

T.VDC-244

UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR
AREA DE GENETICA

ESTUDIO CARIOLOGICO EN MOLUSCOS BIVALVOS

MEMORIA

que para optar al grado de Doctora presenta

ANA MARIA INSUA POMBO

La Coruña, Diciembre de 1992

UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR
AREA DE GENETICA

ESTUDIO CARIOLOGICO EN MOLUSCOS BIVALVOS

MEMORIA

que para optar al grado de Doctora presenta

ANA MARIA INSUA POMBO

La Coruña, Diciembre de 1992

JOSEFINA MENDEZ FELPETO, PROFESORA TITULAR DE GENETICA DE LA UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA, Y CATHERINE THIRIOT-QUIEVREUX, DIRECTORA DE INVESTIGACION EN EL CENTRE NATIONAL DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE (FRANCIA),

INFORMAN:

Que el presente trabajo, ESTUDIO CARIOLOGICO EN MOLUSCOS BIVALVOS, que para optar al Grado de Doctora presenta D^a Ana María Insua Pombo, ha sido realizado bajo nuestra dirección y, considerándolo concluido, autorizamos su presentación al tribunal calificador.

Villefranche-sur-Mer, a 7 de diciembre de 1992

La Coruña, a 9 de diciembre de 1992



Fdo. Catherine Thiriot-Quévieux



Fdo. Josefina Méndez Felpeto

*A Suso, Manola,
Gloria e Leonor*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo representa para mí un acúmulo de experiencias profesionales y personales que en gran medida transformaron mi vida de estos últimos años. Ahora ha llegado a su fin, pero esto no hubiese sido posible sin la ayuda, la colaboración y el aliento con el que he contado en el transcurso de su desarrollo. Por ello, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a su realización.

Josefina Méndez Felpeto se preocupó constantemente por mi formación investigadora desde el año 1986 en que me incorporó a su equipo y dirigió este trabajo con gran interés, respetando y apoyando en todo momento mis iniciativas.

Catherine Thiriot-Quiévreux me aceptó en su laboratorio para iniciarme en la Citogenética de moluscos en el año 1988 y desde entonces me procuró una orientación permanente. Su agilidad, optimismo y entusiasmo por la investigación fueron para mí un constante motor.

Germaine Quelart colaboró de una manera entrañable, aportando una remarcable asistencia técnica. Por su interés y dedicación, esta tesis es de alguna manera también la suya.

Andrés Martínez Lage me proporcionó una inestimable ayuda informática, dedicando con mucha paciencia gran parte de su tiempo a resolver todas mis dificultades, además de aportar interesantes críticas.

Jean Philippe Labat contribuyó con sus conocimientos de estadística al tratamiento de los datos, encontrando siempre un momento para atenderme.

Marisa Scotto se preocupó cotidianamente por resolver las dificultades que pudiese tener durante mi estancia en Villefranche-sur-Mer y junto con Jacques Chiaverini suministró regularmente alimento para mis animales.

Bénédicte Lafay soportó los momentos difíciles, colaborando además con sus noches de colchicina a la realización de las experiencias.

Ana González Tizón me aportó valiosos comentarios que fueron decisivos para la finalización de este trabajo.

Juanjo Pasantes Ludeña siguió muy de cerca la etapa final de redacción, respondiendo en todo momento a mis múltiples preguntas.

Emilio Valadé del Río, con una gran comprensión, facilitó mis estancias en Francia, haciendo posible el avance y finalización de esta tesis.

Vicente Goyanes Villaescusa resolvió muchas de mis dudas, escuchando en cada ocasión todas mis consultas.

Quique Poza me proporcionó una gran ayuda en la recogida de muestras, estando siempre dispuesto a echar una mano.

Pablo Fidalgo mantuvo conmigo largas discusiones que me ayudaron a clarificar muchos conceptos, además de acudir a mis llamadas de socorro frente al ordenador.

Jeffa Berthon colaboró "artísticamente" en la realización de este trabajo, pero también me dio buenos consejos sobre como acabar una tesis.

Francisco Espinosa y José Luis Otero suministraron muestras de difícil obtención sin su colaboración.

Los estudiantes y todo el personal de la Station Zoologique de Villefranche-sur-Mer y del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de La Coruña contribuyeron a solucionar las complicaciones de las tareas cotidianas y en innumerables ocasiones aportaron buenas dosis de humor, imprescindibles para llevar a cabo una tesis.

La Dirección General de Ordenación Universitaria y Política Científica de la Consellería de Educación (Xunta de Galicia), la Diputación Provincial de La Coruña, la Embajada de Francia en España, la Dirección General de Investigación Científica y Técnica del Ministerio de Educación y Ciencia y la entidad bancaria Caixa Galicia hicieron posible la realización de este trabajo mediante la adjudicación de varias becas de investigación.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados que figuran en esta memoria son objeto de las siguientes de las siguientes publicaciones:

- INSUA, A. y C. THIRIOT-QUIEVREUX, 1991. The characterization of *Ostrea denselamellosa* (Mollusca, Bivalvia) chromosomes: karyotype, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. *Aquaculture*, 97: 317-325.

- THIRIOT-QUIEVREUX, C. y A. INSUA, 1992. Nucleolar organiser region variation in the chromosomes of three oyster species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 157: