sus genes, su posición en los cromosomas, así como su organización estructural y funcional han sido tratadas en las revisiones de Smetana y Busch (1974), Ghosh (1976) y Schwarzacher y Wachtler (1983).

El ADN_r generalmente es rico en G+C (Attardi y Amaldi, 1970; Birnstiel et al., 1971; Miller, 1981; Wilson, 1982). Schweizer (1976) mostró que los NORs de ciertas plantas pueden ser marcados con cromomicina A3 (CA3) y mitramicina (MM), y desde entonces, utilizando estos compuestos, se ha observado que los NOR están ligados, en muchos organismos, a regiones ricas en G+C (Schmid, 1980; Deumling y Grelhuber, 1982; Schweizer et al., 1983; Fox y Santos, 1985; Cau et al., 1988). Sin embargo, mediante estas tinciones no es posible distinguir entre NOR y otras regiones ricas en G+C (Sumner, 1990). La impregnación con nitrato de plata no parece teñir ADN ribosómico ni ARNr, sino más bien una serie de proteínas no histónicas asociadas a las regiones de ADN_r, reflejando la actividad nucleolar o indicando los lugares potenciales de transcripción (Goodpasture y Bloom, 1975; Miller et al., 1976a, b; Howell, 1977, 1982; Schwarzacher et al., 1978; Hubbell, 1985).

1.2.2. BANDEO POR FLUOROCROMOS

El empleo por Caspersson et al. (1968) de un fluorocromo como inductor de bandas, significó el inicio de los marcajes cromosómicos. La quinacrina muestra fluorescencia brillante en presencia de ADN rico en pares de bases A+T y disminuye su fluorescencia cuando el ADN es rico en pares de bases G+C. Por lo tanto las zonas de ADN satélite rico en pares de bases A+T presentarían fluorescencia brillante con quinacrina, como sucede en diferentes especies de dípteros (Ellison y Barr, 1972; Ranganath et al., 1982) y plantas (Cionini et al., 1985). Pero no serán fluorescentes las de ADN satélite rico en G+C, como la región centromérica de los cromosomas del buey, *Bos taurus* (Schnedl, 1972). Sin embargo en ciertos mamíferos esto no se cumple; así, la región centromérica de los cromosomas de ratón (*Mus musculus*), que contiene ADN satélite rico en A+T, no presenta fluorescencia brillante con quinacrina (Rowley y Bodmer, 1971); en el ciervo indio (*Muntiacus muntjak*) la región de heterocromatina centromérica, rica también en A+T, presenta fluorescencia débil (Comings, 1971) y, en humanos, los centrómeros de los cromosomas números 1, 9 y 16 muestran un comportamiento similar (Corneo et al., 1970).

INTRODUCCIÓN

La preferencia de unión del fluorocromo Hoechst-33258 (H) a zonas ricas en A+T, produce en muchos casos patrones de bandas similares a las de la quinacrina. Este fluorocromo fue utilizado por primera vez por Hilwig y Gropp (1972) para inducir bandas en ratones (*Mus musculus* y *M. poschiavinus*) y en el erizo argelino (*Erinaceus algirus*). En ratones observaron que las regiones centroméricas tenían fluorescencia brillante contrariamente a lo que sucedía con quinacrina, aunque los brazos cromosómicos presentaban un patrón de bandas similar al Q. Sin embargo en el erizo argelino los cromosomas que se mostraban generalmente brillantes poseían fluorescencia débil en los segmentos heterocromatínicos, por lo que según estos autores el Hoechst sólo sería específico para ciertos tipos de heterocromatina.

En diferentes estudios se comprobó un aumento de la fluorescencia del Hoechst en disolución acuosa con ADN de diferente composición de bases (Weisblum y Haenssler, 1974; Comings, 1975, Latt y Wohlleb, 1975). Con el Hoechst no se produce una disminución de la fluorescencia por la presencia de guaninas, al contrario de lo que sucede con la quinacrina. Esto permite explicar por qué los centrómeros de ratón, ricos en A+T, no son fluorescentes con quinacrina y tienen fluorescencia brillante con el Hoechst, o por qué el ADN satélite del centeno, rico en G+C, es fluorescente con dicho compuesto.

El DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindol) tiene afinidad por pares de bases A+T y presenta fluorescencia brillante en las regiones de ADN satélite rico en esas bases como, por ejemplo, el de ratón (Schnedl et al., 1977b), mientras que no muestra fluorescencia en las regiones ricas en G+C (Schnedl et al., 1977b; Deumling y Greilhuber, 1982). Los patrones de bandas obtenidos con DAPI y Hoechst en cromosomas humanos, son esencialmente iguales (Schweizer, 1976; Schnedl et al., 1977a), aunque en algunas especies, como *Drosophila virilis*, Hoechst y DAPI producen patrones diferentes en ciertas regiones cromosómicas (Abraham et al., 1983).

Schweizer (1976) utilizó la Cromomicina A₃ (CA3) por primera vez en plantas, obteniendo un patrón de bandas inverso al que observó con DAPI, que en cromosomas humanos es similar al de las bandas R (Schweizer, 1980). La CA3 se une al ADN principalmente de doble cadena rico en pares de bases G+C (Ward et al., 1965).

INTRODUCCIÓN

El uso de este fluorocromo es útil para caracterizar zonas heterocromáticas (Leeman y Ruch, 1983), así como para visualizar regiones NOR en diferentes organismos, principalmente en invertebrados y vertebrados heterotermos, ya fuesen estas activas o inactivas en la interfase anterior (Schweizer, 1976; Schmid, 1980; Deumling y Grelhuber, 1982; Schweizer et al., 1983; Rocchi et al., 1984; Fox y Santos, 1985; Cau et al., 1988). Esto no es sorprendente si se tiene en cuenta que el ADN que se transcribe a ARNr tiene un alto contenido en G+C. Además Sinclair y Brown (1971) opinan que el ADNr de todas las especies tiene altos niveles de redundancia en G+C. Sin embargo, se desconoce por qué las regiones NOR de peces, anfibios, reptiles e incluso aves presentan especificidad por mitramicina y CA3 y por el contrario en mamíferos, las regiones NOR no muestran una significativa diferencia con estos tratamientos, siendo además el contenido en G+C de estos más elevado que en otros vertebrados (52-64%; Sinclair y Brown, 1971). Quizás el problema radica en que la fracción que representa el NOR en mamíferos es inferior a la de otros vertebrados (Sinclair y Brown, 1971). Por ejemplo cada uno de los NOR humanos tiene de 40 a 46 unidades repetidas de rDNA; sin embargo *Xenopus laevis* tiene de 400 a 500 unidades localizadas en cada uno de sus dos NORs (Brown et al., 1972; Bross y Krone, 1973).

En general, es común utilizar diferentes combinaciones de determinados compuestos fluorescentes con otros fluorescentes o con no fluorescentes. Estas combinaciones producen efectos diferentes sobre los cromosomas, permitiendo distinguir distintos tipos de heterocromatina. La combinación de Actinomicina D (AD), que tiene afinidad por el ADN rico en G+C, con el DAPI es muy utilizada ya que contrasta mejor el patrón de bandas que se puede obtener únicamente con la tinción DAPI (Schweizer, 1976). Esta mejora del contraste del bandeo también se produce cuando se combina la AD con el Hoechst (Jorgenson et al., 1978; Latt et al., 1980a, b).

Otra combinación muy utilizada también es la del antibiótico Distamicina A (DA), que tiene preferencia por el ADN rico en A+T, con el fluorocromo DAPI (Schweizer et al., 1978), la cual produce una fuerte fluorescencia, aunque esta sólo se localiza en algunas de las regiones ricas en A+T. La combinación más utilizada es la tritinción con CA3, DA y DAPI, que permite visualizar a la vez sobre los mismos cromosomas tanto los bandeos DA/DAPI como los bandeos CA3 (Schweizer, 1980). En algunos casos se sustituye la DA por

el Verde de Metilo (VM), ya que produce resultados similares al combinarlo con el DAPI, y el producto tiene una mayor estabilidad (Donlon y Magenis, 1983).

En general, podemos decir que el empleo de fluorocromos ha permitido caracterizar la cromatina con mayor precisión, siendo la composición del ADN el primer determinante de los patrones de fluorescencia específico, si bien, hoy en día no está claro el papel de las proteínas cromosómicas asociadas al ADN (John et al., 1985).

1.2.3. BANDEOS POR ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Los resultados poco satisfactorios encontrados en invertebrados y vertebrados heterotermos mediante técnicas de bandeo convencional, han llevado a desarrollar nuevos métodos de estudio de la organización del genoma. Así, Miller et al. (1983), han sugerido la utilización de enzimas de restricción (ER) para inducir el bandeo cromosómico en vertebrados heterotermos, resistentes a los bandeos clásicos.

La respuesta de regiones heterocromatínicas a la digestión por endonucleasas de restricción se explicó en función de la abundancia de las dianas de reconocimiento para un enzima en concreto (Bianchi et al., 1985; Babu, 1988; Sentís et al., 1989; López-Fernández et al., 1991). Esto posibilita el corte y posterior extracción del ADN, lo cual induce pérdida o disminución de tinción en aquellas regiones donde las dianas del enzima son abundantes (Bianchi y Bianchi, 1987; Lloyd y Thorgaard, 1988; Sentís et al., 1989; González-Tizón et al., 1993a). Según esto, el análisis mediante endonucleasas de restricción, se puede aplicar para caracterizar bioquímicamente las regiones heterocromatínicas en función de la abundancia o escasez de dianas y así reconocer regiones más o menos ricas en determinadas secuencias.

El desarrollo de las técnicas de digestión con ER (Miller et al., 1983; Mezzanotte et al., 1983) aportó importantes resultados en peces (Lloyd y Thorgaard, 1988; Cau et al., 1988; Lozano et al., 1991), anfibios (Schimid y Almeida, 1988; Beçak et al., 1988; Herrero et al., 1992), insectos (Sentís et al., 1986, 1988, 1989; Gosálvez et al., 1987; Marchi y Mezzanotte, 1988; López-Fernández et al., 1988, 1989) y plantas (Frediani et al., 1987; Lozano et al., 1990; Schubert, 1990; Kamisugi et al., 1992), permitiendo caracterizar la heterocromatina,

detectar heterogeneidad en regiones cromosómicas concretas y localizar bandas crípticas no observables con técnicas convencionales (Gosalvez et al., 1989; Ludeña et al., 1990; Juan et al., 1990; López-Fernández et al., 1991; Sánchez et al., 1993).

Sin embargo, el mecanismo de actuación de las endonucleasas es objeto de controversia. En primer lugar, si no se detecta tinción en una región específica es que deben existir suficientes dianas para el enzima empleado. Pero lo contrario no tiene por qué ser cierto. Si una región no es digerida podría deberse a que, aún habiendo suficiente número de secuencias, éstas no fueran accesibles a la actuación de los enzimas. Esto podría ser debido a cuestiones de organización de la cromatina, a la disposición de las secuencias de la fibra de cromatina, a la metilación de las secuencias diana o a características del enzima utilizado (Lica y Hamkalo, 1983; Bianchi y Bianchi, 1987; Burkholder, 1989). Además, aún siendo accesibles las dianas, la asociación con determinadas proteínas o aspectos relativos a la organización de la heterocromatina, pueden impedir la liberación de los fragmentos cortados (Bianchi et al., 1985).

La aplicación conjunta de fluorocromos y bandeo con endonucleasas de restricción ha sido utilizada en diversas especies para evidenciar la heterogeneidad subyacente a la heterocromatina constitutiva detectada con el bandeo C convencional (Rocchi, 1982; John et al., 1985; Babu y Verma, 1986; Babu, 1988; Sentís et al., 1989; Bianchi et al., 1990; Juan et al., 1990; López-Fernández et al., 1991; Sánchez et al., 1991).

1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS CROMOSOMAS DE BIVALVOS

El número de especies de bivalvos con número cromosómico conocido es inferior a 200, y a tan solo 90 de ellas se les elaboró el cariotipo. Si consideramos que existen unas 8.000 especies descritas de estos moluscos (Boss, 1982), observamos que los estudios citogenéticos de esta clase han tenido un escaso desarrollo.

Como ya se señaló, la dotación diploide de las tres especies de mejillón europeo es de $2n = 28$ cromosomas. Todos los autores coinciden en señalar que el de *M. edulis* está formado por 6 pares de cromosomas metacéntricos y 8 pares de cromosomas submetatolocéntricos, no observándose cromosomas telocéntricos (Thiriot-Quévieux y Ayraud,

INTRODUCCIÓN

1982; Moynihan y Mahon, 1983; Ieyama, 1983; Dixon y Flavell, 1986). En el caso de *M. galloprovincialis* Thiriot-Quévieux y Ayraud (1982) e Ieyama(1983) encuentran 5 pares de cromosomas metacéntricos y 9 pares de cromosomas submeta- subtlocéntricos. Sin embargo, otros autores que han caracterizado a *M. galloprovincialis* observan 6 pares de cromosomas metacéntricos y 8 pares de cromosomas submeta- subtlocéntricos al igual que en *M. edulis* (Dixon y Flavell, 1986; Pasantes et al., 1990).

Thiriot-Quévieux y Ayraud (1982) creen que el cromosoma 2 sería metacéntrico en *M. edulis* y submetacéntrico en *M. galloprovincialis*, y habría sufrido una inversión pericéntrica, por lo que según los autores sería suficiente para diferenciar *M. edulis* de *M. galloprovincialis*. Sin embargo, en un trabajo posterior, Thiriot-Quévieux(1984) indica que estas evidencias observadas no son suficientes para separar estos taxones.

Por lo que respecta a *M. trossulus*, su cariotipo está caracterizado por 6 pares de cromosomas metacéntricos, 2 de submetacéntricos y 6 de subtlocéntricos (Insua Pombo, 1992)

Las técnicas de bandeo en moluscos bivalvos tienen un escaso desarrollo y por lo tanto el número de trabajos existentes es pequeño. Los primeros autores en realizar algún tipo de aproximación a la distribución de las bandas en bivalvos fueron Rodríguez-Romero et al. (1979) que obtuvieron un patrón de bandas G en *Crassostrea virginica*. Los posteriores trabajos de Moore et al. (1986), en los que mostraron un idiograma de bandas G en *M. edulis*, y de Méndez et al. (1990), que realizaron un patrón de bandas con 2xSSC en *M. galloprovincialis*, representan los únicos estudios de aplicación de técnicas de bandeo que dieron como resultado una distribución longitudinal de bandas a lo largo de los brazos cromosómicos. La dificultad en realizar estos tipos de bandeo en vertebrados heterotermos e invertebrados, se debe, según ciertos autores, a la ausencia de diferenciación en cuanto a porcentaje de bases y/o estructura de los compartimentos cromosómicos responsables de los bandeos G y R como ocurre en vertebrados superiores (Medrano et al., 1988; Schmid y Almeida, 1988; Holmquist, 1989).

La localización de las regiones organizadoras del nucleolo se han logrado en un mayor número de especies. Así Dixon et al. (1986) y Cornet (1993) obtuvieron los NORs en

INTRODUCCIÓN

M. edulis; Insua y Thiriot-Quévieux (1991, 1993) y Thiriot-Quévieux e Insua (1992) en cuatro tipos de ostra (*Ostrea edulis*, *O. denselamellosa*, *O. puelchana* y *Crassostrea gigas*); e Insua Pombo (1992) en tres tipos de mejillón (*M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*), en dos de almeja (*Ruditapes philippinarum* y *Venerupis aurea*) y en *Perna perna*.

Las bandas C únicamente se obtuvieron en *M. edulis* (Dixon et al., 1986), en *O. denselamellosa* (Insua y Thiriot-Quévieux, 1991) y en *M. edulis*, *M. trossulus*, *Cerastoderma edule* y *Venerupis pullastra* (Insua Pombo, 1992).

Hasta el momento ningún autor ha detectado la presencia de cromosomas sexuales en bivalvos. A este respecto los estudios sobre localización de las zonas heterocromáticas son importantes, puesto que se ha señalado el papel que la heterocromatina constitutiva podría tener en la determinación sexual de algunas especies de vertebrados e invertebrados (Bull, 1983). Así, en algunas especies que tampoco poseen cromosomas sexuales ha sido observado un dimorfismo en relación a la cantidad de heterocromatina constitutiva (Bull, 1983). Dixon y McFadzen (1987) encontraron diferencias en el número de bloques heterocromáticos en machos y hembras de *M. edulis*, existiendo una mayor cantidad de heterocromatina en machos. Sin embargo estas diferencias que son significativas entre individuos de diferente sexo también lo son entre individuos del mismo sexo.

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

La existencia en Galicia de las rías como abrigo natural y la riqueza en nutrientes de sus aguas, permite que más de 3.200 parques de cultivo estén dedicados a la producción del mejillón. Ésta fue de 230.000 Tn. en 1992, lo cual representa el 99% de la española y el 50% de la mundial. En el cultivo y comercialización del mejillón trabajan actualmente de forma directa o indirecta unas 14.000 personas.

En la explotación de los parques de cultivo no se han producido grandes avances técnicos en los últimos años. Estos se han basado en mejorar el tipo de flotación de las bateas para permitir colocar una mayor cantidad de cuerdas por parque de cultivo, ya que no se conceden nuevos permisos para crear nuevas bateas. Así, uno de los principales problemas que se está observando es la progresiva disminución del número de mejillones cría (hasta 7 mm) en las rocas de las principales zonas de recolección (de Baiona a Fisterra). Pese a esto, los productores, destinan únicamente el 1% de las cuerdas de las bateas como colectores. Estos motivos de tipo socioeconómico, la controversia existente en relación al status taxonómico, su existencia en la práctica totalidad de los mares del mundo y el desconocimiento de la citogenética de bivalvos, nos indujeron a realizar estudios con mejillones.

Es indudable que la primera etapa en cualquier estudio citogenético de una especie consiste en la determinación del número cromosómico, la descripción de su morfología cromosómica y la determinación de diversos parámetros como: longitud relativa, relación entre los brazos cromosómicos, índices centroméricos, etc. Posteriormente es necesario realizar patrones de bandeo que permitan identificar los cromosomas y dentro de ellos regiones cromosómicas específicas.

En este trabajo nos hemos planteado inicialmente tratar de inducir patrones de bandas para poder identificar cada par cromosómico de la dotación diploide del mejillón, tanto en metafases de células de branquias de individuos adultos como en metafases de larvas. Además, realizar un estudio de la heterocromatina en las tres especies de mejillón europeo: *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, en base a la obtención de las bandas C, NORs y localización, mediante fluorocromos, de las posibles regiones ricas en pares de bases A+T y/o G+C. A continuación detectar la posible existencia de heterogeneidad de la

OBJETIVOS

heterocromatina mediante la digestión cromosómica *in situ* con diversas endonucleasas de restricción.

Finalmente, realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos en las tres especies, con el fin de detectar las posibles diferencias existentes entre ellas, intentando clarificar el status taxonómico del mejillón europeo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL DE ESTUDIO

El género *Mytilus* se encuentra en aguas litorales y sublitorales a poca profundidad, aunque excepcionalmente se puede encontrar a profundidades mayores. Aparece tanto en aguas oceánicas como salobres, sobre todo en donde hay un movimiento importante de agua, viviendo sobre gran variedad de sustratos como rocas, piedras, conchas de animales muertos y, en general, cualquier superficie que le permita una fijación segura, y siempre en zonas donde no abunden las algas fucáceas con las que, por causas desconocidas, son incompatibles.

Los ejemplares estudiados en este trabajo proceden de diversas poblaciones del litoral europeo:

- * *Mytilus galloprovincialis*: Peñíscola (Castellón); Cullera (Valencia); Almería; Nerja (Málaga); Marbella (Málaga); Baiona (Pontevedra); Fisterra (La Coruña).
- * *Mytilus edulis*: Zoutelande (Zeeland, Holanda); Harlesiel (Harlinger land, Alemania).
- * *Mytilus trossulus*: Dahme (Bahía de Mecklenburger, Alemania).

Figura 3

Distribución de las poblaciones de mejillón estudiadas.



3.2. MANTENIMIENTO DE LOS MEJILLONES

Recogimos los ejemplares de mejillón de las zonas intermareales. Los individuos de *M. galloprovincialis* de las poblaciones de Fisterra y Baiona los utilizamos directamente, bien para obtención de metafases a partir de las branquias o bien para obtener desoves. El resto de los individuos de las poblaciones de *M. galloprovincialis* los mantuvimos en cámara a $17\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Los mejillones de las poblaciones de Zoutelande, Harlesiel y Dahme estuvieron a 4°C durante los primeros días para evitar el desove. Además, para los de la población de Dahme rebajamos la salinidad del agua desde 35‰ hasta 10‰.

3.2.1. OBTENCIÓN DE METAFASES DE INDIVIDUOS ADULTOS

Alrededor de 40 individuos de talla inferior a 25 mm de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* los mantuvimos durante 10 a 15 días, para activarles el crecimiento, en recipientes con agua de mar en una cámara con fotoperiodo de 12 horas y a una temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ para *M. galloprovincialis* y de $15\pm 1^{\circ}\text{C}$ para *M. edulis*. Durante ese tiempo los alimentamos con una mezcla de las algas *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica*.

Con el fin de bloquear la células mitóticas en metafase, los mejillones fueron sometidos a tratamiento con colchicina, a una concentración final de 0'005%, durante 7-10 horas. Obtuvimos las metafases según el siguiente protocolo:

- Disección de los mejillones para la obtención del tejido branquial.
- Dos choques hipotónicos con KCl al 0'56% durante 15 min cada uno a temperatura ambiente.
- Dos fijaciones con carnoy (etanol : ác. acético; 3 : 1) a 4°C durante 10 min.
- Dos nuevas fijaciones con carnoy a la misma temperatura durante 20 min.
- Disociación del tejido en agua acetilada al 45%.
- Extensión de la suspensión celular sobre portaobjetos precalentados a $43\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.2.2. OBTENCIÓN DE METAFASES DE LARVAS

Para inducir el desove en *M. galloprovincialis* utilizamos individuos adultos de las poblaciones de Baiona y Fisterra de tamaño superior a 8 cm; para *M. edulis* utilizamos

MATERIAL Y MÉTODOS

individuos de la población de Zoutelande de tamaño superior a 4 cm, y para *M. trossulus* los utilizamos de la población de Dahme con tamaños superiores a 1'5 cm. En el laboratorio los introducimos en recipientes individuales induciéndoles el desove mediante un choque térmico de 27°C para los mejillones gallegos y de 20°C para los más boreales.

Mezclamos óvulos y espermatozoides en una cápsula Petri a una concentración de 1.000 espermatozoides/ml y de 15-30 óvulos/ml (Pechenik et al., 1990), y añadimos penicilina y streptomina para una concentración de 500 u/ml. Finalmente, colocamos los espermatozoides y óvulos en la oscuridad a 18°C, para 20 horas después de la fecundación, cuando se han formado las larvas trocóforas, añadir colchicina (concentración final, 0'067 µgr/ml), y cuatro horas más tarde, obtener las preparaciones cromosómicas según el siguiente protocolo:

- Centrifugación de las larvas a 1.200 r.p.m.
- Tratamiento con KCl al 0'56% durante 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugación a 1.200 r.p.m.
- Fijación con carnoy (etanol : ác. acético; 3 : 1) a 4°C durante 10 min.
- Centrifugación a 1.200 r.p.m. a 4°C.
- Dos lavados con carnoy a 4°C.
- Resuspensión del material y extensión en portaobjetos a temperatura ambiente dejando secar al aire.

3.3. MEDIDAS DE LOS CROMOSOMAS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Medimos las longitudes de los brazos largos y del total del cromosoma de 12 metafases de la subpoblación de Cullera con 5 pares de cromosomas metacéntricos, de la subpoblación de Cullera con 6 pares de cromosomas metacéntricos, de células de larvas de la población de Fisterra y de células de branquias de individuos adultos de la población de Fisterra. Realizamos estas medidas con un analizador de imagen Magiscan de Joyce-Loebl Ltd. Realizamos la media de las cromátidas en aquellos casos en los que estas estuviesen separadas; a continuación calculamos la media de la longitud de los brazos largos y la media del total para cada par cromosómico. Hallamos la longitud relativa ($100 \times \text{longitud del cromosoma} / \text{longitud total del complemento haploide}$) y el índice centromérico ($100 \times \text{longitud brazo corto} / \text{longitud total del cromosoma}$) de cada cromosoma. Finalmente

calculamos la media y el error standard ($\sigma/N^{1/2}$) de las longitudes relativas y de los índices centroméricos. Para nombrar cada tipo cromosómico utilizamos la nomenclatura establecida por Levan et al. (1964).

El estudio de la existencia de posibles diferencias entre las distintas poblaciones lo realizamos mediante un análisis de varianza en las longitudes relativas y en el caso de la comparación entre pares de variables utilizando una t-student con el uso del programa SPSS/PC.

3.4. TÉCNICAS DE BANDEO CROMOSÓMICO

3.4.1. BANDEO C

Incubamos las preparaciones cromosómicas, envejecidas de 3 a 7 días, en CIH 1N durante 5 minutos y a temperatura ambiente. Después de un lavado abundante en agua destilada, las introducimos en una solución saturada de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ a 60° C durante 3-7 minutos, lavándolas nuevamente en agua destilada e incubándolas, durante 15 minutos, en 2xSSC (0'3M cloruro sódico, 0'03M citrato trisódico) a 60° C (Sumner, 1972).

A continuación y después de dejar que secan al aire, las teñimos con una solución de Giemsa al 10% en tampón fosfato pH 6'88, o con Naranja de acridina (NA) al 0'01% en Tampón Sörensen's (0'06M; pH 6'5) durante 5 minutos.

3.4.2. BANDEO G

Incubamos las extensiones cromosómicas, envejecidas durante tres días, en una solución de tripsina (Difco 1:250) al 0'01%, a 37°C, durante 7-20 segundos. A continuación, las pasamos a una solución de suero bovino fetal al 5% en tampón fosfato pH 6'88 durante 8 segundos; lavándolas en el tampón fosfato y tiñéndolas con solución Giemsa al 4% en tampón fosfato (Seabright, 1971).

Por otra parte, tratamos de inducir las bandas G por otros métodos convencionales. Uno de ellos consistió en el tratamiento de las preparaciones con una solución de 2xSSC a 60°

y a 37°C durante tiempos variables desde 15 a 90 minutos (Sumner et al., 1971). Utilizamos, también, el método de Shiraishi y Yosida (1972), consistente en introducir los portaobjetos en una solución de urea al 10% a 80°C durante 4 min. Además, tratamos las extensiones citogenéticas con una solución 2M de NaCl y 5M de Urea (Kato y Yosida, 1972). La tinción empleada fue siempre con Giemsa al 4% en tampón fosfato pH 6'88.

3.4.3. TINCIÓN CON PLATA

Añadimos 2 gotas de pipeta Pasteur de una disolución de gelatina (2% gelatina; 1% ácido fórmico) y cuatro gotas de solución de nitrato de plata (0'5 gr/ml) sobre las extensiones cromosómicas previamente colocadas en una placa caliente a 43°C. Tapamos con un cubreobjetos y dejamos teñir durante 3-6 minutos, lavando abundantemente con agua destilada (Howell y Black, 1980).

3.4.4. BANDEO CON FLUOROCROMOS

Realizamos la tinción de las preparaciones cromosómicas con los diferentes fluorocromos de acuerdo a los siguientes protocolos:

3.4.4.1. QUINACRINA (Caspersson et al., 1968)

- 1.- 10-15 min en quinacrina al 50% en McIlvaine pH 5'4.
- 2.- Lavar con agua.
- 3.- 1 min en McIlvaine pH 5'4.
- 4.- Montar en McIlvaine pH 5'4

3.4.4.2. HOECHST - 33258 (Hilwig y Gropp, 1972).

- 1.- 10-15 min en una solución de Hoechst-33258 (0'5 µgr/ml) en McIlvaine pH 7'0.
- 2.- Lavar con agua.
- 3.- Montar en McIlvaine pH 7'0.

3.4.4.3. DAPI (Schweizer y Nagl, 1976).

- 1.- 20-30 min de solución de DAPI (0'33 µgr/ml) en McIlvaine pH 7'0.
- 2.- Lavar con agua.
- 3.- Montar en solución de montaje (5 ml de glicerol + 5 ml de McIlvaine pH 7'0 + 50 µl de Cl₂Mg al 1%).

3.4.4.4. CROMOMICINA A3 (Schweizer, 1976; 1980).

- 1.- 1-2 horas en CA3 (0'5 mgr/ml) de solución stock de CA3 (5 ml de McIlvaine pH 7'0 + 0'1 ml de Cl₂Mg 50mM + 4'9 ml de agua).
- 2.- Lavar con agua.
- 3.- Montar en solución de montaje.
- 4.- Dejar durante dos días a temperatura de ambiente para estabilizar.

3.4.4.5. DISTAMICINA A/DAPI (Schweizer et al.,1978; Schweizer, 1980).

- 1.- 10-15 min en una solución de DA (0'1 mgr/ml) en McIlvaine pH 7'0.
- 2.- Lavar con agua.
- 3.- 20-30 min de solución de DAPI (0'33 µgr/ml) en McIlvaine pH 7'0.
- 4.- Lavar con agua.
- 5.- Montar en solución de montaje.

3.4.4.6. CROMOMICINA A3/DISTAMICINA A/DAPI (Schweizer, 1980).

- 1.- 1-2 horas en CA3 (0'5 mgr/ml) de solución stock de CA3.
- 2.- Lavar con agua.
- 3.- 10-15 min en una solución de DA (0'1 mgr/ml) en McIlvaine pH 7'0.
- 4.- Lavar con agua.
- 5.- 20-30 min de solución de DAPI (0'33 µgr/ml) en McIlvaine pH 7'0.
- 6.- Lavar con agua.
- 7.- Montar en solución de montaje.

3.4.4.7. ACTINOMICINA D/DAPI (Schweizer, 1976).

- 1.- 20-30 min de solución de DAPI (0'33 µgr/ml) en McIlvaine pH 7'0.
- 2.- Lavar con agua.
- 3.- 20 min de AD (0'2 mgr/ml) de solución de AD (1 : 5; McIlvaine pH 5'5 : Agua).
- 4.- Lavar con agua.
- 5.- Montar en McIlvaine pH 7'0.

3.4.4.8. ACTINOMICINA D/HOECHST (Jorgenson et al., 1978).

- 1.- 10-15 min en una solución de Hoechst-33258 (0'5 µgr/ml) en McIlvaine pH 7'0.
- 2.- Lavar con agua.
- 3.- 20 min de AD (0'2 mgr/ml) de solución de AD (1 : 5; McIlvaine pH 5'5 : Agua).
- 4.- Lavar con agua.
- 5.- Montar en McIlvaine pH 7'0.

3.4.4.9. VERDE DE METILO/DAPI O VM/HOECHST (Donlon y Magenis, 1983)

- 1.- 30 min en solución de VM (0'352 mg/ml) de McIlvaine pH 7'0.
 - 2.- Lavar con agua.
 - 3.- 20-30 min de solución de DAPI (0'33 µgr/ml) en McIlvaine pH 7'0.
 - 4.- Lavar con agua.
 - 5.- Montar en solución de montaje.
- o bien:
- 3'.- 10-15 min en una solución de Hoechst-33258 (0'5 µgr/ml) en McIlvaine pH 7'0.
 - 4'.- Lavar con agua.
 - 5'.- Montar en solución de montaje.

3.4.5. TRATAMIENTO CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

En este trabajo hemos utilizado las endonucleasas de restricción Hae III, Cfo I, Hpa II, Msp I, Apa I, Alu I, Taq I, Dpn I, Hinf I y Eco RI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparamos las soluciones enzimáticas en los correspondientes tampones de incubación (tabla II, pág. 28) a diferentes concentraciones que variaron desde 0'3 hasta 1'0 u/μl en función de su actividad. Todas las endonucleasas fueron suministradas por Boehringer Mannheim GmbH. Añadimos 50 μl de solución enzimática a cada portaobjetos, cubriéndolos con un cubreobjetos y realizando la incubación durante 6 horas en cámara húmeda a 37°C (60°C para Taq I y 30°C para Apa I). Finalmente, lavamos los portaobjetos con agua destilada y los teñimos con una solución del colorante Giemsa al 4% en tampón fosfato pH 6'88 durante 10-20 minutos.

ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN: Hae III

Aislada de *Haemophilus aegyptius*.

Secuencia de reconocimiento : ...GG[∇]CC...
 ...CC_ΔGG...

Tampón de incubación: M

ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN: Cfo I

Aislada de *Clostridium formicoaceticum*

Secuencia de reconocimiento: ...GCG[∇]C...
 ...C_ΔGCG...

Tampón de incubación: L

ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN: Hpa II

Aislada de *Haemophilus parainfluenzae*.

Secuencia de reconocimiento: ...C[∇]CGG...
 ...GGC_ΔC...

Tampón de incubación: L

ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN: Msp I

Aislada de *Acinetobacter iwoffii*

MATERIAL Y MÉTODOS

Secuencia de reconocimiento: ...C[∇]CGG...
...GGC_ΔC...

El enzima corta el ADN estando la citosina interna metilada o no metilada.

Tampón de incubación: L

ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN: Apa I

Aislada de *Acetobacter pasteurianus*

Secuencia de reconocimiento: ...GGGCC[∇]C...
...C_ΔCCGGG...

Tampón de incubación: A

ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN: Alu I

Aislada de *Arthrobacter luteus*.

Secuencia de reconocimiento: ...AG[∇]CT...
...TC_ΔGA...

Tampón de incubación: A

ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN: Taq I

Aislada de *Thermus acuaticus*

Secuencia de reconocimiento: ...T[∇]CGA...
...AGC_ΔT...

Tampón de incubación: B

ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN: Dpn I

Aislada de *Diplococcus pneumoniae*

Secuencia de reconocimiento: ...G^mA[∇]TC...
...CT_{Δm}AG...

Tampón de incubación: A

3.5. FOTOGRAFÍADO

Fotografamos las metafases empleando un microscopio Microphot AFX de Nikon equipado con lámpara halógena y de mercurio y con objetivos de 100X plan apoacromático y 100X fluor. Las combinaciones de filtros que utilizamos para cada colorante se especifican en la tabla III:

TABLA III

Filtro	Espejo Dicroico	Filtro Excitación	Filtro Barrera	Fluorescente
UV-1A	400	365/10	400	H/DAPI
BV-1A	455	435/10	460	CA3/Q
B-2A	510	450-490	520	NA

Las películas utilizadas fueron Kodalith, Kodak Tri-X y Kodak Gold 400 Asa.

4. RESULTADOS

4.1. NÚMERO Y MORFOLOGÍA DE LOS CROMOSOMAS

La dotación diploide de *M. galloprovincialis* (figuras 4a, b, c, d), *M. edulis* (figura 5a) y *M. trossulus* (figura 5b) es semejante en las tres especies e igual a 28 cromosomas, como ya observaron otros autores. Sin embargo, y ocasionalmente, encontramos la existencia de individuos *M. galloprovincialis* con metafases triploides en las poblaciones de Baiona y Fisterra (figura 5c), aunque no observamos ningún tipo de diferenciación morfológica en la concha o en el cuerpo de los mejillones.

La realización de los cariotipos de individuos procedentes de las diferentes poblaciones de *M. galloprovincialis* estudiadas y el análisis detallado de su morfología cromosómica, permitió detectar variaciones respecto al número de cromosomas metacéntricos. Así, mientras que para las poblaciones gallegas el 100% de los individuos presentan 6 pares de cromosomas metacéntricos y 8 pares de cromosomas submetacéntricos (figura 4a, c), en las poblaciones mediterráneas hemos encontrado que el 33'3% de los individuos en el caso de Peñíscola, el 29'2% de los de Cullera, el 30'4% de Almería, el 44'4% de Nerja y el 61'0% de Marbella tenían, únicamente, 5 pares de cromosomas metacéntricos, siendo el resto de los cromosomas submetacéntricos (figuras 4b, d).

Por ello, realizamos las medidas de longitud del brazo largo (q) y del total de cada una de las cromátidas del cromosoma y calculamos la longitud relativa y el índice centromérico de metafases de *M. galloprovincialis* procedentes de células de larvas y células de adultos de Fisterra, así como metafases de branquias de individuos adultos de Cullera que presentasen 5 ó 6 pares de cromosomas metacéntricos (tabla IV, figura 6).

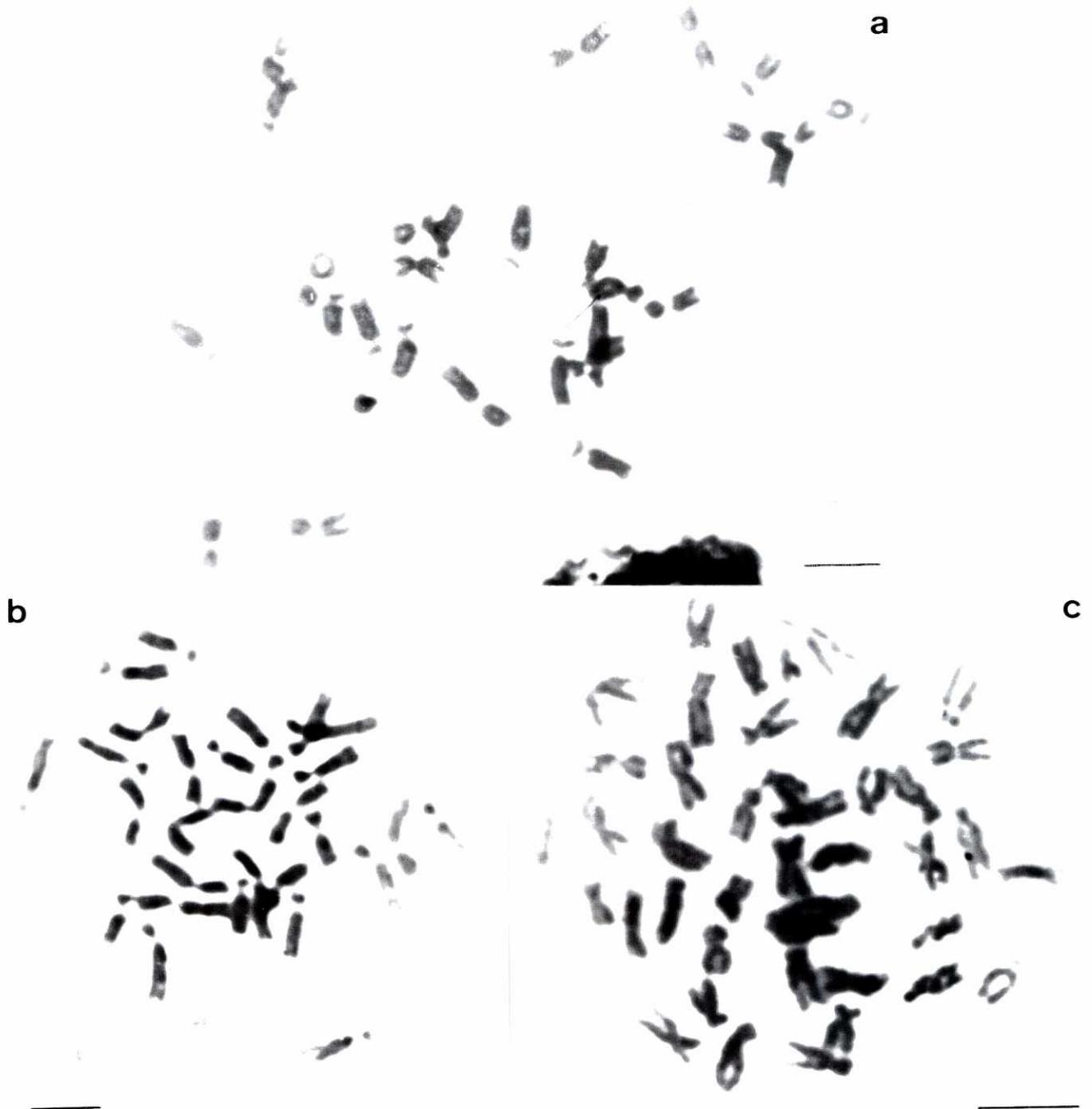
Comprobamos que las diferencias en longitud relativa entre las diferentes poblaciones son pequeñas. Así, únicamente son significativas las diferencias en longitud relativa entre el cromosoma 4 de la subpoblación de Cullera, que tiene 6 pares de metacéntricos, con el cromosoma 4 de metafases de larvas y adultos de Fisterra ($t=2'634$ y $t=2'681$; $p<0'05$, respectivamente), y entre los cromosomas 14 de metafases de larvas y branquias de Fisterra ($t=4'266$; $p<0'05$).

FIGURA 4



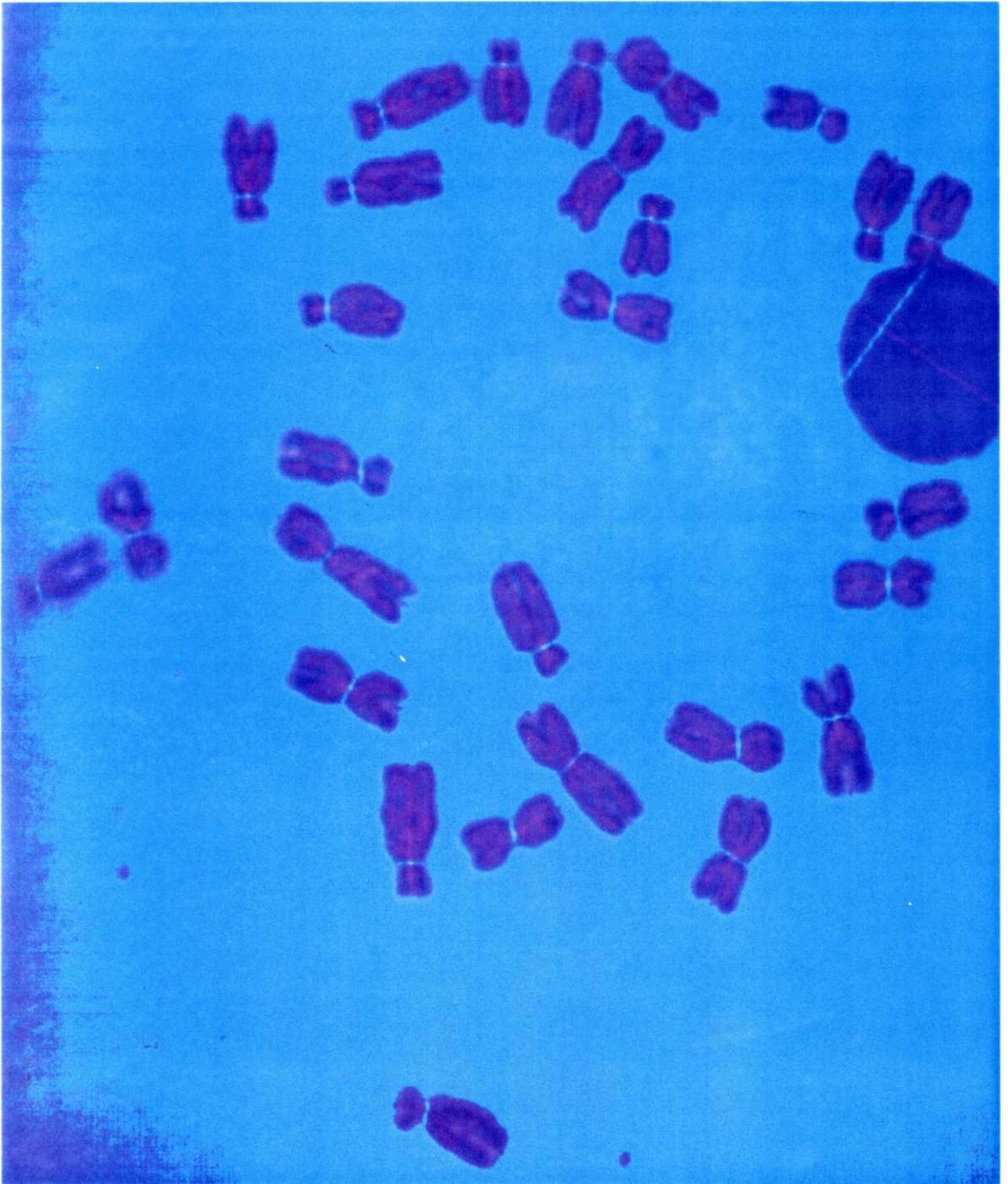
a) Cariotipo de larva de Fisterra. **b)** Cariotipo de mejillón adulto de Cullera con 5 pares de cromosomas metacéntricos. **c)** Metafase de larvas de Fisterra. **d)** Metafase de mejillón adulto de Cullera. Barra 5µm.

FIGURA 5



a) Metafase de larvas de *M. edulis* (Zoutelande). b) Metafase de larvas de *M. trosulus* (Dahme). c) Metafase triploide de mejillón adulto de *M. galloprovincialis* (Fisterra). Barra 5 μ m.

FIGURA 6



Metafase de *M. galloprovincialis* digitalizada
para efectuar la medida del brazo largo y del total del cromosoma.

RESULTADOS

En relación a los índices centroméricos observamos que los valores son muy similares en las cuatro poblaciones analizadas, exceptuando el cromosoma 2 de la subpoblación de Cullera 5-9. Los valores de los índices centroméricos de los cromosomas metacéntricos varían entre valores de 39'38 y 46'08, por lo que no hay problema en su clasificación de acuerdo a los criterios de Levan et al. (1964). Por el contrario, los cromosomas submetacéntricos y subtelocéntricos son difíciles de diferenciar ya que los valores de los índices centroméricos varían entre 21'52 y 29'40, encontrándose alrededor del límite que separa ambas categorías (25'0). Por esta razón, en muchos casos es difícil especificar a qué tipo cromosómico pertenece un par determinado. Sí se observa que los cromosomas más pequeños en longitud relativa (10, 12, 13 y 14) son, generalmente, más submetacéntricos que los grandes (tabla V)

TABLA IV

M. galloprovincialis

Cr. Nº	Larvas Fisterra		Adultos Fisterra		Adultos Culle. 5-9		Adultos Culle. 6-8	
	Long. Rel.	Ind. Cent.	Long. Rel.	Ind. Cent.	Long. Rel.	Ind. Cent.	Long. Rel.	Ind. Cent.
1	9.48±0.12	39.67±0.91	9.86±0.23	42.59±1.38	9.51±0.23	39.38±1.06	9.54±0.29	42.09±0.15
2	8.30±0.13	39.59±1.35	8.35±0.30	41.28±1.25	8.67±0.15	22.43±1.49	8.79±0.36	40.87±0.11
3	8.03±0.16	23.38±0.98	8.17±0.27	24.76±1.62	7.91±0.12	25.94±2.02	8.29±0.20	23.17±0.11
4	7.73±0.16	45.75±1.21	7.72±0.16	43.84±0.98	8.17±0.21	41.17±1.01	8.29±0.14	43.37±0.68
5	7.26±0.11	44.64±1.02	7.63±0.12	44.41±1.03	7.52±0.10	44.38±0.81	7.42±0.17	46.08±0.98
6	7.63±0.15	21.52±0.68	7.46±0.21	22.67±1.39	7.48±0.10	22.27±1.44	7.69±0.09	24.92±1.07
7	7.24±0.07	23.42±0.97	7.19±0.14	25.15±1.58	7.03±0.08	22.35±1.20	6.99±0.08	23.46±0.88
8	6.77±0.09	42.99±0.73	7.20±0.24	42.62±1.50	7.12±0.08	44.12±1.09	6.84±0.19	43.98±1.82
9	7.08±0.06	23.13±1.67	6.70±0.30	28.74±1.34	6.80±0.07	23.78±0.73	6.94±0.16	25.41±1.61
10	6.68±0.10	25.63±0.56	6.61±0.13	25.08±1.12	6.53±0.06	22.45±1.40	6.54±0.13	23.76±0.86
11	6.10±0.16	40.46±1.45	6.41±0.19	41.72±1.21	6.33±0.18	42.75±1.37	5.92±0.27	41.97±0.65
12	6.44±0.07	25.47±0.72	6.07±0.20	26.53±1.17	6.11±0.12	25.92±1.60	6.30±0.12	26.54±1.64
13	5.93±0.11	26.36±1.24	5.65±0.13	24.94±1.30	5.67±0.13	23.57±1.26	5.41±0.25	25.78±1.54
14	5.34±0.07	28.87±0.87	4.82±0.10	29.40±1.17	5.14±0.14	25.80±1.31	5.05±0.12	25.31±1.61

Larvas Fisterra: metafases de larvas de desoves de mejillones de la población de Fisterra.

Branquias Fisterra: metafases de branquias de adultos de la población de Fisterra

Branquias Culle. 5-9: metafases con 5 pares de cromosomas metacéntricos de la población de Cullera.

Branquias Culle 6-8: metafases con 6 pares de cromosomas metacéntricos de la población de Cullera.

Cr. Nº: Cromosoma número; **Long. Rel. :** Longitud relativa; **Ind.Cent.:** Índice centromérico

RESULTADOS

Las metafases procedentes de células de larvas o células de branquias de individuos adultos de *M. edulis* presentaron en todos los casos 6 pares de cromosomas metacéntricos y 8 pares de cromosomas submeta- subteloecéntricos (figura 5a). Las células de larvas de *M. trossulus* muestran, en todos los casos, 6 pares de cromosomas metacéntricos y 6 de submeta- subteloecéntricos, al igual que observamos en *M. edulis* (figura 5b).

TABLA V

M. galloprovincialis

Cr. N°	Larvas Fisterra	Adultos Fisterra	Adultos Culle. 5-9	Adultos Culle. 6-8
1	m	m	m	m
2	m	m	st	m
3	st	st/sm	sm/st	st
4	m	m	m	m
5	m	m	m	m
6	st	st	st	st/sm
7	st	sm/st	st	st
8	m	m	m	m
9	st	sm	st	sm/st
10	sm	sm/st	st	st
11	m	m	m	m
12	sm/st	sm	sm/st	sm/st
13	sm	st/sm	st	sm/st
14	sm	sm	sm	sm/st

m: Cromosoma metacéntrico ($37.5 < IC < 50$). sm: Cromosoma submetacéntrico ($25.0 < IC < 37.5$). st: Cromosoma subteloecéntrico ($12.5 < IC < 25.0$). (Según Levan et al., 1964); **Larvas Fisterra**: metafases de larvas de desoves de mejillones de la población de Fisterra. **Branquias Fisterra**: metafases de branquias de adultos de la población de Fisterra. **Branquias Culle. 5-9**: metafases con 5 pares de cromosomas metacéntricos de la población de Cullera. **Branquias Culle. 6-8**: metafases con 6 pares de cromosomas metacéntricos de la población de Cullera. Cr. N°: Cromosoma número.

4.2. BANDEOS CONVENCIONALES

4.2.1. BANDAS G

La aplicación de técnicas citogenéticas para inducir bandeo cromosómico constituye uno de los hechos más significativos y necesarios para obtener una mayor información que permita identificar sin subjetividad los pares cromosómicos del cariotipo. Estos estudios citogenéticos en moluscos marinos están permitiendo mejorar la calidad de las preparaciones, clasificar mejor los cromosomas y poner a punto técnicas de bandeo indispensables para la identificación inequívoca de los cromosomas, para así detectar diferencias interespecíficas e intraespecíficas.

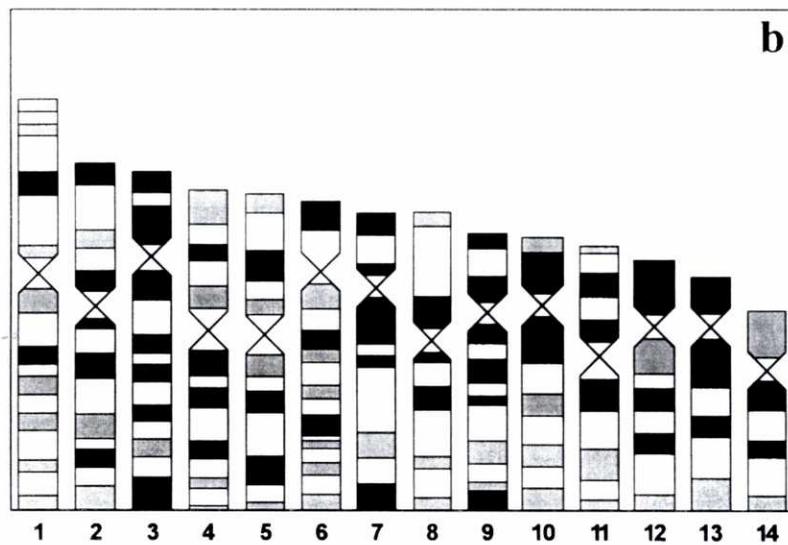
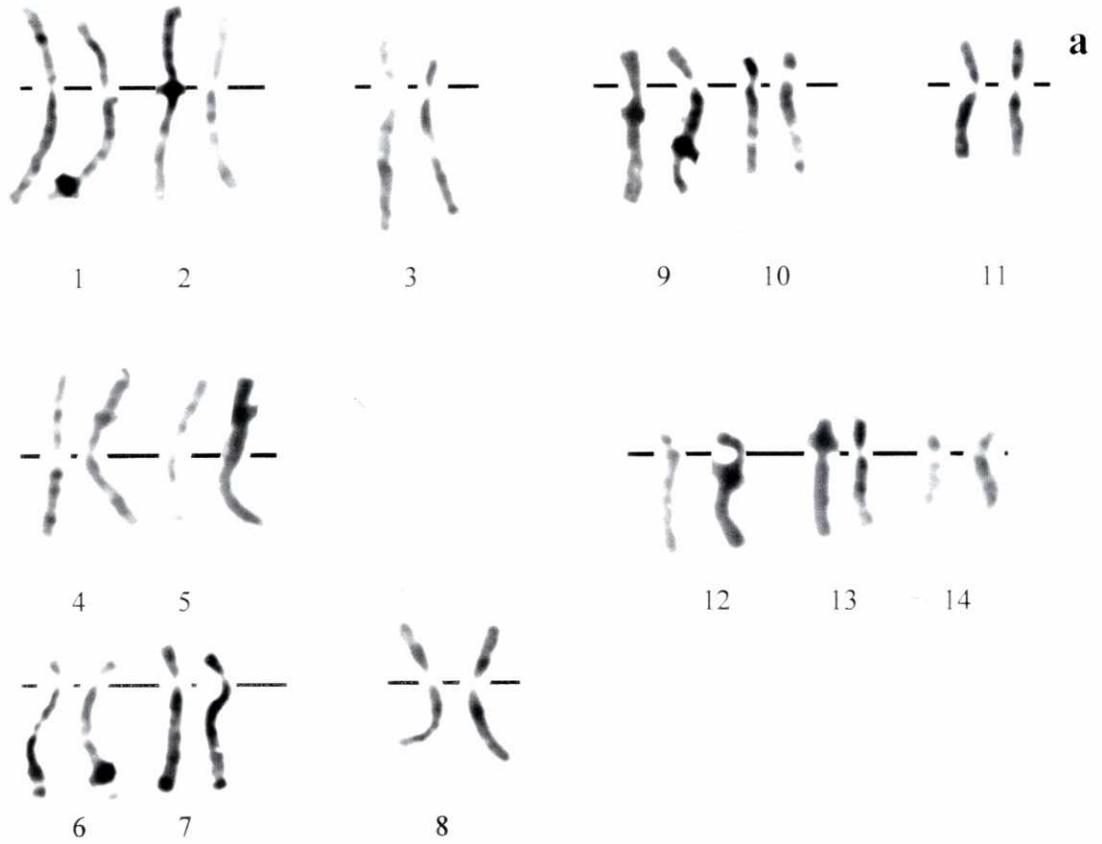
Hemos inducido un bandeo G con tripsina en metafases obtenidas a partir de larvas de *M. galloprovincialis* (figura 7a), en el cual puede observarse que los telómeros aparecen generalmente teñidos de oscuro y que los centrómeros están claros y bien definidos. El idiograma correspondiente a estas bandas G de tripsina puede observarse en la figura 7b. La resolución del bandeo y su reproducibilidad son escasas en metafases de cromosomas medianamente o altamente condensados. Por ello, únicamente se visualizan bien las bandas en aquellas metafases poco condensadas que proceden de células de larvas.

Los resultados de otros métodos de bandeo G mostraron que, con el uso de la solución salina caliente 2xSSC (Sumner, 1971), de la solución de NaCl-urea (Kato y Yosida, 1972) y de la solución de urea (Shiraishi y Yosida, 1972), se producían unas bandas de peor calidad y más difíciles de reproducir que con tripsina. En el caso de la urea, tratamientos prolongados provocan la aparición de cromosomas "fantasma".

4.2.2. BANDAS C

Las técnicas de bandeo C producen una tinción selectiva de la heterocromatina. Las metafases procedentes de tejido branquial de individuos adultos de *M. galloprovincialis* teñidas con naranja de acridina reflejaron la presencia de bandas C en los telómeros de los brazos largos de los cromosomas 6 y 7. Cuando aplicamos esta técnica a las metafases de las larvas de *M. galloprovincialis*, también teñidas con naranja de acridina, detectamos un mayor

FIGURA 7



a) Bandas G con tripsina y b) Idiograma de bandas G en *M. galloprovincialis*.

RESULTADOS

número de bandas C (figura 8a). Estas aparecen localizadas a nivel intercalar en los cromosomas 1, 5, 6 y 12; y a nivel telomérico en los cromosomas 3, 6, 7, 9 y 13, siendo el resto de los cromosomas del complemento banda C negativos. El idiograma correspondiente a las bandas C de *M. galloprovincialis* se muestra en la figura 9a. Dependiendo de la intensidad de fluorescencia, podemos clasificar estas bandas C en tres tipos diferentes (tabla VI):

- a) Bandas de fluorescencia brillante: Bandas de los cromosomas 1, 3, 7, 9 y banda telomérica del 6,
- b) Bandas de fluorescencia intermedia: Bandas de los cromosomas 5, 12 y banda intercalar del cromosoma 6, y
- c) Bandas de fluorescencia débil: Banda del cromosoma 13.

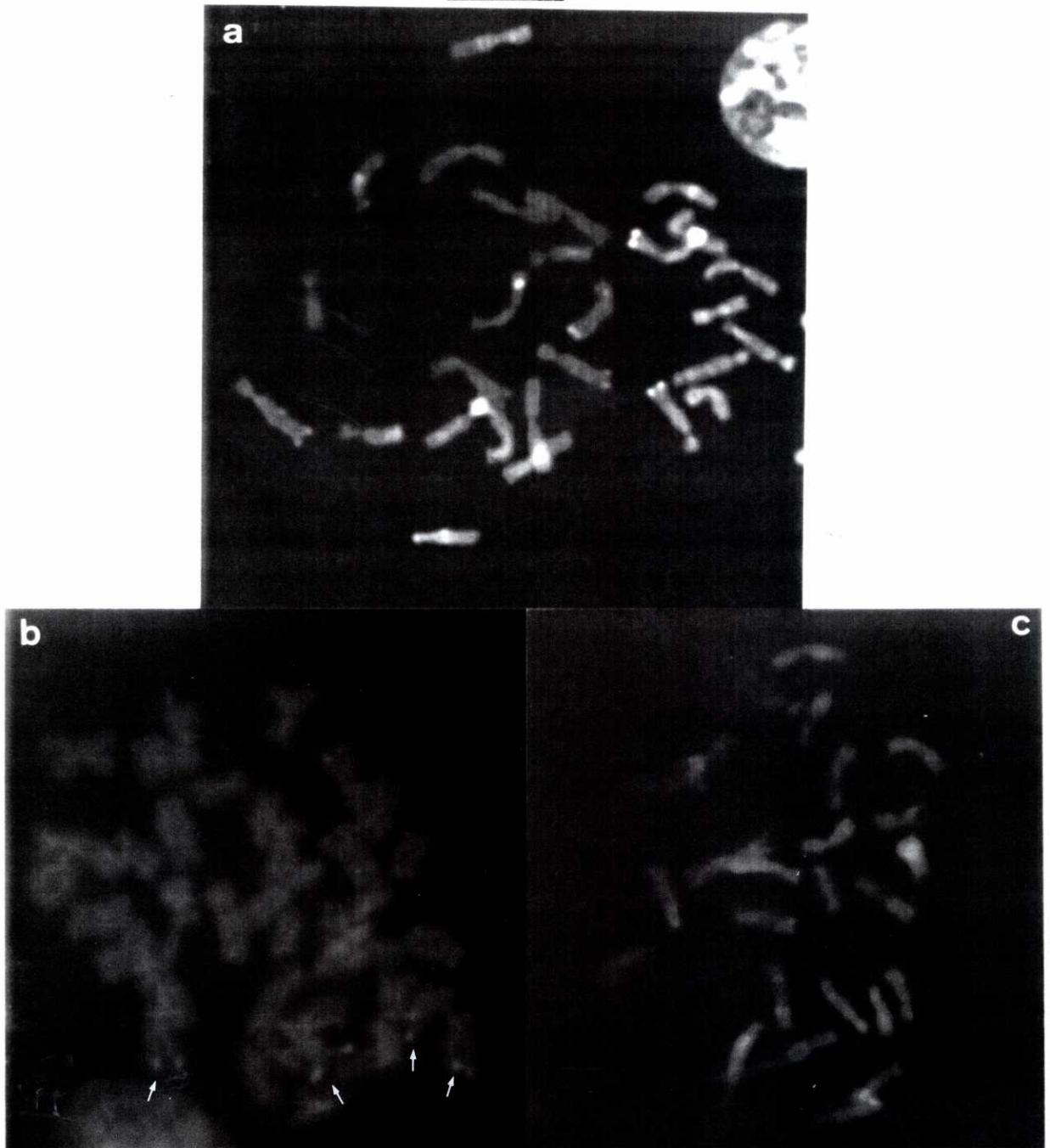
TABLA VI

Bandeo C en las larvas de las tres especies estudiadas

Cro. N°	<i>M. edulis</i>	<i>M. gallopro.</i>	<i>M. trossulus</i>
1p,t	**	-	*
1p,i	-	**	-
1c	***	-	**
1q,t	***	-	**
3p,t	**	-	*
3q,t	*	***	***
5q,i	*	*	***
6q,i	-	**	-
6q,t	***	***	***
7q,t	***	**	***
8p,t	***	-	*
9q,t	-	**	-
12q,i	***	*	***
13q,t	*	*	*

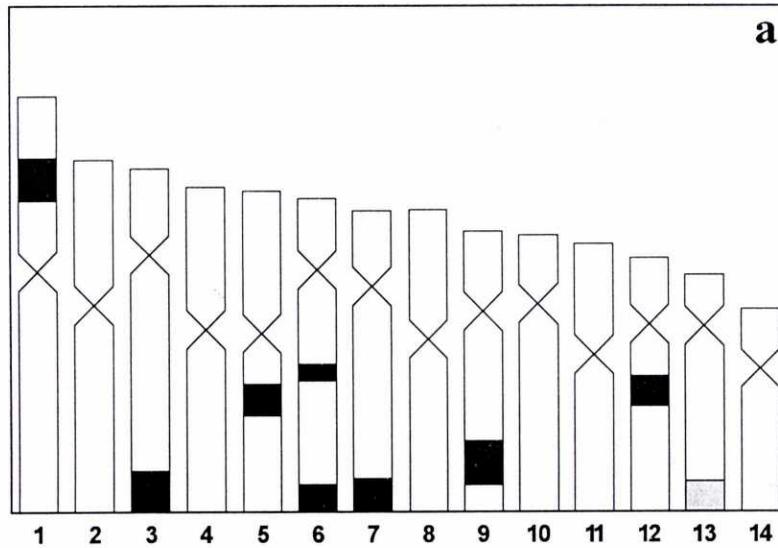
***: Bandas fuertes; **: Bandas intermedias; *: Bandas débiles; -: Ausencia de bandas; p banda en brazo p; q banda en brazo q; t banda telomérica; c banda centromérica; i banda intercalar.

FIGURA 8

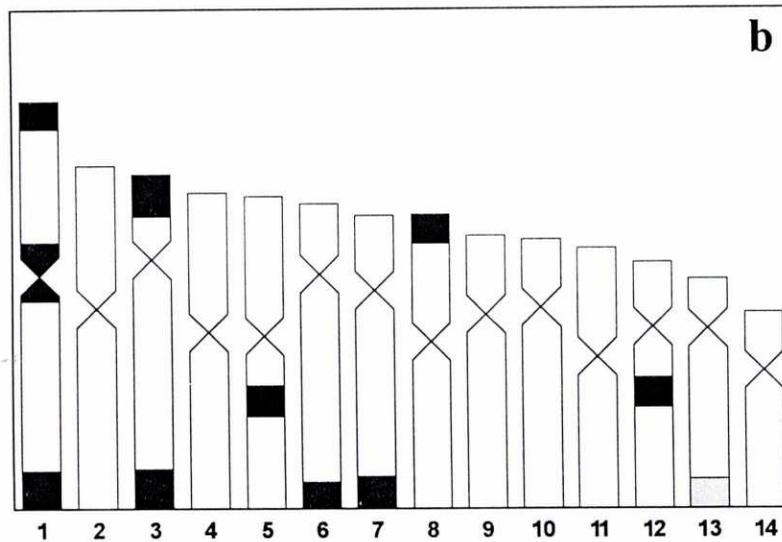


Bandas C en metafases de larvas de: **a)** *M. galloprovincialis*, **b)** *M. edulis*, **c)** *M. trossulus*.

FIGURA 9



a) Idiograma de bandas C en *M. galloprovincialis*.



b) Idiograma de bandas C en *M. edulis* y *M. trossulus*.

RESULTADOS

Cuando aplicamos la técnica de bandeado C a metafases procedentes de branquias de *M. edulis*, sucedió lo mismo que con branquias de *M. galloprovincialis*; únicamente dos pares de cromosomas (6 y 7) presentaban banda C brillante en los telómeros de sus brazos largos al teñirlos con naranja de acridina.

Los resultados obtenidos en el análisis de las metafases de larvas de *M. edulis* presentan diferencias con respecto a las obtenidos con larvas de *M. galloprovincialis*, ya que después del tratamiento y la tinción con naranja de acridina, únicamente se visualizan los cromosomas 6 y 7 con fluorescencia brillante, siendo el resto de las bandas muy tenues y perdiéndose la fluorescencia muy rápidamente (figura 8b). Sin embargo cuando las extensiones fueron sometidas a tinción con Giemsa se visualizan más bandas que después de la tinción con naranja de acridina. Estas aparecen localizadas a nivel intercalar en los cromosomas 5 y 12, a nivel telomérico en los cromosomas 1, 3, 6, 7, 8 y 13, y a nivel centromérico en el cromosoma 1. El resto de los cromosomas del complemento son banda C negativos (figuras 9b y 13 a 19). Así podemos clasificar las bandas C de *M. edulis* en tres tipos diferentes (tabla VI):

- a) Bandas intensas: Bandas centromérica del cromosoma 1, intercalares del 5 y 12 y teloméricas del 1 (brazo q), 6, 7 y 8;
- b) Bandas intermedias: Bandas del cromosoma 3;
- c) Bandas débiles: Bandas teloméricas de los cromosomas 1 (brazo p) y 13.

En el caso de las metafases de larvas de *M. trossulus* después del tratamiento y la tinción con naranja de acridina, visualizamos 11 regiones de bandas C en posición similar a las que habíamos detectado en *M. edulis* (figuras 8c, 9b). Así podemos distinguir en función de la intensidad de fluorescencia tres tipos de bandas (tabla VI):

- a) Bandas de fluorescencia brillante: Bandas teloméricas de los cromosomas 3 (brazo q), 6 y 7 e intercalares del 5 y 12;
- b) Bandas de fluorescencia intermedia: Bandas centromérica y telomérica del cromosoma 1 (brazo q);
- c) Bandas de fluorescencia débil: Bandas teloméricas de los cromosomas 1, 3 (brazos p), 8 y 13.

4.2.3. TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

Mediante la técnica de tinción con plata observamos que el número de NORs activos varía en las metafases de larvas de *M. galloprovincialis* entre 2 y 4. La localización de estos NORs coincide con las bandas C presentes en las regiones teloméricas de los brazos largos de los cromosomas 6 y 7 (figura 10a).

En *M. edulis* la localización de los NORs es semejante a la que observamos en *M. galloprovincialis*, situándose en la región de las bandas C de los cromosomas 6 y 7 (figura 10b). El número de NORs activos varía entre 2 y 4 en el caso de las metafases obtenidas de células de larvas, y entre 1 y 4 en las metafases procedentes de branquias de individuos adultos.

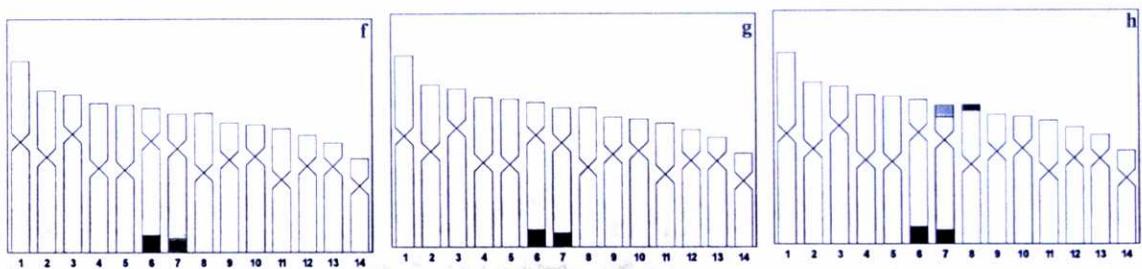
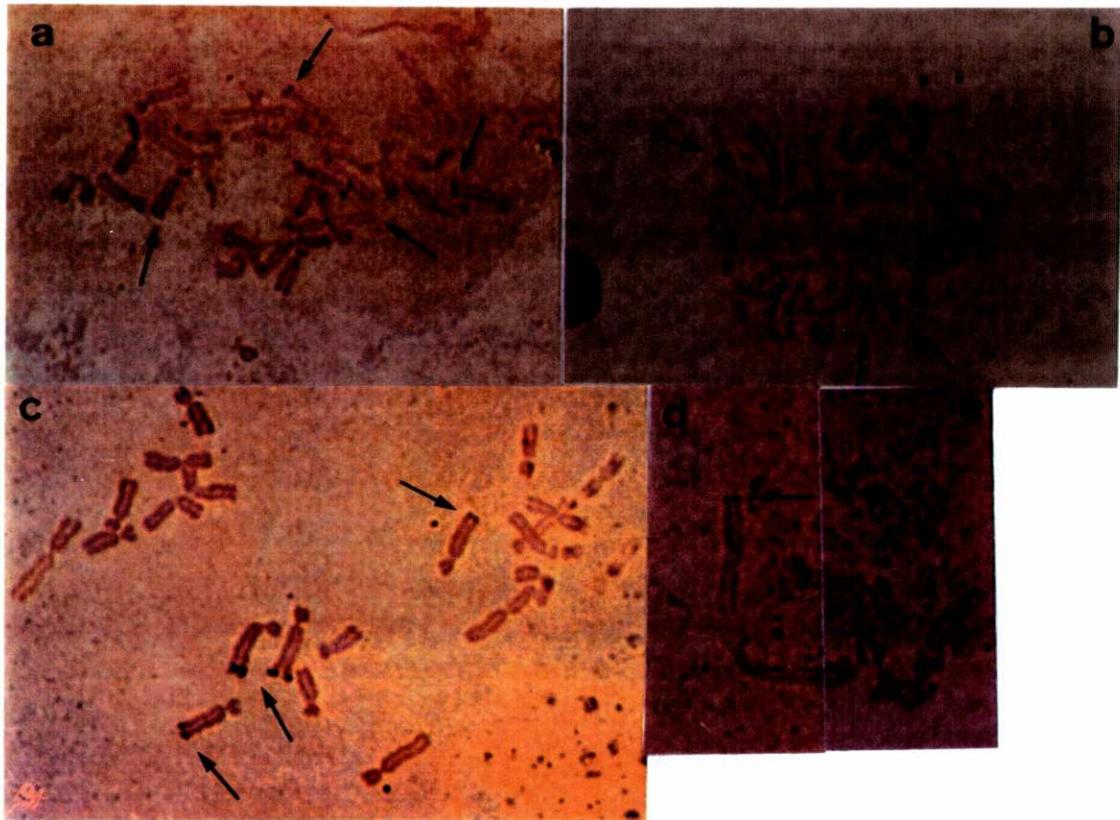
En el caso de *M. trossulus* existen tres regiones NOR. Dos de ellas se localizan en los telómeros de los cromosomas 6 y 7, como sucede en *M. galloprovincialis* y en *M. edulis* (figura 10c) y la tercera en la región telomérica del brazo corto del cromosoma 8 (figura 10d). En estas tres regiones NOR se localizan también bandas C. Además, ocasionalmente, se visualiza otra región NOR en el brazo corto del cromosoma 7 (figuras 10e), en la cual no hemos detectado ninguna banda C. En ningún caso hemos visualizado en metafases de *M. trossulus* más de 4 NORs activos por metafase.

4.3. BANDEOS CON COMPUESTOS FLUORESCENTES

4.3.1. BANDEO CON QUINACRINA

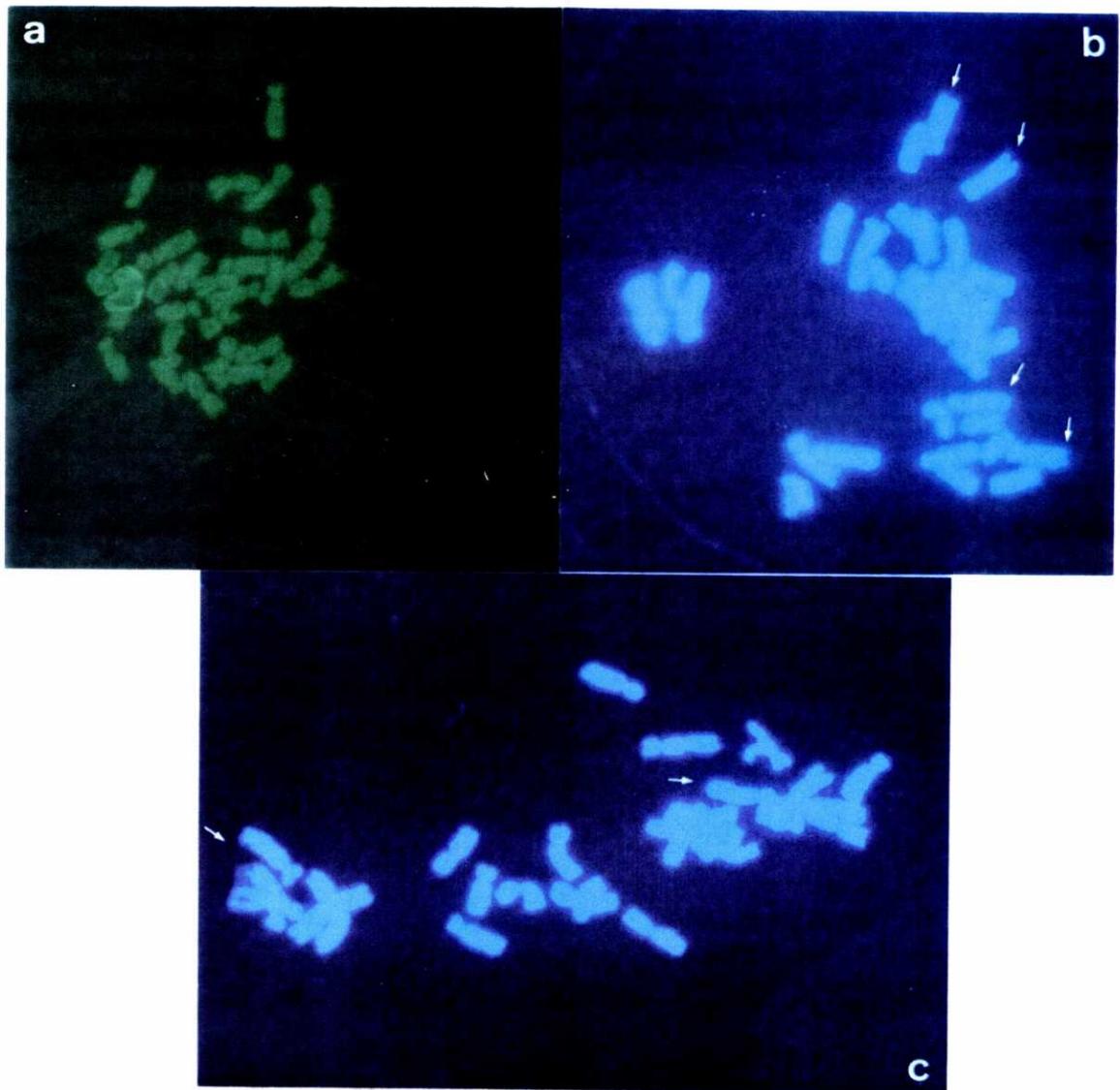
Las metafases de larvas de *M. galloprovincialis* tratadas con quinacrina muestran una tinción uniforme en todos los cromosomas (figura 11a). En metafases de branquias de *M. galloprovincialis* encontramos la misma respuesta que en metafases de larvas. Para comprobar que la respuesta no dependía del pH del tampón utilizado, realizamos pruebas de tinción a pH variables desde 4'0 hasta 12'0 con intervalos de 0'25, aunque no se apreció ninguna respuesta diferencial. Se obtuvieron idénticos resultados al tratar metafases de células procedentes de larvas y de branquias de adultos de *M. edulis* y *M. trossulus*.

FIGURA 10



Regiones organizadoras del nucleolo: **a)** Cromosomas de larvas de *M. galloprovincialis*. **b)** Cromosomas de células de branquias de individuos adultos de *M. edulis*. **c)** Cromosomas de larvas de *M. trossulus*. **d)** Cromosoma metacéntrico con NOR de *M. trossulus*. **e)** Cromosoma 7 de *M. trossulus* presentando un NOR en el brazo corto (p). Idiograma NOR **f)** *M. galloprovincialis* **g)** *M. edulis* **h)** *M. trossulus*.

FIGURA 11



a) Metafase de larvas de *M. galloprovincialis* teñida con quinacrina. b) Metafase de larvas de *M. trossulus* después del tratamiento con AD/H. c) Metafase de larvas de *M. galloprovincialis* teñida con DA/H.

4.3.2. BANDEO CON HOECHST; ACTINOMICINA D/H Y DISTAMICINA A/H

La aplicación del fluorocromo Hoechst-33258 y su utilización combinada con la actinomicina D sobre los cromosomas metafásicos de larvas de las tres especies de mejillón, produjeron una disminución de la tinción en las regiones teloméricas de los cromosomas 6 y 7. Estas regiones se corresponden con aquellas en las que habíamos detectado la presencia de un NOR (figura 11b). Además en el telómero del brazo corto del cromosoma 3 de *M. galloprovincialis* también detectamos una disminución de la tinción. Por el contrario no observamos nunca en larvas de *M. trossulus* la disminución de la tinción en el telómero del brazo p del cromosoma 8, ni en el telómero del brazo p del 7, en los cuales habíamos detectado la existencia de NORs.

El resto de los cromosomas del complemento de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus* presentaron una tinción uniforme. Tampoco detectamos ninguna banda fluorescente después de tratar las metafases de larvas de las tres especies con la combinación de distamicina A y Hoechst (figura 11c). Sin embargo en muchos casos se observa que estas regiones Hoechst negativas de los cromosomas 6 y 7 de larvas de *M. edulis* y *M. trossulus* presentan una gran descondensación.

Las metafases de *M. galloprovincialis* y *M. edulis* procedentes de branquias de individuos adultos tratadas con AD/H o con DA/H muestran una tinción homogénea en todos los cromosomas del complemento, sin distinción de las regiones tenues detectadas en larvas.

4.3.3. BANDEO CON DAPI, DA / DAPI Y AD / DAPI

Los cromosomas de las tres especies de mejillón tratados con las tinciones DAPI, DA/DAPI o AD/DAPI muestran resultados semejantes a los producidos por el Hoechst, tiñéndose negativamente las regiones teloméricas de los cromosomas 6 y 7 y del cromosoma 3 de *M. galloprovincialis*. Las regiones Hoechst negativas son DAPI negativas (figura 12a). También se observa claramente la descondensación que, generalmente, se produce en los telómeros de los cromosomas 6 y 7 de *M. edulis* y *M. trossulus*.

4.3.4. BANDEO CON CROMOMICINA A3

En las metafases de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus* los cromosomas presentaron, en todas las poblaciones estudiadas, dos regiones CA3 positivas en los telómeros de los brazos q de los cromosomas 6 y 7. En metafases procedentes de larvas de *M. galloprovincialis*, además de estas dos regiones anteriormente citadas, en la gran mayoría de los casos, se visualizó una tercera región CA3 positiva en el telómero del brazo p del cromosoma 3 (figura 12b, d).

La tritinción con DA/DAPI/CA3 (figuras 12c, d), al permitir visualizar la misma metafase teñida con DAPI y teñida con CA3, pone de manifiesto que las regiones teloméricas de los cromosomas 6 y 7 de las tres especies de mejillón que eran DAPI negativas son CA3 positivas y además son coincidentes con los NOR. Sin embargo la región CA3 positiva del cromosoma 3 de *M. galloprovincialis* no se corresponde con ninguna región NOR.

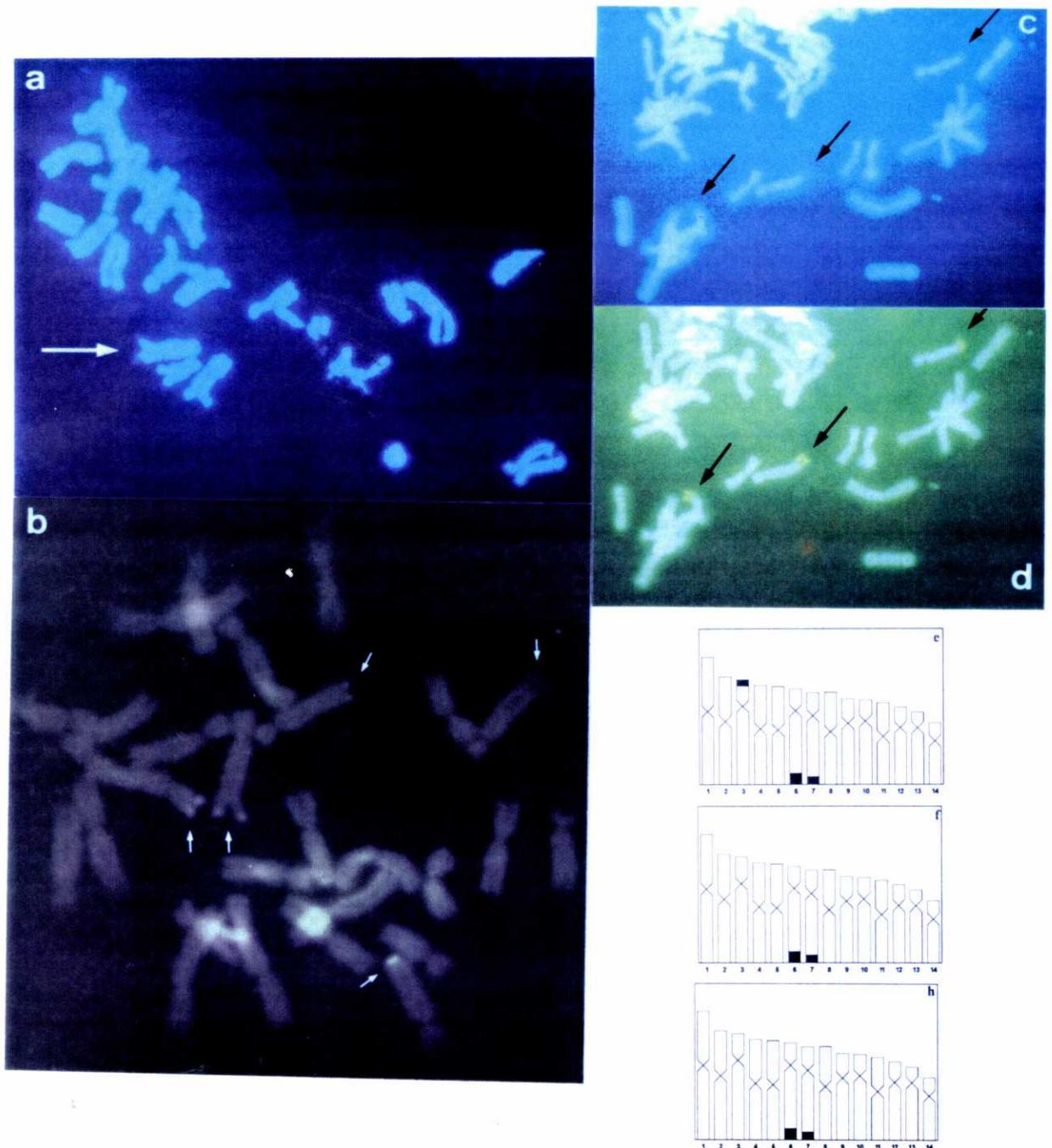
En las metafases obtenidas de branquias de individuos adultos la tritinción permite observar las regiones DAPI negativas difíciles de visualizar. Estas zonas se detectan, al comparar cromosomas teñidos con DAPI y con CA3, por el menor tamaño de los cromosomas 6 y 7 teñidos con DAPI.

Hay que señalar que es posible que la riqueza en bases G+C en los telómeros de los cromosomas 6 y 7 de *M. edulis* y *M. trossulus* debe ser menor que en *M. galloprovincialis*, ya que las tinciones con CA3 son más débiles y la fluorescencia se disipa más rápidamente. Además en *M. trossulus* nunca hemos observado ninguna región CA3 positiva en el telómero del brazo p del cromosoma 8, ni en el brazo corto del cromosoma 7 en los cuales aparece un NOR.

4.4. BANDEOS CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

El análisis de los resultados muestra que la acción de las diferentes endonucleasas de restricción sobre los cromosomas de larvas de *M. galloprovincialis* (figuras 13 a 19, página 55 y siguientes) presentan un patrón de bandas característico con los centrómeros y telómeros bien definidos. Los patrones de bandas de mayor calidad se obtienen en los casos de la

FIGURA 12



a) Metafase de larvas de *M. edulis* después del tratamiento con AD/DAPI. b) Metafase de larvas de *M. galloprovincialis* teñida con CA3. c) Metafase de larvas de *M. trossulus* teñida con DA/DAPI. d) Metafase de larvas de *M. trossulus* teñida con CA3. Idiograma CA3 e) *M. galloprovincialis* f) *M. edulis* h) *M. trossulus*.

RESULTADOS

digestión por las endonucleasas Cfo I, Hpa II, Msp I y Eco RI. Por el contrario, con Taq I se produce una alteración de la estructura cromosómica debido, probablemente, a la alta temperatura de incubación (60°C). En general, la calidad de los patrones de bandas y su reproducibilidad fueron muy pobres cuando tratamos metafases procedentes de branquias de individuos adultos.

Tomando como referencia los patrones de bandas C y CA3 de cada especie estudiada se analizó la digestión cromosómica producida por cada endonucleasa (tablas VII a IX).

Entre las endonucleasas ensayadas que reconocen secuencias constituidas por pares de bases G+C (Hae III, Cfo I, Hpa II, Msp I y Apa I), Hae III y Cfo I son las que producen una mayor digestión en todos los cromosomas del complemento de *M. galloprovincialis* (tabla VII), siendo Hpa II y Msp I las que menos digieren. Apa I, que tiene una secuencia de reconocimiento de 6 pb, ha causado una digestión intermedia.

TABLA VII

Distribución de las bandas C, NOR, CA3 y bandas de restricción en *M. galloprovincialis*.

Posc.	BC	NOR	CA3	Hae III	Cfo I	Hpa II	Msp I	Apa I	Alu I	Taq I	Dpn I	Hinf I	Eco RI
1 p i	**	-	-	-	-	**	***	*	**	**	*	*	***
3 p t	-	-	***	-	***	**	-	**	*	*	***	*	-
3 q t	***	-	-	*	-	*	**	**	**	-	**	-	*
5 q i	*	-	-	*	-	**	***	*	***	*	*	*	**
6 q i	**	-	-	*	*	***	**	*	*	-	-	**	*
6 q t	***	***	***	*	***	*	*	***	**	*	*	*	*
7 q t	**	**	**	*	*	*	**	*	***	*	***	***	***
9 q t	**	-	-	**	**	***	*	*	**	-	-	*	***
12 q i	*	-	-	*	*	**	**	**	***	*	***	*	**
13 q t	*	-	-	*	*	-	*	*	*	-	**	**	**

Posc.: Posición de las regiones heterocromatínicas; p: brazo p; q: brazo q;

i, t: regiones intercalar y telomérica del cromosoma.

***: Bandas fuertes; **: Bandas intermedias; *: Bandas débiles; -: Ausencia de bandas

RESULTADOS

Hae III y Cfo I digieren totalmente la banda intercalar del cromosoma 1. La región telomérica del brazo corto del cromosoma 3 es digerida totalmente por Hae III y Msp I, mientras que Cfo I provoca la digestión de la región telomérica del brazo largo del cromosoma 3 y de la banda intercalar del cromosoma 5. Hae III, Hpa II y Msp I digieren parcialmente las regiones teloméricas de los cromosomas 6 y 7.

La endonucleasa Alu I digiere parcialmente la banda telomérica del cromosoma 3, la intercalar del 6, la región telomérica del 13, y produce digestión muy débil o ausencia de digestión en el resto de los cromosomas. Por el contrario Taq I causa una digestión total o parcial de todos los cromosomas banda C positivos. Dpn I digiere totalmente las bandas de los cromosomas 6 y 9.

Hinf I y Eco RI reconocen secuencias de cinco y seis pares de bases ricas en A+T. Así, la región telomérica del brazo largo del cromosoma 3 es digerida por Hinf I, mientras que la del brazo corto es digerida por Eco RI. También es importante señalar la elevada digestión que producen sobre la región telomérica del cromosoma 6.

Cuando realizamos la digestión con las diferentes endonucleasas de restricción sobre los cromosomas de larvas de *M. edulis* los telómeros y centrómeros aparecen bien definidos, produciendo cada endonucleasa un patrón de bandas característico (figuras 13 a 19).

Las regiones teloméricas del cromosoma 1 son digeridas total o parcialmente por Hae III, Cfo I, Hpa II, Msp I y Apa I, siendo la región centromérica menos digerida. Las regiones teloméricas del cromosoma 3 son digeridas por Hae III y Cfo I. La banda intercalar del cromosoma 5 es digerida por todas las endonucleasas ensayadas, mientras que los telómeros de los cromosomas 6 y 7 son parcialmente digeridos por Msp I. El resto de los cromosomas responde débilmente a la acción de las cinco endonucleasas citadas (tabla VIII).

La endonucleasa Alu I digiere débilmente las regiones correspondientes a las bandas C, mientras que Taq I causa una digestión significativa de los cromosomas, principalmente en el telómero del brazo largo del cromosoma 1, siendo menor en los

RESULTADOS

telómeros de los cromosomas 6 y 7. También Dpn I realiza una notable digestión a excepción de las regiones teloméricas de los brazos largos de los cromosomas 1 y 3.

Con respecto a Hinf I hay que destacar la digestión de la banda centromérica del cromosoma 1 y de la banda telomérica del brazo largo del cromosoma 3, además de una notable digestión en el resto de los cromosomas del complemento. Por el contrario, Eco RI produce escasa digestión.

TABLA VIII

Distribución de las bandas C, NOR, CA3 y bandas de restricción en *M. edulis*.

Posc.	BC	NOR	CA3	Hae III	Cfo I	Hpa II	Msp I	Apa I	Alu I	Taq I	Dpn I	Hinf I	Eco RI
1 p t	*	-	-	-	*	-	-	-	-	-	*	*	-
1 c	***	-	-	*	**	*	*	**	**	*	*	-	***
1 q t	***	-	-	-	-	*	-	*	***	-	***	*	***
3 p t	**	-	-	-	-	**	*	***	*	*	*	*	**
3 q t	**	-	-	*	-	**	*	-	*	*	***	-	*
5 q i	***	-	-	*	*	*	*	*	**	*	*	*	*
6 q t	***	***	**	**	*	**	*	**	*	**	*	*	*
7 q t	***	***	**	***	**	***	*	**	**	**	*	**	**
8 p t	***	-	-	**	***	**	*	*	**	*	*	*	***
12 q i	***	-	-	*	*	**	*	*	*	*	*	*	*
13 q t	*	-	-	*	*	*	*	-	*	-	-	*	*

Posc.: Posición de las regiones heterocromatínicas; p: brazo p; q: brazo q;

c, i, t: regiones centromérica, intercalar y telomérica del cromosoma.

***: Bandas fuertes; **: Bandas intermedias; *: Bandas débiles; -: Ausencia de bandas

La respuesta de los cromosomas metafásicos procedentes de larvas de *M. trossulus* a la digestión con endonucleasas de restricción, es similar a la producida en *M. edulis*. Los patrones de bandas de mayor calidad son los que obtuvimos después de la acción de Alu I y Hinf I (figuras 13 a 19). Hae III, Cfo I y Taq I son las endonucleasas que causan una respuesta más notablemente acusada (tabla IX).

Con respecto a las endonucleasas que reconocen secuencias constituídas por pb G+C y en relación al cromosoma 1, debemos destacar la elevada digestión de las dos regiones

RESULTADOS

teloméricas por las endonucleasas Hae III, Hpa II, Msp I y Apa I. El cromosoma 3 es muy digerido por Hae III y Cfo I. La región telomérica del cromosoma 6 muestra generalmente una digestión más acusada que la del cromosoma 7 por las endonucleasas que reconocen secuencias de pb G+C.

TABLA IX

Distribución de las bandas C, NOR, CA3 y bandas de restricción en *M. trossulus*

Posc.	BC	NOR	CA3	Hae III	Cfo I	Hpa II	Msp I	Apa I	Alu I	Taq I	Dpn I	Hinf I	Eco RI
1 p t	*	-	-	-	**	-	-	-	-	-	*	*	-
1 c	**	-	-	**	**	*	*	*	*	*	-	***	**
1 q t	**	-	-	-	-	*	-	**	*	-	**	*	*
3 p t	*	-	-	-	-	**	*	**	***	-	**	*	*
3 q t	***	-	-	*	-	**	**	*	*	*	***	-	*
5 q i	***	-	-	*	*	**	**	**	*	**	**	*	*
6 q t	***	***	**	*	*	*	*	**	*	**	**	**	**
7 q t	***	***	**	*	*	***	**	*	***	*	*	**	***
8 p t	*	*	-	*	***	*	***	***	*	**	***	*	**
12 q i	***	-	-	*	*	***	***	*	***	*	**	***	*
13 q t	*	-	-	*	**	-	**	-	-	-	-	***	*

Posc.: Posición de las regiones heterocromatínicas; p: brazo p; q: brazo q;

c, i, t: regiones centromérica, intercalar y telomérica del cromosoma.

***: Bandas fuertes; **: Bandas intermedias; *: Bandas débiles; -: Ausencia de bandas

Alu I produce una digestión débil de la heterocromatina, excepto en las regiones teloméricas de los brazos largos de los cromosomas 3 y 7 y en la región intercalar del cromosoma 12. Taq I produce digestión en todos los cromosomas del complemento, mientras que Dpn I digiere totalmente la región centromérica del cromosoma 1 y la telomérica del 13.

La digestión cromosómica por Hinf I y Eco RI muestra respuestas diferentes en los cromosomas del complemento, aunque habría que señalar la fuerte digestión de la región telomérica del cromosoma 3 y la escasa digestión de las regiones teloméricas de los cromosomas 6 y 7.

RESULTADOS

Teniendo en cuenta la presencia de banda C, NOR o banda CA3, así como la digestión que en dichas zonas realizan las endonucleasas de restricción, mostramos los diferentes tipos de heterocromatina encontrados en los genomas de las tres especies de mejillón (tabla X).

TABLA X

Distribución de los diferentes tipos de cromatina en los tres tipos de mejillón

BC	NOR	CA3	Hae III	Cfo I	Hpa II	Msp I	Apa I	Alu I	Taq I	Dpn I	Hinf I	Eco RI	Posición
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Teloméricas 6 y 7 (e, g, t)
*	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Intercalar 5 y 12 (e, g, t) Centromérica 1 (e, t)
*	*	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Telomérica 8 (e,t)
*	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	Telomérica brazo p 3 (e, t) Intercalar 1 (g)
-	-	*	-	*	*	-	*	*	*	*	*	-	Telomérica brazo p 3 (g)
*	-	-	-	-	*	-	*	*	-	*	*	*	Telomérica brazo q 1 (e, t)
*	-	-	*	*	*	*	*	*	-	-	*	*	Intecalar 6 (g) Telomérica 9 (g)
*	-	-	*	-	*	*	*	*	*	*	-	*	Telomérica brazo q 3 (t, e, g)
*	-	-	-	*	-	-	-	-	-	*	*	-	Telomérica brazo p 1 (e, t)
*	-	-	*	*	*	*	-	*	-	-	*	*	Telomérica 13 (e, g, t)

e: *M. edulis*; g: *M. galloprovincialis*; t: *M. trossulus*;

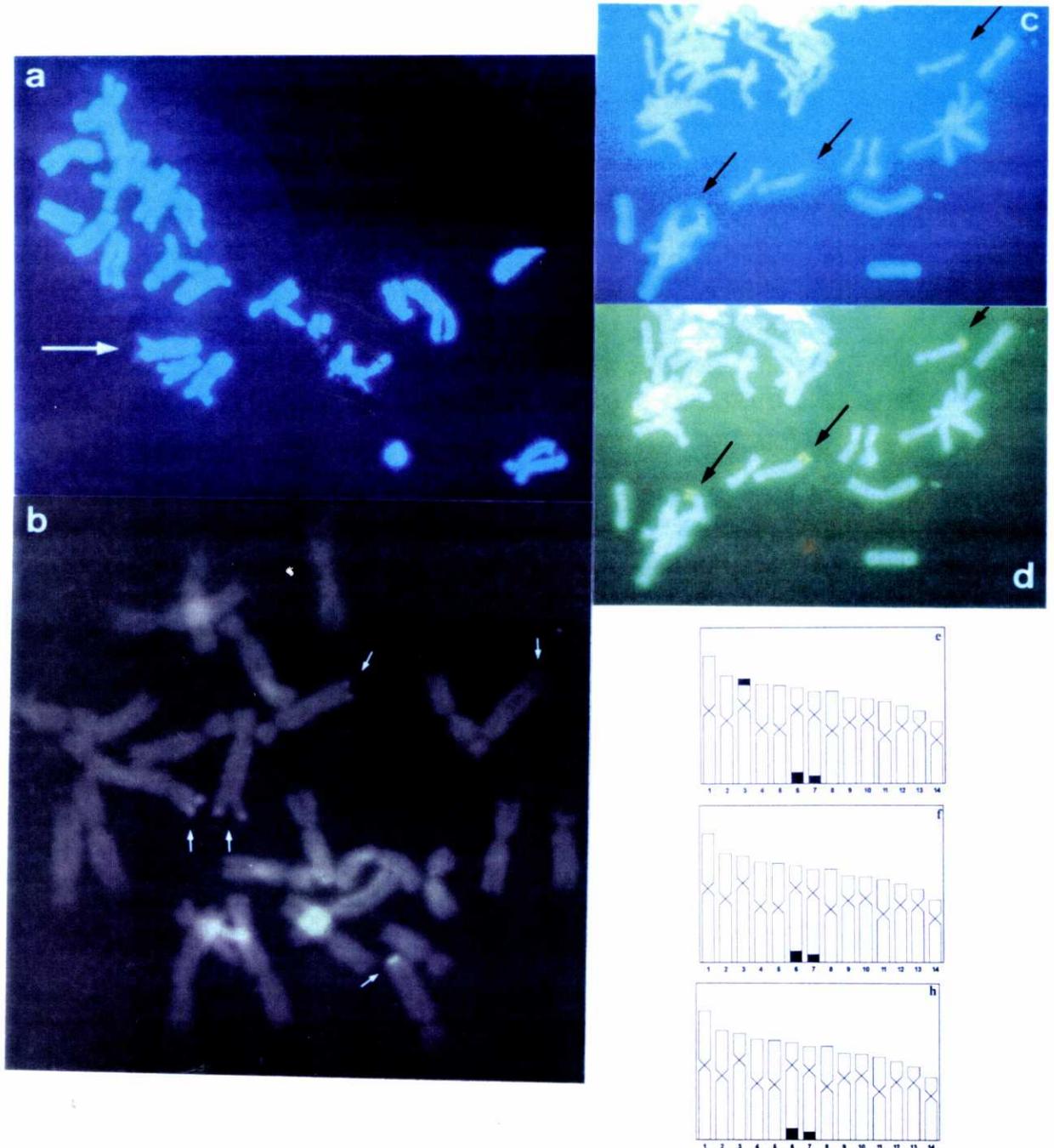
*: presencia de banda; -: ausencia de banda.

El primer tipo de heterocromatina es el que se localiza en las regiones teloméricas de los cromosomas 6 y 7 de las tres especies. El segundo tipo de heterocromatina está formado por la que se encuentra localizada intercaladamente en los cromosomas 5 y 12, y no es digerida totalmente por ningún tipo de enzima aunque en el caso del cromosoma 5 de *M. galloprovincialis* se digiere por Cfo I. Además consideramos que la banda centromérica del cromosoma 1 también debe estar constituida por el mismo tipo de heterocromatina, ya que la diferencia con las otras se basa únicamente en la respuesta diferente a un enzima (Hinf I en el caso de *M. edulis* y Dpn I en el de *M. trossulus*). El tercer tipo de heterocromatina es la formada por la región telomérica de los cromosomas 8 de *M. edulis* y *M. trossulus*, pues aunque uno es NOR positivo y otro no, la existencia en ambos casos de una

banda C muy similar nos induce a unir ambos tipos, ya que, además, existe la posibilidad de que en *M. edulis* hubiese un NOR latente.

El cuarto tipo de heterocromatina lo constituye la localizada en la región telomérica del brazo p del cromosoma 3 de *M. edulis* y *M. trossulus*, y la intercalar del cromosoma 1 de *M. galloprovincialis*. El quinto tipo, se localiza en la región telomérica del brazo p de *M. galloprovincialis*; el sexto, en la región telomérica del brazo q del cromosoma 1 de *M. edulis* y *M. trossulus*. La banda intercalar del cromosoma 6 y la telomérica del 9 de *M. galloprovincialis* constituyen el séptimo tipo de heterocromatina. La región telomérica del brazo q del cromosoma 3 de las tres especies constituye el octavo tipo, aunque existen pequeñas diferencias en la digestión (es digerida por Taq I en *M. galloprovincialis* y por Apa I en *M. edulis*). Por último, la región telomérica del brazo p del cromosoma 1 de *M. edulis* y *M. trossulus* y la telomérica del 13 de las tres especies constituyen el noveno y décimo tipo de heterocromatina, respectivamente.

FIGURA 12



a) Metafase de larvas de *M. edulis* después del tratamiento con AD/DAPI. b) Metafase de larvas de *M. galloprovincialis* teñida con CA3. c) Metafase de larvas de *M. trossulus* teñida con DA/DAPI. d) Metafase de larvas de *M. trossulus* teñida con CA3. Idiograma CA3 e) *M. galloprovincialis* f) *M. edulis* h) *M. trossulus*.

CROMOSOMA 3

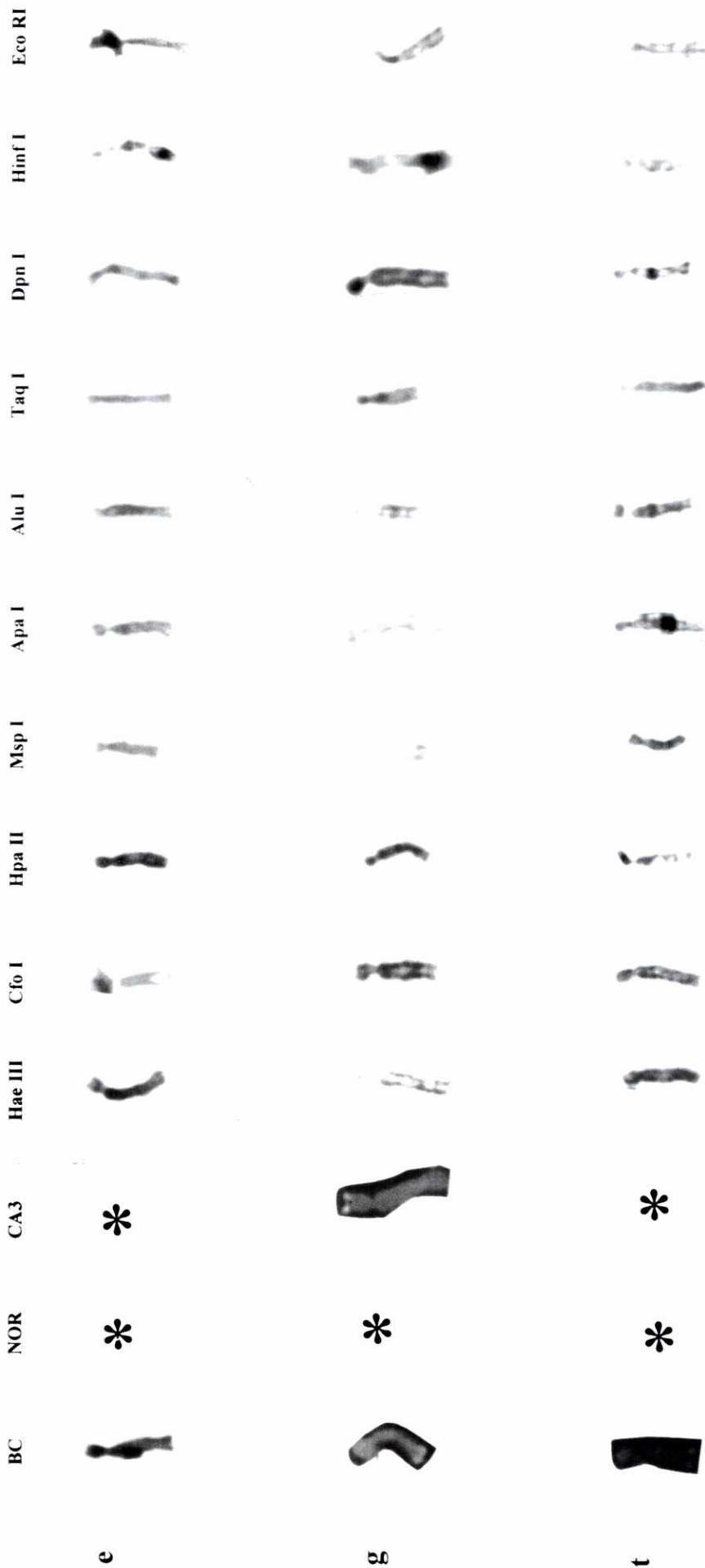
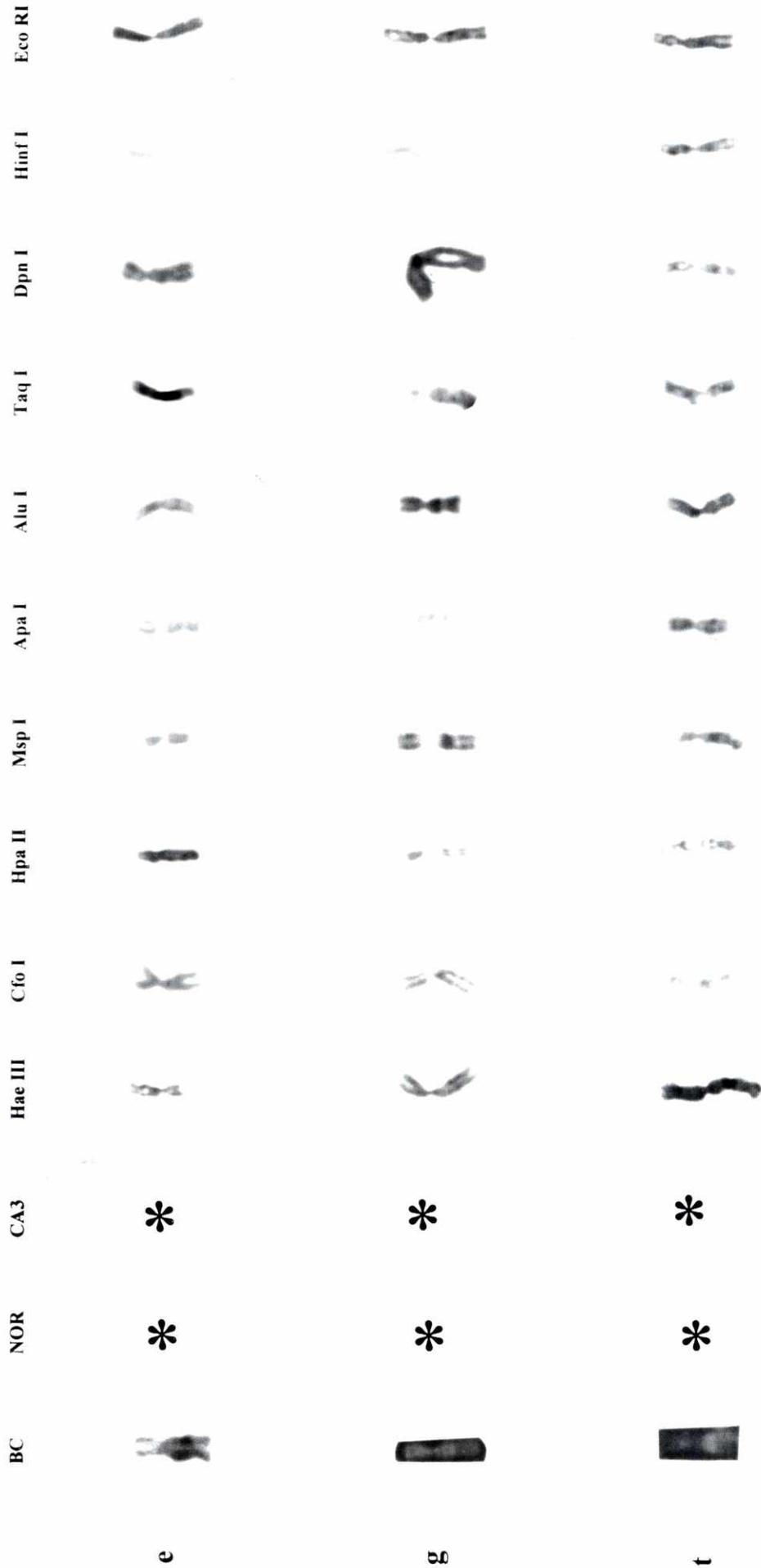


FIGURA 14

e *M. edulis*; *g* *M. galloprovincialis*; *t* *M. trossulus*

FIGURA 15

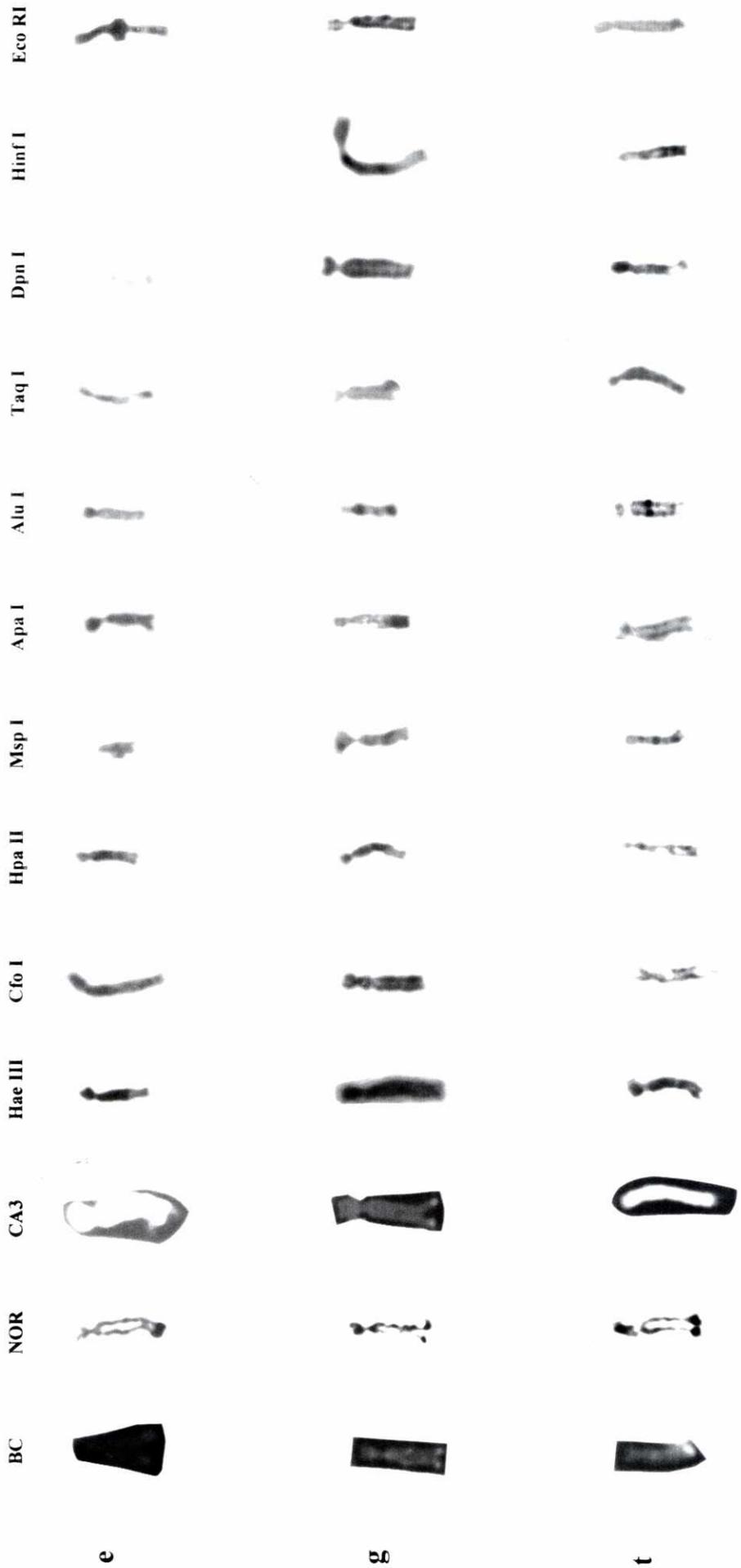
CROMOSOMA 5



e *M. edulis*; **g** *M. galloprovincialis*; **t** *M. trossulus*

FIGURA 16

CROMOSOMA 6



e *M. edulis*; g *M. galloprovincialis*; t *M. trossulus*

CROMOSOMA 7

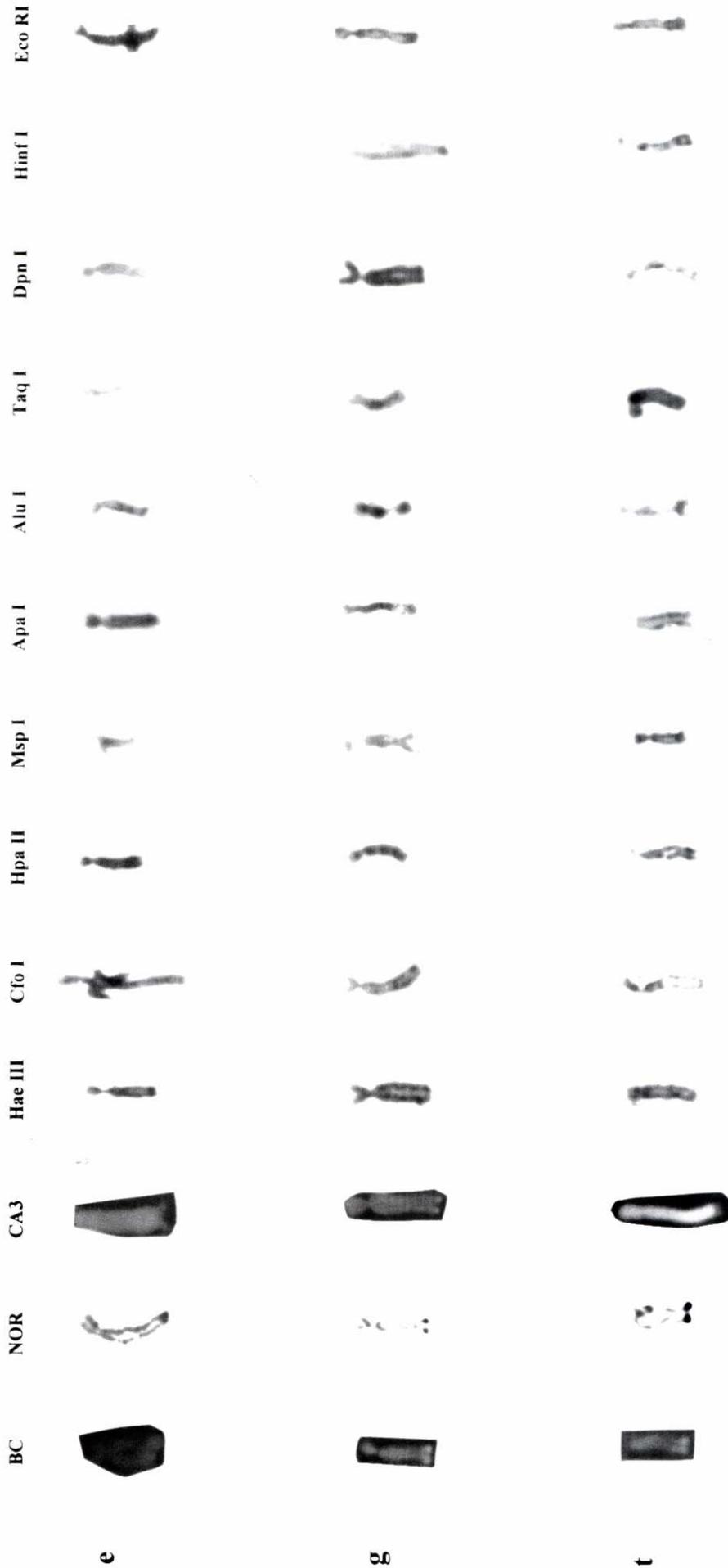
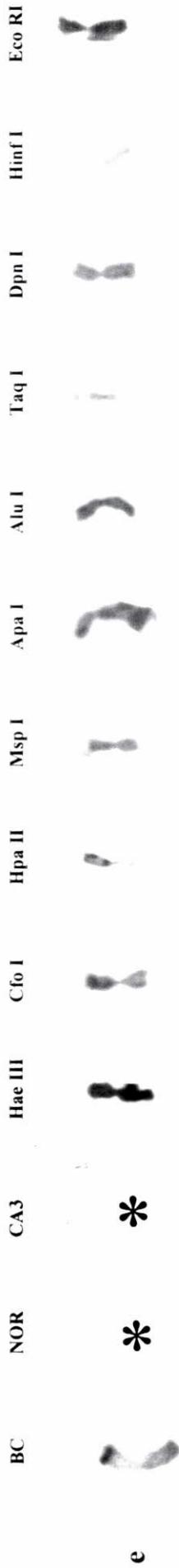


FIGURA 17

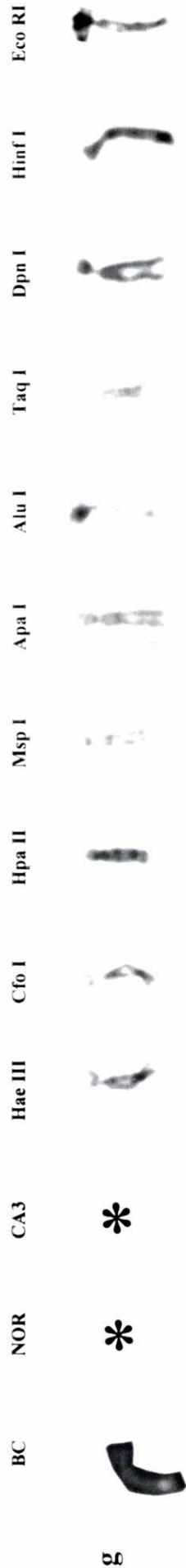
e *M. edulis*; **g** *M. galloprovincialis*; **t** *M. trossulus*

FIGURA 18

CROMOSOMA 8



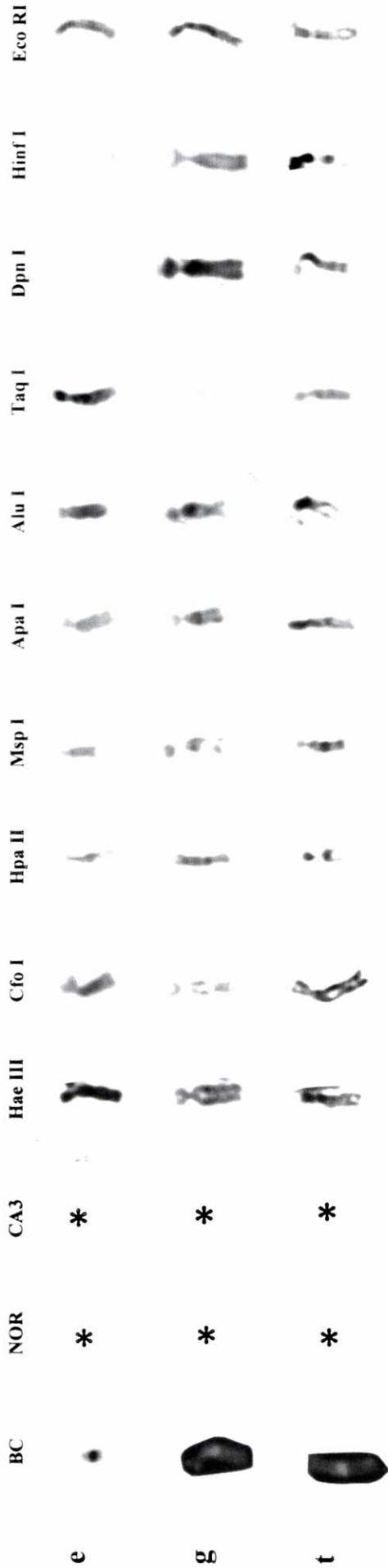
CROMOSOMA 9



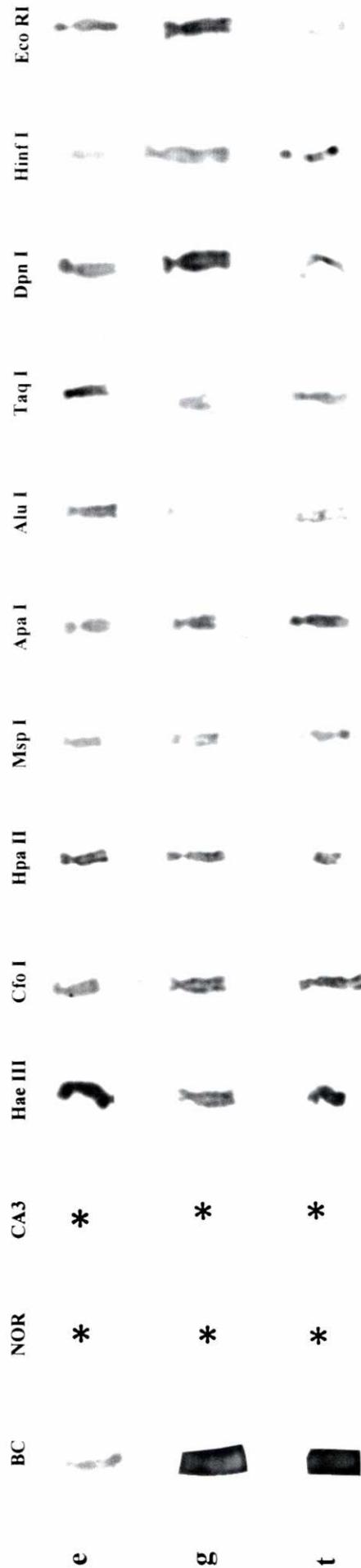
e *M. edulis*; **g** *M. galloprovincialis*; **t** *M. trossulus*

FIGURA 19

CROMOSOMA 12



CROMOSOMA 13



e *M. edulis*; g *M. galloprovincialis*; t *M. trossulus*

5. DISCUSIÓN

5.1. NÚMERO Y MORFOLOGÍA DE LOS CROMOSOMAS

Como ya se ha señalado, aunque los caracteres morfológicos facilitan la separación, no deben utilizarse únicamente para distinguir los dos tipos de mejillón en aquellas zonas en donde ambos coexisten (Gosling, 1984; Beaumont et al., 1989; Koehn, 1991; McDonald et al., 1991). Así, en la figura 20 se pueden observar conchas de mejillón, comprobándose que no existen diferencias claras, y detectándose únicamente una menor consistencia de las conchas de los mejillones de *M. trossulus*, lo cual es debido al escaso oleaje del Mar Báltico.

FIGURA 20



Anverso y reverso de conchas de diferentes poblaciones:

M. galloprovincialis: a) Cullera, b) Almería, c) Marbella, d) Baiona, e) Fisterre,

M. edulis: f) Zoutelande, g) Harlesiel, *M. trossulus*: h) Dahme.

Por ello y por la falta de un locus diagnóstico que permita la separación individual de cada ejemplar de mejillón es por lo que ha surgido la controversia existente en relación al número de especies de mejillón que existen, así como su distribución en las costas europeas.

La dotación diploide de los tres tipos de mejillón analizados en este trabajo es $2n=28$ cromosomas, confirmando lo establecido anteriormente en *M. edulis* (Lubet, 1959; Ahmed y Sparks, 1970; Thiriot-Quévieux y Ayraud, 1982; Moynihan y Mahon, 1983; Dixon y Flavell, 1986), *M. galloprovincialis* (Lubet, 1959; Ieyama e Inaba, 1974; Rasotto et al.; 1981; Thiriot-Quévieux y Ayraud, 1982; Dixon y Flavell, 1986; Pasantes et al.; 1990), y *M. trossulus* (Insua Pombo, 1992).

Aunque no existen discrepancias en la bibliografía con respecto al número de pares de cromosomas metacéntricos de *M. edulis* y *M. trossulus* (6 en todos los estudios), sí existen en el caso de *M. galloprovincialis*. Así, Thiriot-Quévieux (1984) encontró que los mejillones de una población de Villafranche-sur-mer del Mar Mediterráneo presentaban 5 pares de cromosomas metacéntricos y 9 pares de cromosomas submeta- subtelo-céntricos, pero esta constitución no se confirmó en posteriores estudios por otros autores, ya que Dixon y Flavell (1986) analizando una población de Venecia, y Pasantes et al. (1990) una de Galicia, encontraron que el cariotipo estaba formado por 6 pares de cromosomas metacéntricos y 8 pares de cromosomas submeta- subtelo-céntricos. Además, en los tres casos, los índices centroméricos de los cromosomas están lo suficientemente distantes de 37'5 (valor de separación de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos según los criterios de Levan et al., 1964) como para diferenciar inequívocamente los cromosomas metacéntricos de los submetacéntricos.

En los muestreos realizados en este estudio hemos detectado que en las poblaciones de mejillón del litoral mediterráneo existen diferentes tipos de individuos, unos con metafases con 5 pares de cromosomas metacéntricos y otros con metafases con 6 pares. Por ello habría que reconsiderar la afirmación de Dixon y Flavell (1986) de que la causa de observar sólo 5 pares de cromosomas metacéntricos sea debida a la baja calidad de las preparaciones de Thiriot-Quévieux y Ayraud (1982). Además, hay que señalar que los mejillones de las dos poblaciones utilizadas por Dixon y Flavell (1986) son, según criterios electroforéticos, poblaciones mixtas entre *M. galloprovincialis* y *M. edulis* (Skibinski y Roderick, 1991). Por

otra parte, Ieyama (1983) encontró en una población de Seto (Japón) que el número de cromosomas metacéntricos es de 5 pares y, aunque en un principio denominó estos mejillones como *M. edulis*, trabajos posteriores los han determinado como *M. galloprovincialis* (McDonald et al., 1991). En las dos poblaciones de *M. galloprovincialis* estudiadas en Galicia sólo detectamos metafases con 6 pares de cromosomas metacéntricos y 8 de submeta-subtelocéntricos, al igual que observaron Pasantes et al. (1990).

En relación a las longitudes e índices centroméricos de los cromosomas de las metafases de *M. galloprovincialis* que medimos (tabla IV), comprobamos que existen diferencias en la condensación de los brazos cromosómicos, las cuales producen variaciones en la longitud relativa y en el índice centromérico de las diferentes poblaciones. Estas diferencias, después de realizar una comparación de medias mediante una t-student, son significativas solamente en el caso del cromosoma 4 de la población de Cullera con los de larvas y adultos de las poblaciones de Galicia, y en el del cromosoma 14 entre las dos poblaciones gallegas. Por otra parte, los cromosomas submetacéntricos y subtelocéntricos tienen sus índices centroméricos muy próximos a 25, límite de separación de clase según los criterios de Levan et al. (1964), y, por ello, existe esa gran variación en el número de cromosomas submeta- y subtelocéntricos que encuentran los diversos autores. Todo esto nos permite indicar que las simples diferencias en longitud relativa de algunos cromosomas o las variaciones en el número de cromosomas submetacéntricos o subtelocéntricos que se detectan en los cariotipos de mejillón no son suficientes para distinguir una especie de otra, ya que también existen grandes variaciones intraespecíficas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, debemos destacar que las metafases procedentes de larvas de cualquiera de las poblaciones tienen, generalmente, un grado de condensación menor que las metafases obtenidas de células de branquias, y que el índice mitótico que se obtiene a partir de células de larvas es superior al que se obtiene de células de branquias. Por otra parte, la dotación cromosómica de *M. edulis* y *M. trossulus* es siempre de 6 pares de cromosomas metacéntricos y 8 pares de submeta-subtelocéntricos; mientras que en el caso de *M. galloprovincialis* la dotación puede variar entre 5 pares de metacéntricos y 9 de submeta-subtelocéntricos, ó 6 pares de metacéntricos y 8 pares de submeta-subtelocéntricos.

5.2. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

Cuando intentamos inducir bandas G en metafases procedentes de células de branquias, la calidad y reproducibilidad disminuía, como ya habían indicado Méndez et al. (1990). Esta diferente respuesta entre metafases obtenidas de células de larvas y de células de branquias puede estar influenciada por I) el diferente estado de condensación cromosómica, II) la temperatura (43°C) a la cual se realizan las extensiones de células de branquias, que puede afectar a la estructura del cromosoma y/o III) la diferente forma de fijación de los cromosomas, ya que una se realiza en todo el tejido y la otra directamente sobre los núcleos. En relación al primer apartado, ya se ha indicado que en cromosomas metafásicos condensados es muy difícil visualizar cualquier tipo de banda (Sumner, 1976; González-Tizón et al., 1993b). En relación al segundo, la extensión a 43°C puede desnaturalizar algo al ADN o a algunas proteínas cromosómicas de forma que su estructura quede afectada. Y en relación al tercero, la fijación produce una pequeña desnaturalización del ADN de los cromosomas (Mace et al., 1972; Sumner et al., 1973; Kurnit, 1974; Mezzanotte et al., 1989) y una extracción de histonas que varía del 7 al 90% (Sumner, 1990), y aunque parece ser necesario cierto grado de desnaturalización para que se produzcan bandeos (Hancock y Sumner, 1982; Sumner, 1982), la dilaceración del tejido entero puede desnaturalizar en exceso al ADN, dificultando, así la obtención de bandas en individuos adultos. Por otra parte hay que señalar que en vertebrados heterotermos e invertebrados existe una gran dificultad en obtener patrones de bandas a lo largo de los brazos cromosómicos, a excepción de en algunos insectos y en anguila (Wiberg, 1983; Medrano et al., 1988). Según muchos autores esto se debería a la ausencia de diferenciación en cuanto a porcentajes de bases y/o estructura de los compartimentos cromosómicos responsables de las bandas G y R en vertebrados superiores (Medrano et al., 1988; Schmid y Almeida, 1988; Holmquist, 1989). La baja compartimentalización podría ser la causa de esta dificultad en la obtención de bandas.

Nuestros resultados, con respecto a la inducción de un patrón de bandas G, se muestran en el idiograma de la figura 7b, y presentan algunas diferencias con los que Méndez et al. (1990) habían obtenido después del tratamiento de las metafases con la solución salina 2xSSC. Así, en este trabajo, observamos que la mayoría de los centrómeros aparecen bandeados, mientras que dichos autores no detectaron bandas a nivel centromérico. Además, encontramos que la zona intercalar del cromosoma 7 tiene una gran banda clara y que la

región centromérica del cromosoma 11 muestra una banda oscura, mientras que, por el contrario, no vemos ninguna banda intercalar en el brazo p del cromosoma 8 ni otra intercalar próxima al centrómero en el brazo p del cromosoma 1.

En relación con el idiograma de bandas G en estado pro-metafásico que se muestra en el trabajo de Moore et al. (1986), nuestros resultados muestran claras diferencias. En una comunicación personal dichos autores indicaron que la inducción se realizó con tripsina, pero en posteriores trabajos no ha aparecido ningún tipo de fotografía presentando bandas G. Únicamente en un trabajo de Dixon et al. (1986) se muestra una fotografía con "bandas G" inducidas por tampón borato, aunque sólo se visualiza una zona terminal de un cromosoma con tinción tenue, careciendo el resto de los cromosomas del complemento de diferenciación longitudinal.

Nuestros resultados indican que la respuesta del genoma de *M. galloprovincialis* a la inducción de bandas G mediante el tratamiento con el enzima proteolítico tripsina, no puede estandarizarse a otras especies de moluscos bivalvos, pero nos ha permitido clasificar e identificar los pares cromosómicos de esta especie.

La tinción de las bandas C lleva implícito, generalmente, el empleo del colorante Giemsa. Este método permite el reconocimiento de zonas teñidas de azul oscuro que, clásicamente, se identificaron como heterocromatina, las cuales contrastan con el azul pálido de la eucromatina (Sumner, 1972; Comings et al., 1973; Marks, 1975; Webb, 1976). Sin embargo y debido a que con la técnica normal de bandas C se extrae el 60% del ADN cromosómico principalmente de las regiones eucromatínicas (Comings et al., 1973; Pathak y Arrighi, 1973; Holmquist, 1989; Burkholder y Ducek, 1982), es difícil teñir bien los cromosomas con la tinción Giemsa convencional, y en ciertos casos puede no distinguirse alguna banda (Lozano et al., 1990). Por ello, a veces, se tiñen los cromosomas por compuestos fluorescentes. Así, Bella et al. (1986) muestran que ciertas regiones de banda C en insectos sólo se visualizan teñiendo las metafases con naranja de acridina y no con Giemsa, y Sato (1988) mostró, en plantas, que el NOR asociado a segmentos de heterocromatina puede diferenciarse de otras regiones heterocromatínicas. Sin embargo, cuando teñimos metafases procedentes de células de larvas de *M. edulis* sólo visualizamos, como bandas C positivas, las

regiones teloméricas de los cromosomas 6 y 7. Por el contrario, con el empleo del colorante Giemsa pudimos visualizar un mayor número de regiones C-heterocromatínicas.

La heterocromatina constitutiva, que generalmente se visualiza mediante técnicas de bandeo C, es un componente del genoma de los eucariotas que presenta una gran variación en cuanto a contenido y distribución entre y dentro de las especies (John, 1988). La cantidad de heterocromatina constitutiva en estos organismos es escasa en comparación con otros invertebrados y vertebrados; no aparece localizada a nivel centromérico, sino que se limita a las regiones teloméricas y/o a lo largo de los brazos cromosómicos (heterocromatina intercalar), y, además, no está presente en todos los cromosomas del complemento. Cuando las bandas C se inducen en metafases procedentes de branquia de individuos adultos ya sean de *M. galloprovincialis* o *M. edulis* únicamente se visualizan las bandas C de los telómeros de los cromosomas 6 y 7.

Las causas de la diferente respuesta de los cromosomas de branquias y larvas al tratamiento de bandas C, son debidas seguramente a las razones expuestas anteriormente para las bandas G. Esto nos indicaría que las regiones teloméricas de los cromosomas 6 y 7 deben estar altamente protegidas y/o empaquetadas ya que en todos los casos de las tres especies, son las únicas regiones de banda C que se visualizan en metafases procedentes de branquias, no quedando desnaturalizadas después del tratamiento de extensión. Sin embargo, podría suceder, al igual que en ciertos organismos, que la heterocromatina presente en la línea germinal disminuyese con relación a la observada en tejidos somáticos por mecanismos en los que se incluyen reduplicación o eliminación del ADN heterocromatínico (John, 1988; Pimpinelli y Goday, 1989; Sprandling et al., 1992). Además, hay que señalar que *M. edulis* y *M. trossulus* o deben tener su ADN y/o proteínas más expuesto a la desnaturalización y/o sus regiones heterocromatínicas podrían ser menos ricas en pares de base A+T, habida cuenta de la dificultad de tinción de los cromosomas de larvas con naranjado acridina que, incluso en el caso de *M. edulis*, imposibilita el fotografiado debido a la escasa intensidad de la fluorescencia detectada después del empleo del colorante.

Los resultados obtenidos después de la inducción de bandeo C en *M. edulis* coinciden, en ciertos aspectos, con los que Dixon et al. (1986) habían obtenido, aunque ellos encuentran cuatro zonas heterocromatínicas. El cromosoma metacéntrico largo de las

metafases de *M. edulis* de Dixon et al. coincidiría con el cromosoma 1 de las metafases que nosotros obtuvimos; los cromosomas submeta- subtlocéntricos medianos serían el 6 y 7 y el submeta- subtlocéntrico pequeño se correspondería con el 13.

Insua Pombo (1992) encuentra bandas C en los telómeros de dos cromosomas submeta- subtlocéntricos medianos en las tres especies de mejillón, que se corresponderían con los cromosomas 6 y 7 de nuestras metafases. Además, también visualiza en *M. trossulus* otra banda C localizada en un cromosoma metacéntrico mediano que correspondería al cromosoma 8 que nosotros observamos.

Cuando comparamos las bandas C de *M. galloprovincialis*, *M. trossulus* y *M. edulis* observamos que los cromosomas 5, 7, 12 y 13 son semejantes; siendo los cromosomas 1, 3, 6, 8 y 9 los que diferencian a *M. galloprovincialis* de *M. edulis* y *M. trossulus*. El cromosoma 1 de *M. galloprovincialis* es muy diferente del que se observa en *M. edulis* y *M. trossulus* ya que únicamente posee una banda C intercalar, mientras que en las otras dos especies presenta dos bandas C teloméricas y otra centromérica, lo que implica algún tipo de reordenación del cromosoma 1 de *M. galloprovincialis* en su evolución desde *M. edulis*. Los cromosomas 3 y 8 de *M. edulis* y *M. trossulus* tienen bandas C en los telómeros de sus brazos p, que no se observan en *M. galloprovincialis* en el cual, sin embargo, se visualiza una banda C en la región telomérica del brazo q del cromosoma 9, y otra intercalar en el cromosoma 6.

Para que se produzca tinción con plata debe existir: a) una correlación entre la tinción y la actividad transcripcional en la interfase precedente, o b) una correlación entre descondensación y tinción, o c) ambas, ya que el estado descondensado es necesario pero no suficiente pues se necesita que exista actividad transcripcional en la interfase anterior para que la tinción con plata sea positiva (Jiménez et al., 1988).

Los NOR se sitúan en los tres tipos de mejillón en las regiones teloméricas de los cromosomas 6 y 7, coincidiendo con las bandas C que esos cromosomas presentan en dichas regiones. Esta asociación entre NOR y banda C, puede estar relacionada con el funcionamiento de los cistrones ribosomales y puede constituir un mecanismo de inactivación del exceso de genes ribosomales (Flavell et al., 1983). También puede ser que algunas

secuencias heterocromáticas constituyan espaciadores que flanqueen los NORs, jugando un papel importante en el origen de duplicaciones en tándem (Sola et al., 1988). El NOR que aparece en el cromosoma 8 de *M. trossulus* nos puede servir para diferenciar esta especie de las otras dos, sin embargo, aunque existen otras diferencias con el genoma de *M. galloprovincialis* la única que existe entre *M. edulis* y *M. trossulus* se basa en la aparición de ese NOR en el genoma de *M. trossulus*. El resto de las regiones heterocromáticas son iguales e incluso en ambas especies se localiza una región de banda C en dicho cromosoma. Esto nos lleva a suponer que quizás visualizando un mayor número de metafases podríamos detectar una región NOR en el cromosoma 8 de *M. edulis*.

Las regiones de los cromosomas 6 y 7 en las que se localizan los NOR aparecen, en metafases de larvas de *M. edulis* y *M. trossulus*, frecuentemente descondensadas (figuras 16 y 17), lo cual podría estar implicado en una elevada actividad transcripcional. Dixon et al. (1986) habían localizado los NORs de *M. edulis* en 4 cromosomas: en un metacéntrico grande, en 2 submeta- subtlocéntricos medianos y en un submetacéntrico pequeño, aunque en la composición fotográfica que realizan no se distingue claramente la posición de los centrómeros. Los NORs que observan en los cromosomas medianos podrían corresponder con los que nosotros visualizamos en los cromosomas 6 y 7. El NOR del cromosoma metacéntrico podría ser, de acuerdo con la suposición del párrafo anterior, el mismo que nosotros detectamos en el cromosoma 8 (aunque existe una clara diferencia de tamaño). En cuanto a la existencia de una región NOR en el cromosoma 14, sólo la visualizan en una metafase de 51, por lo que, quizás, debería suponerse que sea el cromosoma 7 y que haya sufrido una condensación desigual. Por el contrario los resultados de los NOR en *M. edulis* coinciden con los de Cornet (1993), ya que únicamente dos pares submeta- subtlocéntricos presentan NOR en sus telómeros.

En relación a los resultados obtenidos por Insua Pombo (1992), son totalmente coincidentes en las tres especies, dos regiones NOR en cromosomas submeta- subtlocéntricos medianos de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus*, y otro en un cromosoma metacéntrico mediano de *M. trossulus*. Sin embargo no hace ninguna mención a la existencia en ciertos casos de un NOR en el brazo p del cromosoma 7 de *M. trossulus* (figura 10e).

Por lo tanto, nuestros resultados indican que, en las tres especies, las regiones de heterocromatina constitutiva de los cromosomas 6, 7 y 8 son coincidentes con las regiones NOR, pudiendo estar dichas regiones solapadas o adyacentes.

Los cromosomas de mejillón no mostraron diferenciación longitudinal después de la tinción con quinacrina (figura 11a), tal y como sucede en las regiones centroméricas de ratón (Rowley y Bodmer, 1971), en la mayoría de los vertebrados heterotermos e invertebrados (Schmid, 1978; Schmid y Guttenbach, 1988; Sumner, 1990), y en plantas (Vosa y Marchi, 1972a, b; Sumner, 1990). La falta de diferenciación longitudinal de los cromosomas con quinacrina se podría pensar que sea debida a la existencia de guaninas en las regiones ricas en A+T, como sucede en ratón.

Tampoco observamos ninguna diferenciación longitudinal después de los tratamientos con Hoechst o con DAPI. Únicamente detectamos en la zona terminal de los cromosomas 6 y 7, en la que se localizan los NORs y las regiones CA3 positivas, una tinción negativa con el Hoechst y el DAPI. Cuando la tinción se realiza combinada con la actinomicina D se produce un mejor contraste (figuras 11b y 12a). Esta región terminal muy descondensada de cromosomas metafásicos de *M. edulis* y *M. trossulus* que se observa mejor cuando se tiñen los cromosomas con Hoechst o DAPI, ya había sido visualizada por Dixon y Flavell (1986) en metafases de *M. edulis*, y puede que esta descondensación facilite la actividad transcripcional de los genes que sintetizan el ARNr. En metafases obtenidas de células de branquias de cualquiera de las poblaciones es más difícil visualizar la región terminal de tinción negativa, siendo necesario la comparación de la misma metafase teñida con CA3 y DAPI.

La respuesta de los cromosomas de mejillón a la tinción con estos fluorocromos puede ser la causa de la ausencia de regiones de ADN ricas en secuencias de pares de bases A+T. Además, la dificultad de obtener un patrón de bandas G nos permite suponer que el genoma de estas especies debe poseer un pequeño grado de compartimentalización.

El fluorocromo CA3 produce una respuesta positiva en las regiones NOR de los cromosomas 6 y 7 de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus*. Esta coincidencia de regiones CA3+ y NOR+ ya se observó en un gran número de invertebrados, vertebrados y

plantas (Schweizer, 1976, 1980; Schmid, 1980; Deumling y Greilhuber, 1982; Schwarzacher y Schweizer, 1982; Rocchi et al., 1984; Fox y Santos, 1985; Cau et al., 1988). Sin embargo, no detectamos como región CA3 positiva el NOR del cromosoma 8 de *M. trossulus*, quizás debido al bajo número de repeticiones del rDNA, ya que además el tamaño de esta región NOR es inferior al de las otras dos. Podríamos suponer que existe un NOR latente en el cromosoma 8 de *M. edulis* en base a los resultados descritos por Dixon et al. (1986) y a la semejanza entre las regiones de bandas C, CA3 y respuesta a la acción de endonucleasas de restricción.

Por otra parte, con la CA3 hemos observado, en el brazo p del cromosoma 3 de *M. galloprovincialis*, una banda heterocromatínica que no habíamos conseguido visualizar después del bandeo C, al igual que han encontrado otros autores en diferentes especies (John y King, 1977; Camacho et al., 1984). La existencia de una región rica en G+C en el cromosoma 3 sin que exista un NOR activo, puede deberse a que este fuese latente. La riqueza en pares de bases G+C en *M. edulis* y *M. trossulus* debe ser menor que en *M. galloprovincialis*, ya que la visualización de las regiones CA3 positivas es más difícil al perder la fluorescencia más rápidamente, lo cual también puede estar relacionado con el menor grado de condensación cromatínica en esta región.

Por lo tanto las regiones de los cromosomas 6 y 7 banda C+, NOR+ de las tres especies de mejillón son ricas en G+C, contrariamente a lo afirmado por Dixon y McFadzen (1987) de que las regiones banda C+ NOR+ de *M. edulis* son ricas en A+T.

Las endonucleasas de restricción se utilizaron como señalaron, Miller et al. (1983), para inducir bandeos en especies en las que sea difícil obtener bandas G. Así, la digestión *in situ* de cromosomas fijados por endonucleasas de restricción, produjo patrones de bandas específicos en cada una de las especies estudiadas como ya habían encontrado otros autores en otras especies (Mezzanotte et al., 1983; Miller et al., 1983; Bianchi et al., 1985; Stefano et al., 1986; Ferrucci et al., 1987). Además, hemos encontrado una gran heterogeneidad subyacente a la heterocromatina constitutiva visualizada con el bandeo C, permitiéndonos detectar diferentes tipos de heterocromatina dentro del genoma del género *Mytilus* (tabla X).

La detección de estos tipos de heterocromatina es más significativa en los casos de las digestiones por endonucleasas que reconocen secuencias ricas en pb G+C (Hae III, Cfo I, Hpa II, Msp I y Apa I). Así, las regiones teloméricas de los cromosomas 6 y 7 de las tres especies de mejillón estudiadas en este trabajo, parecen estar protegidas de la actividad de dichas endonucleasas ya que aparecen ligeramente digeridas. Lo mismo sucede con las bandas intercalares de los cromosomas 5 y 12, de las tres especies, y con la banda telomérica del cromosoma 8 de *M. edulis* y de *M. trossulus*. La actividad de estas endonucleasas es más acusada en el caso de la banda telomérica del brazo q del cromosoma 1 de *M. edulis* y de *M. trossulus*, y en el de la intercalar del cromosoma 1 y la telomérica del brazo p del cromosoma 3 de *M. galloprovincialis*. La heterocromatina más fuertemente digerida por estas endonucleasas es la que localizamos en la banda telomérica del brazo p del cromosoma 1 de *M. edulis* y de *M. trossulus*.

Las diferencias observadas en la digestión cromosómica por los isosquizómeros Hpa II y Msp I pueden ser indicativas del grado de metilación de una especie. Así, podríamos sugerir que en *M. galloprovincialis* el grado de metilación es, en general, moderado, siendo elevada la metilación en las regiones teloméricas del brazo corto del cromosoma 3 y brazo largo del cromosoma 9 y escasa en las dos regiones NOR de los cromosomas 6 y 7.

El grado de metilación de los cromosomas de las larvas de *M. edulis* parece superior al que habíamos observado para *M. galloprovincialis*, ya que las diferentes respuestas del genoma de estos organismos a la digestión por Hpa II y Msp I son mayores. Así, exceptuando los cromosomas 1, 5 y 13, el ADN de *M. edulis* parece estar más metilado, y por lo tanto, también sus regiones NOR.

El grado de metilación en *M. trossulus* es menor que en *M. edulis* pero superior al de *M. galloprovincialis*. Los resultados parecen indicar que el NOR del cromosoma 7 está ligeramente metilado, y por el contrario los NORs de los cromosomas 6 y 8 no lo están.

Según esto y en relación a que los NORs activos no están metilados mientras que los inactivos están hipermetilados (Miller et al., 1978; Lau et al., 1979; Tantravahi, 1981; Bernstein et al., 1981; Velázquez et al., 1991), nuestros resultados sugieren que en el genoma del género *Mytilus* el grado de actividad de los NORs del cromosoma 6 parece

ser superior al del cromosoma 7, y que el grado de actividad de los NORs de larvas de *M. galloprovincialis* son superiores a los de *M. trossulus* y estos a su vez a los de *M. edulis*, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Insua Pombo (1992) de que la actividad del NOR del cromosoma 6 es superior a la del 7.

Aunque sigue debatiéndose el significado evolutivo de las variaciones que sufren la heterocromatina y el ADN asociado a ella, se cree que estas puedan ser la causa por la cual se produzcan la mayoría de los cambios en el tamaño y estructura de los cromosomas durante la divergencia de las especies (Flavell, 1982). Actualmente se han propuesto dos modelos para explicar la localización y formación de regiones heterocromatínicas. Schweizer y Loidl (1986) sugieren que los telómeros son los lugares de iniciación de las bandas C, a partir de los cuales hay una transferencia de heterocromatina hacia las regiones intersticiales de otros cromosomas no homólogos. Este proceso tendría lugar durante la mitosis y/o meiosis. El segundo modelo, propuesto por Macgregor y Sessions (1986), supone que las bandas C se dispersarían desde las zonas heterocromáticas de iniciación, situadas en los centrómeros, hacia la región pericéntrica, y desde ella hacia los telómeros, por lo que los cariotipos con mayor cantidad de heterocromatina telomérica tendrían un status filogenético más antiguo.

Con respecto a estas teorías, nuestros resultados confirmarían los datos paleontológicos que indican que *M. edulis* es una especie más primitiva que *M. galloprovincialis*, ya que *M. edulis* posee más cantidad de heterocromatina telomérica. Además, *M. galloprovincialis* presenta mayor cantidad de heterocromatina localizada a nivel intercalar. De esta forma, según el modelo de Schweizer y Loidl, podría sugerirse que la banda intercalar del cromosoma 1 de *M. galloprovincialis* procediese del brazo p del cromosoma 3 de *M. edulis*, al ser ambos tipos de heterocromatina muy similares. La región telomérica del brazo p del cromosoma 3 de *M. galloprovincialis*, que es CA3+, banda C-, NOR-, podría proceder de las regiones teloméricas de los cromosomas 6 ó 7 de *M. edulis*, ya que constituyen las únicas regiones en esta especie que son CA3 positivas.

Por todo ello, observamos que las diferencias entre los genomas de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* son mayores que las existentes entre los de *M. edulis* y *M. trossulus*, y no son debidas únicamente a una inversión pericéntrica del cromosoma 2 como habían

sugerido Thiriot-Quévieux y Ayraud (1982), localizándose, preferentemente, en los cromosomas 1, 3, 6, 8 y 9 (tabla X).

Entre las especies *M. edulis* y *M. trossulus* casi no existen diferencias cariológicas. Las únicas que encontramos se basan en la detección de una región NOR en el cromosoma 8 y en algunos casos en el brazo p del cromosoma 7, que nunca hemos detectado en *M. edulis*. Aunque, podría ser que el NOR del cromosoma 8 de *M. edulis* fuese de tipo estricto, como encontraron Santos et al. (1990) en el ortóptero *Pycnogaster cucullata*. Además, ambas especies de mejillón presentan banda C en dicha posición y ésta en ambos casos es CA3 negativa. Por otra parte la aparición del NOR en el cromosoma 7 de *M. trossulus*, que es banda C y CA3 negativas, es muy ocasional. Sería interesante realizar un estudio con diferentes poblaciones de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus* mediante estudios de hibridación *in situ* para comprobar la distribución de los genes ARN ribosómicos en el genoma de estos moluscos.

Hay que señalar que nosotros no observamos que las bandas C positivas se correspondan con las G negativas tal y como indicaron Dixon y Flavell (1986), ya que podemos observar (figuras 7 y 8) como las bandas G positivas coinciden en *M. galloprovincialis* con las bandas C positivas, como sucede, generalmente, en mamíferos. Además, en los casos de las bandas teloméricas de los cromosomas 6 y 7, estas bandas G oscuras son ricas en G+C (figuras 6a, 11b), lo cual estaría en contraposición con lo que sucede en mamíferos de que las regiones ricas en A+T corresponden a bandas G. Pero no se contradeciría con que la mayoría de los genes que han sido mapeados con suficiente precisión se localizan en las regiones ricas en G+C (Rodinov, 1985; Bickmore y Sumner, 1989; Mouchiroud et al., 1991), apareciendo especialmente concentrados en una subclase de las bandas R (ricas en GC) que son las bandas T (Holmquist, 1992; Saccone et al., 1992).

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- Confirmamos que la dotación diploide de las tres especies de *Mytilus* estudiadas en este trabajo, está constituida por 14 pares cromosómicos. En *M. edulis* y *M. trossulus* 6 de estos pares son siempre metacéntricos, pero en *M. galloprovincialis* existe una variación en el número de pares de cromosomas metacéntricos, que puede ser de 5 ó 6. Los restantes pares cromosómicos son submetacéntricos/subtelocéntricos.

2.- La respuesta del genoma de *M. galloprovincialis* a la inducción de bandas G mediante el tratamiento con el enzima proteolítico tripsina, nos permite identificar los pares cromosómicos de esta especie y confirma la existencia de un cierto grado de compartimentalización del genoma.

3.- En las tres especies estudiadas los pares cromosómicos números 5, 7, 12 y 13 aparecen siempre con bandas C, existiendo diferencias entre *M. galloprovincialis* y *M. edulis* en la situación de las bandas C de los cromosomas 1, 3, 6, 8 y 9. Por lo que respecta a las especies *M. edulis* y *M. trossulus* no existe ninguna diferencia en cuanto a cantidad y localización de las regiones de bandas C.

4.- Las regiones organizadoras del nucleolo (NOR) se sitúan, en los tres tipos de mejillón, en las regiones teloméricas de los cromosomas 6 y 7, las cuales también son regiones ricas en pares de base G+C (regiones CA3+); siendo además el NOR del cromosoma 6 más activo que el del cromosoma 7. En *M. trossulus* existe otra región organizadora del nucleolo en el cromosoma 8, y en *M. galloprovincialis* otra región rica en G+C en el cromosoma 3.

5.- El tratamiento de los cromosomas del G. *Mytilus* con los fluorocromos quinacrina, Hoechst y DAPI, no mostraron ninguna respuesta diferencial. Esto podría ser indicativo del grado de dispersión de las secuencias ricas en pares de base A+T a lo largo del genoma de estas especies. En *M. edulis* y *M. trossulus* se observa, en un gran número de metafases, que las regiones teloméricas de los cromosomas 6 y 7 presentan un elevado grado de descondensación.

6.- La digestión *in situ* con diferentes endonucleasas de restricción nos ha permitido encontrar una gran heterogeneidad molecular subyacente a la heterocromatina

CONCLUSIONES

constitutiva detectando diferentes tipos de heterocromatina dentro del genoma del *G. Mytilus*. En este género, la heterocromatina telomérica de los cromosomas 6 y 7 se muestra altamente protegida a la digestión por las endonucleasas cuya secuencia de reconocimiento está constituida por pares de base G+C. Las ligeras diferencias encontradas en la respuesta de los cromosomas a la acción de los isosquizómeros Hpa II y Msp I, podría indicarnos la existencia de un cierto grado de metilación en el genoma de estos organismos, que en el caso de *M. edulis* es superior al de *M. galloprovincialis*.

7.- La existencia de mayor cantidad de heterocromatina telomérica en *M. edulis* y la mayor cantidad de heterocromatina intercalar en *M. galloprovincialis*, podría confirmar el status filogenético más antiguo de *M. edulis*.

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM, R; J. WEINBERG y W. SCHNEDL, 1983. Analysis of heterochromatin and identification of mitotic chromosomes in *Drosophila virilis* by GC- and AT-specific fluorochromes. *Mikroskopie*, **40**: 4-8.
- AGUIRRE, M.P. 1980. Biología del mejillón (*M. edulis*) de cultivo en la ría de Vigo. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, **5**: 107-160.
- AHMAD, M. y J.A. BEARDMORE, 1976. Genetic evidence that the "Padstow Mussel" is *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.*, **35**: 139-147.
- AHMED, M. y A.K. SPARKS, 1970. Chromosome number, structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *Biol. Bull.*, **138**: 1-13.
- ATTARDI, G y F. AMALDI, 1970. Structure and synthesis of ribosomal RNA. *Ann. Rev. Biochem.*, **39**: 183-226.
- BABU, A. 1988. Heterogeneity of heterochromatin of human chromosomes as demonstrated by restriction endonuclease treatment. En **Heterochromatin: Molecular and structural aspects**: 250-275. Ed. R.S. Verma, Cambridge University Press, Cambridge.
- BABU, A. y R.S. VERMA, 1986. Expression of heterochromatin by restriction endonuclease treatment and distamycin A/DAPI staining of Indian muntjac (*Muntiacus muntjak*) chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, **41**: 96-100.
- BABU, A. y R.S. VERMA, 1987. Chromosome Structure: Euchromatin and Heterochromatin. *Inter. Rev. Cytol.*, **108**: 1 - 60.
- BARSOTTI, G. y MELUZZI, C, 1968 . Osservazioni su *Mytilus edulis* L. e *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. *Conchiglie*, **4**: 50-58
- BEAUMONT, A.R.; R. SEED y P. GARCÍA MARTÍNEZ, 1989. Electrophoretic and morphometric criteria for the identification of the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. En **Reproduction, genetics and distribution of marine organisms**: 251-258. Ed. J. Ryland y P.A. Tyler, Olsen and Olsen, Fredensborg, Denmark.
- BEÇAK, M.L.; R DE C.S. DOS SANTOS; M.D. SOARES-SCOTT; R.F. BATISTIC y H. COSTA, 1988. Chromosome structure in man and Amphibia-Anura, restriction enzymes. *Rev. Brasil. Genet.*, **11**: 939-948.
- BELLA, J.L.; C. GARCÍA DE LA VEGA; C. LÓPEZ FERNÁNDEZ y J. GOSÁLVEZ. 1986. Changes in acridine orange binding and its use in the characterization of heterochromatic regions. *Heredity*, **57**: 79-83.

BIBLIOGRAFÍA

- BERNARDI, G., 1989. The isochore organization of the human genome. *Ann. Rev. Genet.*, **23**: 637-661.
- BERNARDI, G.; B. OLOFSSON; J. FILPSKI; M. ZERIAL; J. SALINAS; G. CUNY; M. MEUNIER-ROTIVAL y F. RODIER, 1985. The mosaic genome of warm-blooded vertebrates. *Science*, **228**: 953-958.
- BERNSTEIN, R.; B. DAWSON y J. GRIFFITS, 1981. Human inherited marker chromosome 22 short-arm enlargement: investigation of rRNA gene multiplicity. Ag-band size and acrocentric association. *Hum. Genet.*, **58**: 135-139.
- BIANCHI, M.S. y N.O. BIANCHI, 1987. Analysis of the eukaryotic chromosome organization with restriction endonucleases. En *Cytogenetics*: 280-299. Ed. G. Obe y A. Basler, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- BIANCHI, M.S.; N.O. BIANCHI; G.E. PANTELIAS y S. WOLFF, 1985. The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes. *Chromosoma*, **91**: 131 - 136.
- BIANCHI, M.S.; N.O. BIANCHI; U. GRIPENBERG; M. WESSMAN y S. HUUHTANEN 1990. Characterization of the heterochromatin in moose (*Alces alces*) chromosomes. *Genetica*, **80**: 1-7.
- BICKMORE, W.A. y A.T. SUMNER, 1989. Mammalian chromosome banding: an expression of genome organization. *Trends Genet.*, **5**: 144-148.
- BIRNSTIEL, M.L.; M. CHIPCHASE y J. SPEIRS, 1971. The ribosomal RNA cistrons. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **11**: 351-389.
- BOSS, K.J., 1982. Mollusca. En *Synopsis and classification of living organisms*: 945-1166. Ed. S.Q. Parker, McGraw-Hill, New York.
- BROSS, K y W. KRONE, 1973. Ribosomal cistrons and acrocentric chromosomes in man. *Hum. Genet.*, **18**: 71-75.
- BROW, D.D.; P.C. WENSINK y E. JORDAN, 1972. A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *J. Mol. Biol.*, **63**: 57-73.
- BROW, S.W., 1966. Heterochromatin. *Science*, **151**: 417-425.
- BULNHEIM, H.P. y E. GOSLING, 1988. Population genetic structure of mussels from the Baltic Sea. *Helgoländer Meeresunters.*, **42**: 113-129.

BIBLIOGRAFÍA

- BULL, J. J., 1983. **Evolution of sex determining mechanisms**: 316. Ed. Benjamin Cumming Publishing Company, California.
- BURKHOLDER, G.D., 1989. Morphological and biochemical effects of endonuclease on isolated mammalian chromosomes *in vitro*. **Chromosoma**, **97**: 347 - 355.
- BURKHOLDER, G.D. y L.L. DUCZEK, 1982. The effect of chromosome banding techniques on the proteins of isolated chromosomes. **Chromosoma**, **87**: 425-435.
- CAMACHO, J.P.M.; E. VISERAS; J. NAVAS y J. CABRERO, 1984. C-heterochromatin content of supernumerary chromosome segments of grasshoppers: detection of an euchromatic extra segment. **Heredity**, **53**: 165-175.
- CASPERSSON, T.; S. FABER; G.E. FOLEY; J. KUDYNOWSKI; E.J. MODEST; F. SIMONSSON; U. WAGH y L. ZECH, 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. **Exp. Cell Res.**, **49**: 219 - 222.
- CAU, A.; S. SALVADORI; A.M. DEIANA; J.L. BELLA y R. MEZZANOTTE, 1988. The characterization of *Muraena helena* L. mitotic chromosomes: karyotype, C-banding, nucleolar organizer regions, and *in situ* digestion with restriction endonucleases. **Cytogenet. Cell Genet.**, **47**: 223 - 226.
- CIONINI, P.G.; P. BASSI; R. CREMONINI y A. CAVALLINI, 1985. Cytological localization of fast renaturing and satellite DNA sequences in *Vicia faba*. **Protoplasma**, **124**: 106-111.
- COMINGS D.E., 1971. Heterochromatin of the Indian muntjac. Replication, condensation, DNA ultracentrifugation, fluorescent and heterochromatin staining. **Exp. Cell Res.**, **67**: 441-460.
- COMINGS D.E., 1975. Mechanism of chromosome banding. VIII. Hoechst 33258-DNA interaction. **Chromosoma**, **52**: 229-243.
- COMINGS D.E.; E. AVELINO; T.A. OKADA y H.E. WYANDT, 1973. The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. **Exp. Cell Res.**, **77**: 469 - 493.
- CORNET, M., 1993. A short-term culture method for chromosome preparation from somatic tissues of adult mussel (*Mytilus edulis*). **Experientia**, **49**: 87-90.
- CORNEO, G.; E. GINELLI y E. POLLI, 1970. Repeated sequences in human DNA. **J. Molec. Biol.**, **48**: 319-327.
- COUSTAU, C.; F. RENAUD y B. DELAY, 1991. Genetic characterization of the hybridization between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on the Atlantic coast of France. **Mar. Biol.**, **111**: 87-93.

BIBLIOGRAFÍA

- CRESPO, C.A.; T. GARCÍA-CABALLERO; A. BEIRAS y J. ESPONSA, 1990. Evidence from sperm ultrastructure that the mussel of Galician estuaries is *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. **J. Moll. Stud.**, **56**: 127-128.
- DEUMLING, B y J. GREILHUBER, 1982. Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by *in situ* hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. **Chromosome**, **84**: 535-555.
- DIXON, D.R. y N. FLAVELL, 1986. A comparative study of the chromosomes of *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. **J. Mar. Biol. Ass. U.K.**, **66**: 219-228.
- DIXON, D.R. e I.R.B. McFADZEN, 1987. Heterochromatin in the interphase nuclei of the common mussel *Mytilus edulis* L. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, **112**: 1-9.
- DIXON, D.R.; I.R.B. MCFADZEN y K. SISLEY, 1986. Heterochromatic marker regions (nucleolar organisers) in the chromosomes of the common mussel, *Mytilus edulis* (Mollusca: Pelecypoda). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, **97**: 205-212.
- DONLON, T.A. y R.E. MAGENIS, 1983. Methyl green is a substitute for distamycin A in the formation of distamycin A/DAPI C-bands. **Hum. Genet.**, **65**: 144-146.
- DOOLITE, W.F. y C. SAPIENZA, 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. **Nature**, **284**: 601.
- ELLISON, J.R. y J.J. BARR, 1972. Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. Late replication and high A+T content in *Samoaia leonensis*. **Chromosoma**, **36**: 375-390.
- FERGUSON, A., 1980. **Biochemical Systematics and Evolution**: 194. Ed. Blackie, Glasgow.
- FERRUCCI, L.; E. ROMANO y G.F. DE STEFANO, 1987. The Alu I-induced bands in great apes and man: implications for heterochromatin characterization and satellite DNA distribution. **Cytogenet. Cell Genet.**, **44**: 53 - 57.
- FIGUERAS, A. 1976. Cultivo del mejillón *M. edulis* y posibilidades para su expansión. En **Advances in Aquaculture**: 361-371. FAO, Technical Conference on Aquaculture, Kyoto.
- FLAVELL, R.B., 1982. Sequence amplification, deletion and rearrangement: major sources of variation during species divergence. En **Genome evolution**: 301-324. Ed. G.A. Dover y R.B. Flavell, Academic Press, London.

BIBLIOGRAFÍA

- FLAVELL, R.B.; M. O'DELL y W.F. THOMPSON, 1983. Cytosine methylation of ribosomal RNA gene and nucleolus organizer activity in wheat. En **Kew Chromosome Conference II**: 11-17. Ed. Allen & Unwin, London.
- FOX, D.P. y J.L. SANTOS, 1985. N-bands and nucleolus expression in *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. **Heredity**, **54**: 333-341.
- FREDIANI, M.; R. MEZZANOTTE; R. VANNI; D. PIGNONE y R. CERMONINI, 1987. The biochemical and cytological characterization of *Vicia faba* DNA by means of Mbo I, Alu I and Bam HI restriction endonucleases. **Theoret. App. Genet.**, **75**: 46-50.
- GARDNER, J.P.A., 1992. *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) (Bivalvia, Mollusca): the taxonomic status of the mediterranean mussel. **Ophelia**, **35**: 219-243.
- GARDNER, J.P.A. y SKIBINSKI, D.O.F., 1988. Historical and size-dependent genetic variation in hybrid mussel populations. **Heredity**, **61**: 93-105.
- GHOSH, S., 1976. The nucleolar structure. **Inter. Rev. Cytol.**, **44**: 1-28.
- GONZÁLEZ-TIZÓN, A.M.; A. MARTÍNEZ-LAGE, y J. MÉNDEZ, 1993a. Chromosomal DNA extraction after restriction endonuclease treatments: a study by microdensitometry and electrophoresis. **Cytobios**, **74**: 177-188.
- GONZÁLEZ-TIZÓN, A.M.; A. MARTÍNEZ-LAGE, y J. MÉNDEZ, 1993b. Analysis of the influence of chromosomal condensation on the activity of restriction endonucleases. **Cytobios**, **76**: 105-112.
- GOODPASTURE C. y S.E. BLOOM, 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma** **53**: 37 - 50.
- GOSÁLVEZ, J.; J.L. BELLA; C. LÓPEZ-FERNÁNDEZ y R. MEZZANOTTE, 1987. Correlation between constitutive heterochromatin and restriction enzyme resistant chromatin in *Arcyptera tornosi* (Orthoptera). **Heredity**, **59**: 173 - 180.
- GOSÁLVEZ, J.; C. LÓPEZ-FERNÁNDEZ y V. GOYANES, 1989. Detection of criptic bands by Alu I in eukaryotic chromosomes. **Genome**, **32**: 672-675.
- GOSLING, E.M., 1984. The systematic status of *Mytilus galloprovincialis* in Western Europe: a review. **Malacologia**, **25**: 551-568.
- GOSLING, E.M., 1992a. Systematics and geographic distribution of *Mytilus*: 1-20. En **The Mussel Mytilus**. Ed. E.M. Gosling, Elsevier Press, Amsterdam.
- GOSLING, E.M., 1992b. Genetics of *Mytilus*: 309-382. En **The Mussel Mytilus**. Ed. E.M. Gosling, Elsevier Press, Amsterdam.

BIBLIOGRAFÍA

- GOSLING, E.M. y N.P. WILKINS, 1981. Ecological genetics of the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on Irish coasts. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 4: 221-227.
- GOULD, A.A., 1850. Shells from the United States Exploring Expedition. **Proc. Boston Soc. Nat. Hist.**, 3: 343-348
- GRANT, W.S. y M.I. CHERRY, 1985. *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in Southern Africa. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 90: 179-191.
- HANCOCK, J.M. y A.T. SUMNER, 1982. The role of proteins in the production of different types of chromosome bands. **Cytobios**, 35: 37-46.
- HEITZ, E., 1928. Das heterochromatin der moose. I. **Jahrb. Wiss. Bot.**, 69: 762-818.
- HEPPER, B.T., 1957. Notes on *Mytilus galloprovincialis* Lamark in Great Britain. **J. Mar. Biol. Ass. U.K.**, 36:33-40
- HERNÁNDEZ, J. y F. JIMÉNEZ, 1971. Distribución de los moluscos: Gasterópodos y Pelicípodos marinos de las costas de Galicia. **Cuad. Biol., Univ. Granada**, 1: 79-94.
- HERRERO, P.; J. DE LA TORRE; J. GOSÁLVEZ y A.T. SUMNER, 1992. Heterochromatin characterization of sex chromosomes in *Triturus marmoratus* (Urodela, Salamandridae). **Cytogenet. Cell Genet.**, 60: 150-153.
- HIDALGO, J.G. 1971. Fauna malacológica de España, Portugal y Baleares: Moluscos Testáceos Marinos. **Trab. Mus. Nac. Cienc. Nat., Ser. Zool.**, 30: 462-466.
- HILWIG, I. y A. GROPP, 1972. Staining of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes with a new fluorochrome. **Exp. Cell Res.**, 75: 122-126.
- HOLMQUIST, G. 1989. Evolution of chromosome bands; molecular ecology of noncoding DNA. **J. Mol. Evol.**, 28: 469-486.
- HOLMQUIST, G. 1992. Chromosomes bands, their chromatin flavours, and their functional features. **Am. J. Hum. Genet.**, 51: 17-37.
- HOWELL, W.M., 1977. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, 62: 361-367.
- HOWELL, W.M., 1982. Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs). En **The Cell Nucleus**, 11: 89-142. Ed. Academic Press, New York.

BIBLIOGRAFÍA

- HOWELL, W.M. y D.A. BLACK, 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, **36**: 1014-1015.
- HUBBELL, H.R., 1985. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. **Stain Technology**, **60**: 285-294.
- IEYAMA, H., 1983. Karyotype in *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mytilidae). **Mem. Facul. Edu. Ehime Univ.**, **3**: 23-26.
- IEYAMA, H. y A. INABA, 1974. Chromosome numbers of ten species in four families of Pteriomorphia (Bivalvia). **Venus**, **33**: 129-137.
- INSUA POMBO, A. 1992. Estudio cariológico en moluscos bivalvos. **Tesis Doctoral**. Facultad de Ciencias, Universidad de La Coruña.
- INSUA, A. y C. THIRIOT-QUIÉVREUX, 1991. The characterization of *Ostrea denselamellosa* (Mollusca, Bivalvia) chromosomes: Karyotype, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. **Aquaculture**, **97**: 317-325.
- INSUA, A. y C. THIRIOT-QUIÉVREUX, 1993. Karyotype and nucleolus organizer regions in *Ostrea puelchana* (Bivalvia: Ostreidae). **The Veliger**, **36**: 215-219.
- JIMÉNEZ, R.; M. BURGOS y R. DÍAZ DE LA GUARDA, 1988. A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. **Heredity**, **60**: 125-127.
- JOHN, B., 1988. The biology of heterochromatin. En **Heterochromatin: molecular and structural aspects**: 1-147. Ed. R.S. Verma, Cambridge University Press, Cambridge.
- JOHN, B. y M. KING, 1977. Heterochromatin variation in *Cryptobothrus chrysophorus*. II. Patterns of C-banding. **Chromosoma**, **65**: 59-79.
- JOHN, B.; M. KING; D. SCHWEIZER y M. MENDELAK. 1985. Equilocality of heterochromatin distribution and heterochromatin heterogeneity in acridic grasshoppers. **Chromosoma**, **91**: 185-200.
- JORGENSON, K.F.; J.H. VAN DE SANDE y C.C. LIN, 1978. The use of base pair specific DNA binding agents as an affinity labels for the study of mammalian chromosomes. **Chromosoma**, **68**: 287-302.
- JUAN, C.; J. GOSÁLVEZ y E. PETITPIERRE 1990. Improving beetle karyotype analysis: restriction endonuclease banding of *Tenebrio molitor* chromosomes. **Heredity** **65**: 157-162.

BIBLIOGRAFÍA

- KAMISUGI, Y.; Y. IKEDA; M. OHNO; M. MINEZAWA y K. FUKUI, 1992. *In situ* digestion of barley chromosomes with restriction endonucleases. **Genome**, **35**: 793-798.
- KATO, H y T.H. YOSIDA, 1972. Banding patterns of Chinese hamster chromosomes revealed by new techniques. **Chromosoma**, **36**: 272-280.
- KOEHN, R.K., 1991. The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*. **Aquaculture**, **9**: 125-145.
- KURNIT, D.M., 1974. DNA helical content during the C-banding procedure. **Cytogenet. Cell Genet.**, **13**: 313-329.
- LAMARCK, J.B.P.A. de, 1819. **Histoire naturelle des animaux sans vertébrés**. Vol. 6. Ed. A.S.B. Verdier Libraire, Paris.
- LAMY, E., 1936. Révision des Mytilidae vivants du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. **J. Conchy.**, **80**: 66-363.
- LATT, S.A.; L.A. JUERGENS; D.J. MATTHEWS; K.M. GUSTASHAW y E. SAHAR, 1980a. Energy transfer-enhanced chromosome banding. An overview. **Cancer Genet. Cytogenet.**, **1**: 187-196.
- LATT, S.A.; E. SAHAR; M.E. EISENHARDT y L.A. JUERGENS, 1980b. Interactions between pairs of DNA-binding dyes: results and implications for chromosome analysis. **Cytometry**, **1**: 2-12.
- LATT, S.A. y J.C. WOHLLEB, 1975. Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin and metaphase chromosomes. **Chromosoma**, **52**: 297-316.
- LAU, Y.F.F.; W. WERTELECKI; R.A. PFEIFFER y F.E. ARRIGHI, 1979. Cytological analyses of a 14p+ variant by means of N-banding and combinations of silver staining and chromosome bandings. **Hum. Genet.**, **46**: 75-82.
- LEEMAN, U. y F. RUCH, 1983. DNA and base content in the nuclei and the sex chromatin of *Rumex acetosa*. **Bot. Helvetica**, **93**: 77-83.
- LEVAN, A.; K. FREDGA y A.A. SANDBERG, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, **52**: 201-220.
- LEWIS, J.R. y R. SEED, 1969. Morphological variations in *Mytilus* from S.W. England in relation to the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.). **Cah. Biol. Mar.**, **10**: 231-253.

BIBLIOGRAFÍA

- LICA, L. y B. HAMKALO, 1983. Preparation of centromeric heterochromatin by restriction endonuclease digestion of mouse L929 cells. **Chromosoma**, **88**: 42 - 49.
- LINNAEUS, C., 1758. **Systema naturae per regna tria naturae**, 1: 1384. 10th. Edition, Ed. Regnum animalium. Laurentii Salvi, Stockholm.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; J. GOSÁLVEZ; L. FERRUCCI y R. MEZZANOTTE, 1991. Restriction endonuclease in the study of eukaryotic chromosomes. **Genetica**, **83**: 257-274.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; J. GOSÁLVEZ y R. MEZZANOTTE, 1989. Heterochromatin heterogeneity in *Oedipoda germanica* (Orthoptera) detected by *in situ* digestion with restriction endonucleases. **Heredity** **62**: 269 - 277.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; J. GOSÁLVEZ; J.A. SUJA y R. MEZZANOTTE, 1988. Restriction endonuclease digestion of meiotic and mitotic chromosomes in *Pyrgomorpha conica* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). **Genome**, **30**: 621 - 626.
- LOZANO, R.; M. JAMILÉNA; C. RUÍZ REJÓN y M. RUÍZ REJÓN. 1990. Characterization of the chromatin of some liliaceous species after digestion with restriction endonucleases and sequential Giemsa, fluorochrome and silver staining. **Heredity**, **64**: 185-195 .
- LOZANO, R.; C. RUÍZ REJÓN y M. RUÍZ REJÓN, 1991. An analysis of coho salmon chromatin by means of C-banding, Ag- and fluorochrome staining, and *in situ* digestion with endonucleases. **Heredity**, **66**: 403-409.
- LUBET, P., 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés (Mollusques Bivalves). **Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.**, **23**: 387-548.
- LUBET, P., 1973. Exposé synoptique des données biologiques sur la moule *Mytilus galloprovincialis*. **Synopsis F.A.O. sur les pêches**, **88**: 1-150.
- LUBET, P. 1976. L'espèce chez les lamellibranches marins. **Mém. Soc. Zool. Fr.**, **38**: 341-368.
- LUBET, P.; G. PRUNUS, M.; MASSON y D. BUCAILLE, 1984. Recherches expérimentales sur l'hybridisation de *Mytilus edulis* L. et *Mytilus galloprovincialis* Lmk. **Bull. Soc. Zool. France**, **109**: 87-98.
- LUDEÑA, P.; C. SENTÍS; A.M. FERNÁNDEZ PERALTA; J. GONZÁLEZ-AGUILERA y J. FERNÁNDEZ-PIQUERAS, 1990. New distinctions between regions of centromeric heterochromatin in human chromosomes by treatments with isoschizomeres Nde II - Sau 3AI. **Genome**, **33**: 785-788.

BIBLIOGRAFÍA

- LLOYD M.A. y G.H. THORGAARD, 1988. Restriction endonuclease banding of rainbow trout chromosomes. **Chromosoma**, **96**: 171 - 177.
- McDONALD, J.H. y R.K. KOEHN, 1988. The mussel *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the pacific coast of North America. **Mar. Biol.**, **99**: 111-118.
- McDONALD, J.H.; R.K. KOEHN; E.S. BALAKIREV; G.P. MANCHENKO; A.L. PUDOVKIN; S.O. SERGIYEVSKII y K.V. KRUTOVSKII, 1990. Species identity of the "common mussel" inhabiting the Asiatic coasts of the Pacific Ocean. **Biol. Morya**, **1**: 13-22.
- McDONALD, J.H.; R. SEED y R.K. KOEHN, 1991. Allozyme and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern Hemispheres. **Mar. Biol.**, **111**: 323-335.
- MACGREGOR, H.C. y S.K. SESSIONS, 1986. The biological significance of variation in satellite DNA and heterochromatin in newts of the Genus *Triturus*: an evolutionary perspective. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, **B312**: 243-259.
- MACE, M.L.; S.S. TEVETHIA y B.R. BRINKLEY, 1972. Differential immunofluorescent labelling of chromosomes with antisera specific for single strand DNA. **Exp. Cell Res.**, **75**: 521-523.
- MARCHI, A. y R. MEZZANOTTE, 1988. Restriction endonuclease digestion and chromosome banding in the mosquito, *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae). **Heredity**, **60**: 21 - 26.
- MARIÑO, J.; A. PÉREZ y G. ROMÁN, 1982. El cultivo del mejillón (*Mytilus edulis* L.) en la Ría de Arosa. **Bol. Ins. Esp. Oceanogr.**, **7**: 297-308.
- MARKS, G.E., 1975. The Giemsa staining centromeres of *Nigella damascena*. **J. Cell Sci.**, **18**: 19-25.
- MEDRANO, L.; G. BERNARDI; J. COUTURIER; B. DUTRILLAUX y G. BERNARDI, 1988. Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. **Chromosoma**, **96**: 178-183.
- MÉNDEZ, J.; J.J. PASANTES y M.J. MARTÍNEZ-EXPÓSITO, 1990. Banding pattern of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) chromosomes induced by 2 x SSC/Giemsa-stain treatment. **Mar. Biol.**, **106**: 375-377.
- MEZZANOTTE, R.; V. BIANCHI; R. VANNI y L. FERRUCCI, 1983. Chromatin organization and restriction endonuclease activity on human metaphase chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.**, **36**: 562 - 566.

BIBLIOGRAFÍA

- MEZZANOTTE, R.; D. PERETTI; M.G. ENNAS; R. VANNI y A.T. SUMNER, 1989. Analysis of human metaphase chromosomes using antibodies to double-stranded and single-stranded DNA: staining patterns are related to DNA conformation. *Cytogenet. Cell Genet.*, **50**: 54-58.
- MILLER, D.A.; W.R. BREG; D. WARBURTON y O.J. MILLER, 1978. Regulation of rRNA gene expression in a human familial 14pt marker chromosome. *Hum. Genet.*, **43**: 289-297.
- MILLER, D.A.; Y. CHOI y O.J. MILLER, 1983. Chromosome localization of highly repetitive human DNA's and amplified ribosomal DNA with restriction enzymes. *Science*, **219**: 395 - 397.
- MILLER, D.A.; V.G. DEV; R. TANTRAVAHY y O.J. MILLER, 1976a. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Exp. Cell Res.*, **101**: 235-243.
- MILLER, O.J., 1981. The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity. *J. Cell Biol.*, **91**: 15s-27s.
- MILLER, O.J., D. A. MILLER, V.G. DEV, R. TANTRAVAHY y C.M. CROCE, 1976b. Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 4531-4535.
- MOORE, M.N.; D.M. LOWE; D.R. LIVINGSTONE y D.R. DIXON 1986. Molecular and cellular indices of pollutant effects and their use in environmental impact assessment. *Wat. Sci. Tech.* **18**: 223-232.
- MOUCHIROUD, D. G.; D'ONOFRIO; B. AISSANI; G. MACAYA; C. GAUTIER y G. BERNARDI. 1991. The distribution of genes in the human genome. *Gene*, **100**: 181-187.
- MOYNIHAN, E. P. y G.A.T. MAHON, 1983. Quantitative karyotype analysis in the mussel *Mytilus edulis* L. *Aquaculture*, **33**: 301-309.
- NOBRE, A 1938.40. **Fauna malacológica de Portugal. I. Moluscos marinhos e das aguas salobras.** Ed. Porto Companhia editora do Minho, Barcelos.
- ORGEL, L.E. y F. CRICK, 1980. Selfish DNA. *Nature*, **288**: 645.
- ORTEA, J. A. 1977. Moluscos marinos gasterópodos y bivalvos del litoral asturiano (entre Ribadeselle y Ribadeo) con especial atención a la S.C. OPISTOBRANQUIA. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias. Universidad de Oviedo.

BIBLIOGRAFÍA

- PASANTES, J.; M.J. MARTÍNEZ-EXPOSITO; A. MARTÍNEZ-LAGE y J. MÉNDEZ, 1990. Chromosomes of Galician mussels. **J. Moll. Stud.**, **56**: 123-126.
- PATHAK, S. y F.E. ARRIGHI, 1973. Loss of DNA following C-band procedures. **Cytogenet. Cell Genet.**, **12**: 414-422.
- PECHENIK, J.A.; L.S. EYSTER; J. WIDDOWS y B.L. BAYNE, 1990. The influence of food concentration and temperature on growth and morphological differentiation of blue mussel *Mytilus edulis* L. larvae. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, **136**: 47-64.
- PIMPINELLI, S. y C. GODAY, 1989. Unusual kinetochores and chromatin disimintion in *Pascaris*. **Trends Genet.**, **5**: 310-315.
- RAMONELL, R. 1985. **Guía dos mariscos de Galicia**. Ed. Galaxia, Vigo.
- RANGANATH, H.A.; E.R. SCHMIDT y K. HAGELE, 1982. Satellite DNA of *Drosophila nasuta nasuta* and *D.n. albomicana*: localization in polytene and metaphase chromosomes. **Chromosoma**, **85**: 361-368.
- RASOTTO, M., D. ALTIERI y D. COLOMBERA, 1981. I cromosomi spermatocitari di 16 specie appartenenti alla classe Pelecypoda. **Atti Congr. Soc. Malac. Ital.**,: 113-127.
- REMANE, A. y C. SCHLIEPER, 1971. **Biology of brackish water**.: 1-350. Ed. Wiley Interscience, New York.
- ROCCHI, A. 1982. On the heterogeneity of heterochromatin. **Caryologia**, **35**: 169-189.
- ROCCHI, A.; G. PRANTERA; V. LANZA y m. DI CASTRO, 1984. Incipient sex chromosome differentiation in an isopod crustacean species, *Asellus aquaticus*. **Chromosoma**, **89**: 193-196.
- RODIONOV, A.V., 1985. The genetic activity of G- and R-band DNA in human mitotic chromosomes. **Genetika**, **21**: 2057-2065.
- RODRÍGUEZ-ROMERO, F.; A. LAGUARDA-FIGUERAS; M. URIBE-ALCOCER y M.L. ROJAS-LARA, 1979. Distribution of "G" bands in the karyotype of *Crassostrea virginica*. **Venus**, **38**: 180-184.
- ROWLEY, J.D. y W.F. BODMER, 1971. Relationship of centromeric heterochromatin to fluorescent banding patterns of metaphase chromosomes in the mouse. **Nature**, **231**: 503-506.
- SACCONE, S.; A. DE SARIO; G. DELLA VALLE y G. BERNARDI, 1992. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **89**: 4913-4917.

BIBLIOGRAFÍA

- SÁNCHEZ, L.; M. ABUIN y R. AMARO, 1993. Cytogenetic characterization of the AS cell line derived from the Atlantic salmo (*Salmo salar* L.). **Cytogenet. Cell Genet.**, **64**: 35-38.
- SÁNCHEZ, L.; P. MARTÍNEZ, y C. BOUZA, y A. VIÑAS 1991. Chromosomal heterochromatin differentiation in *Salmo trutta* with restriction enzymes. **Heredity**, **66**: 241-249.
- SANJUAN, A.; H. QUESADA; C. ZAPATA y G. ÁLVAREZ, 1990. On the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. on the N.W. coast of the Iberian Peninsula. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, **143**: 1-14.
- SANJUAN, A.; H. QUESADA; C. ZAPATA y G. ÁLVAREZ, 1986. Identificación del mejillón del NO de la Península Ibérica como *Mytilus galloprovincialis*. **Acta Científica Compostelana**, **3-4**: 35-79.
- SANTOS, J.; C. SENTÍS; J. GARCÍA-RODRÍGUEZ y J. FERNÁNDEZ-PIQUERAS, 1990. Latent NORs in the species *Pycnogaster cucullata* (Orthoptera). **Heredity**, **65**: 7-10.
- SATO, S., 1988. Color differential staining of NOR-associated heterochromatin segments using acridine orange. **Stain Tech.**, **63**: 235-240.
- SCHMID, M., 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, **66**: 361-388.
- SCHMID, M., 1980. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC and AT rich chromosome regions in *Anura*. **Chromosoma**, **77**: 83-103.
- SCHMID, M., y C.G. ALMEIDA, 1988. Chromosome banding in amphibia. XII. Restriction endonuclease banding. **Chromosoma**, **96**: 283-290.
- SCHMID, M. y M. GUTTENBACH, 1988. Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. **Chromosoma**, **97**: 101-114.
- SCHNEIDL, W., 1972. Giemsa banding, quinacrine fluorescence, and DNA-replication in chromosomes of cattle (*Bos taurus*). **Chromosoma**, **38**: 319-328.
- SCHNEIDL, W.; M. BREITENBACH; A-V.MIKELSAAR y G. STRANZINGER, 1977b. Mithramycin and DIPI: a pair of fluorochromes specific for GC- and AT-rich DNA respectively. **Hum. Genet.**, **36**: 299-305.
- SCHNEIDL, W.; U. ROSCHER y R. CZAKER, 1977a. A photometric method for quantifying the polymorphism in human acrocentric chromosomes. **Hum. Genet.**, **35**: 185-191.

BIBLIOGRAFÍA

- SCHUBERT, I., 1990. Restriction endonuclease (RE-) banding of plant chromosomes. *Caryologia*, **43**: 117-130.
- SCHWARZACHER, H.G.; A-V. MIKELSAAR y W. SCHNEDL, 1978. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenet. Cell Genet.*, **20**: 24-39.
- SCHWARZACHER, H.G. y D. SCHWEIZER, 1982. Karyotype analyses and heterochromatin differentiation with Giemsa C-banding and fluorescent counterstaining in *Cephalanthera* (Orchidaceae). *Plant. Syst. Evol.*, **141**: 91-113.
- SCHWARZACHER, H.G. y F. WACHTLER, 1983. Nucleolus organizer regions and nucleoli. *Hum. Genet.*, **63**: 89-99.
- SCHWEIZER, D., 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, **58**: 307-324.
- SCHWEIZER, D., 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, **27**: 190-193.
- SCHWEIZER, D.; P. AMBROS y M. ANDRLE, 1978. Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, distamycin A. *Exp. Cell Res.*, **111**: 327-332.
- SCHWEIZER, D. y J. LOIDL, 1986. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosomes today*, **9**: 61-74.
- SCHWEIZER, D. y W. NAGL, 1976. Heterochromatin diversity in *Cybidium*, and its relationship to differential DNA replication. *Exp. Cell Res.*, **98**: 411-423.
- SCHWEIZER, D.; M. MENDELAK; M.J.D. WHITE y N. CONTRERAS, 1983. Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba virgo* and its bisexual relatives. X. Patterns of fluorescent banding. *Chromosoma*, **88**: 227-236.
- SEABRIGHT, M., 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet*, **30**: 971 - 972.
- SEED, R., 1971. A physiological and biochemical approach to the taxonomy of *Mytilus edulis* (L.) and *M. galloprovincialis* (Lmk.) from S.W. England. *Cah. Biol. Mar.*, **12**: 291-322.
- SEED, R., 1972. Morphological variations in *Mytilus* from the French coasts in relation to the occurrence and distribution of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.). *Cah. Biol. Mar.*, **13**: 357-384.

BIBLIOGRAFÍA

- SEED, R., 1974. Morphological variations in *Mytilus* from the Irish coasts in relation to the occurrence and distribution of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.). **Cah. Biol. Mar.**, 15: 1-25.
- SEED, R. 1976. Ecology, 13-65. En **Marine Mussel: their ecology and physiology**. Ed. B.L. Bayne. Cambridge University Press.
- SEED, R., 1978. The systematics and evolution of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.): 447-468. En **Marine Organisms: Genetics, Ecology and Evolution**. Ed. B. Battaglia y J.A. Beardmore, Plenum Press, London.
- SEED, R., 1992. Systematic evolution and distribution of mussels belonging to the genus *Mytilus*: an overview. **Amer. Malac. Bull.**, 9: 123-137.
- SENTÍS, C.; J. SÁNTOS y J. FERNÁNDEZ-PIQUERAS, 1986. C-heterochromatin polymorphism in *Baetica ustulata*: intraindividual variation and fluorescence banding patterns. **Chromosoma**, 94: 65-70.
- SENTÍS, C.; J. SÁNTOS y J. FERNÁNDEZ-PIQUERAS, 1988. Primary and secondary nucleolar organiser regions during spermatogenesis in the genus *Pycnogaster*. **Heredity**, 60: 197-204.
- SENTÍS, C.; J. SÁNTOS y J. FERNÁNDEZ-PIQUERAS, 1989. Breaking up the chromosomes of *Baetica ustulata* by *in situ* treatments with restriction endonucleases. **Genome**, 32: 208-215.
- SHIRAISHI, Y. y T.H. YOSIDA, 1972. Banding pattern analysis of human chromosomes by use of a urea treatment technique. **Chromosoma**, 37: 75-83.
- SINCLAIR, J.H. y D.D. BROWN, 1971. Retention of common nucleotide sequences in the ribosomal deoxyribonucleic acid of eukaryotes and some of their physical characteristics. **Biochemistry**, 10: 2761-2769.
- SKIBINSKI, D.O.F., 1983. Natural selection in hybrid mussel populations: 283-298. En **Protein polymorphism: adaptive and taxonomic significance**. Ed. G. S. Oxford y D. Rollinson, Academic Press, London.
- SKIBINSKI, D.O.F.; M. AHMAD y J.A. BEARDMORE, 1978. Genetic evidence for naturally occurring hybrids between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. **Evolution**, 32: 354-364
- SKIBINSKI, D.O.F. y J.A. BEARDMORE, 1979. A genetic study of intergradation between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. **Experientia**, 35: 1442-1444.

BIBLIOGRAFÍA

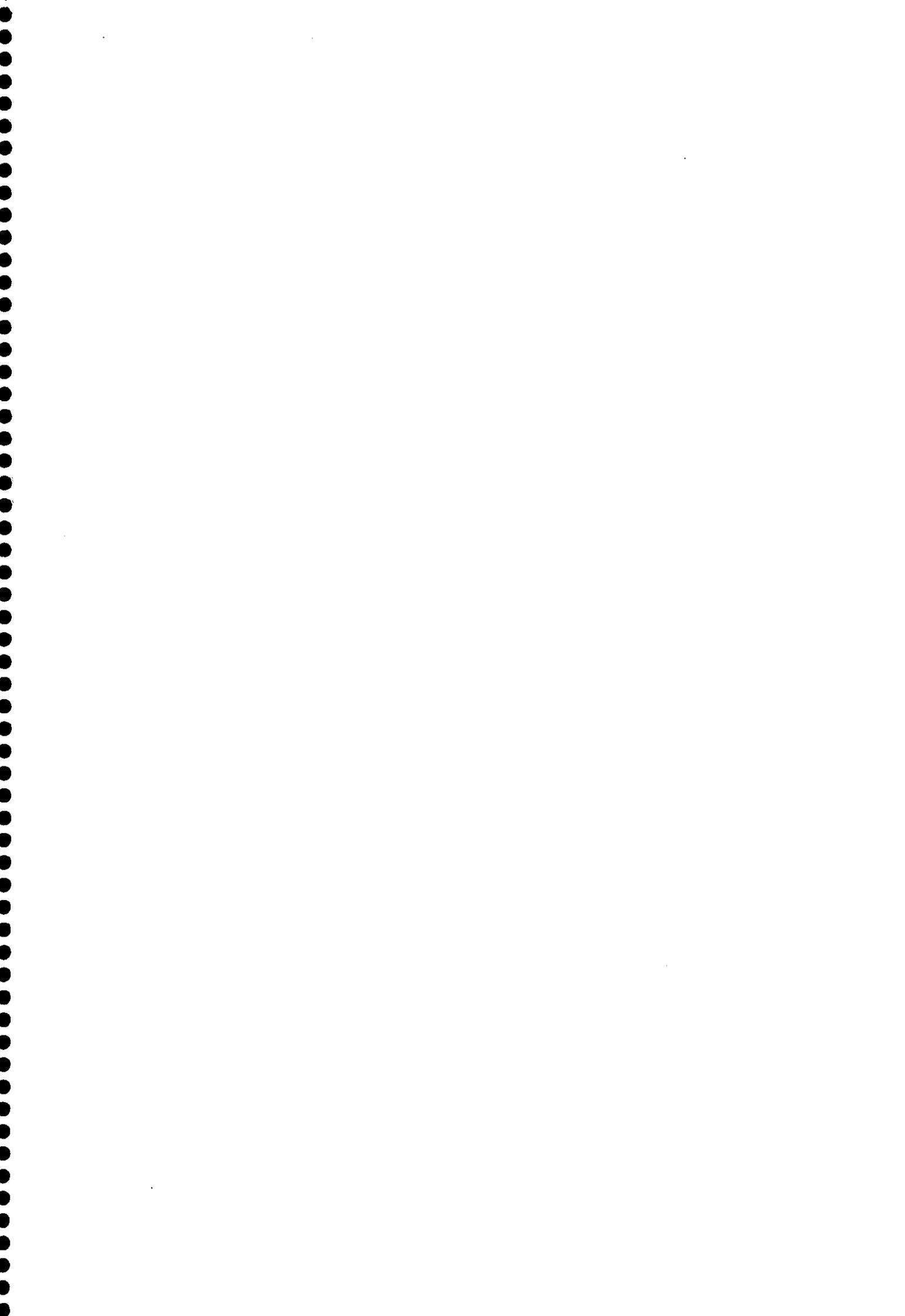
- SKIBINSKI, D.O.F.; J.A. BEARDMORE. y T.F. CROSS, 1983. Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae: Molluscs) in the British Isles. **Biol. J. Linn. Soc.**, 19:137-183
- SKIBINSKI, D.O.F.; T.F. CROSS y M. AHMAD, 1980. Electrophoretic investigations of systematic relations in the marine mussels *Modiolus modiolus* L., *Mytilus edulis* L., and *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Mytilidae; Mollusca). **Biol. J. Linn. Soc.**, 13: 65-73.
- SKIBINSKI, D.O.F. y E.E. RODERICK, 1991. Evidence of selective mortality in favour of the *Mytilus galloprovincialis* Lmk. phenotype in British mussel populations. **Biol. J. Linn. Soc.**, 42: 351-366.
- SMETANA, K. y H. BUSCH, 1974. The nucleolus and nucleolar DNA. En **The cell nucleus**, vol. I: 73-147. Ed. H. Busch, Academic Press, New York.
- SOLA, L.; G.L. NATILI y S. CATAUDELLA, 1988. Cytogenetical characterization of *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae), an Argentine species introduced in Italy. **Genetica**, 77: 217-224.
- SOOT-RYEN, T., 1955. A report on the family Mytilidae (Pelecypoda). **Allan Hancock Pacif. Exped.**, 20: 1-175.
- SOOT-RYEN, T., 1969. Family Mytilidae Rafinesque 1815. Part N, Vol. 1, Mollusca 6, Bivalvia: N271-N280. En **Treatise on Invertebrate Paleontology**. Ed. R.C. Moore, Geological Society of America and University of Kansas Press, Lawrence.
- SPRADLING, A.C.; G. KARPEN; A. GLASER y P. ZHANG, 1992. Evolutionary conservation of developmental mechanisms: DNA elimination en *Drosophila*. En **Evolutionary conservation of developmental mechanisms**: 39-53. Ed. A. Spradling, Wiley-Liss, New York.
- STEFANO, G.F. DE; E. ROMANO y L. FERRUCCI, 1986. The Alu I-induced bands in metaphase chromosomes of orangutan (*Pongo pygmaeus*): implications for the distribution pattern of highly repetitive DNA sequences. **Hum. Genet.**, 72: 268-271.
- SUCHANEK, T.H., 1985. Mussels and their role in structuring rocky shore communities: 70-96. En **Ecology of Rocky Coasts**. Ed. P.G. Moore and R. Seed, Hodder and Stoughton, Sevenoaks, Kent.
- SUMNER, A.T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, 75: 304 - 306.
- SUMNER, A.T., 1976. Cap. 1: 17 - 22. **Current Chromosome Research**. Ed. K. Jones and D.E. Brandham.

BIBLIOGRAFÍA

- SUMNER, A.T., 1982. The nature and mechanisms of chromosome banding. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 6: 59-87.
- SUMNER, A.T. 1990. **Chromosome banding**. Ed. Unwin Hyman, London.
- SUMNER, A.T.; H.J. EVANS y R.A. BUCKLAND, 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. **Nature New Biology**, 232: 31-32.
- SUMNER, A.T.; H.J. EVANS y R.A. BUCKLAND, 1973. Mechanims involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. I. The effects of fixation in methanol-acetic acid. **Exp. Cell Res.**, 81: 214-222.
- TANTRAVAHU, U., R.V. GUNTAKA, B.F. ERLANGER y O.J. MILLER, 1981. Amplified ribosomal RNA genes in a rat hepatoma cell line are enriched in 5-methylcytosine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 78: 489-493.
- TENORE, K.R.; L.F. BOYER; R.M. CAL; J. CORRAL; C. GARCÍA-FERNÁNDEZ; N. GONZÁLEZ; E. GONZÁLEZ-GURRIARÁN; R.B. HANSON; J. IGLESIAS; M. KROM; E. LÓPEZ-JAMAR; J. McCLAIN; M.M. PAMATMAT; A. PÉREZ; D.C. RHOADS; G. DE SANTIAGO; J. TIETJEN; J. WESTRICH y J.L. WINDOM, 1982. Coastal upwelling in the Rias Bajas, NW Spain: Contrasting the benthic regimes of the Rias de Arosa and de Muros. **J. Mar. Res.** 40: 701-772.
- THEISEN, B.F., 1982. Variation in size of gills, labial palps, and adductor muscle in *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) from Danish waters. **Ophelia**, 21: 49-63.
- THIRIOT-QUIÉVREUX, C., 1984. Chromosome analysis of three species of *Mytilus* (Bivalvia: Mytilidae). **Mar. Biol. Lett.**, 5: 265-273.
- THIRIOT- QUIÉVREUX, C. y N. AYRAUD, 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et de gastéropodes marins. **Mar. Biol.** 70: 165-172.
- THIRIOT-QUIÉVREUX, C., y A.M. INSUA, 1992. Nucleolar organiser region variation in the chromosomes of three oyster species. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 157: 33-40.
- VÄINÖLÄ, R. y M.M. HVILSOM, 1991. Genetic divergence and a hybrid zone between Baltic and North Sea *Mytilus* populations (Mytilidae; Mollusca). **Biol. J. Linn. Soc.** 43: 127-148.
- VARVIO, S.L.; R.K. KOEHN y R. VÄINÖLÄ, 1988. Evolutionary genetics of the *Mytilus edulis* complex in the North Atlantic region. **Mar. Biol.**, 98: 51-60.
- VELÁZQUEZ, M.; G. VISEDO; P. LUDEÑA; S.F. DE CABO; C. SENTÍS y J. FERNÁNDEZ-PIQUERAS, 1991. Cytogenetic analysis of a human familial 15p+ marker chromosome. **Genome**, 34: 827-829.

BIBLIOGRAFÍA

- VERDUIN, A., 1979. Conchological evidence for the separate specific identity of *Mytilus edulis* L. and *M. galloprovincialis* Lamarck. **Basteria**, **43**: 61-80.
- VOSA, C.G. y P. MARCHI, 1972a. Quinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. **Nat. New Biol.**, **237**: 191-192.
- VOSA, C.G. y P. MARCHI, 1972b. On the quinacrine fluorescence and Giemsa staining patterns of the chromosomes of *Vicia faba*. **Giorn. Bot. Ital.**, **106**: 151-159.
- WAGNER, R.P.; M.P. MAGUIRE y R.L. STALLINGS, 1993. **Chromosomes: a synthesis**. Ed. John Wiley & Sons Inc., Wiley-Liss, New York.
- WARD, D.C.; E. REICH y I.H. GOLDBERG, 1965. Base specificity in the interaction of polynucleotides with antibiotic drugs. **Science.**, **149**: 1259-1263.
- WEBB, G.C., 1976. Chromosome organization in the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera*. I. Banding relationships of the normal and supernumerary chromosomes. **Chromosoma**, **55**: 229-246.
- WIBERG, U.H., 1983. Sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*, L.). **Cytogenet. Cell Genet.**, **36**: 589-598.
- WEISBLUM, B. y E. HAENSSLER, 1974. Fluorometric properties of the bibenzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA. **Chromosoma**, **46**: 255-260.
- WILSON, G.N., 1982. The structure and organization of human ribosomal genes. En **The cell nucleus**, Vol. X: 287-318. Ed. H. Busch & L. Rothblum, Academic Press, New York.



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700757462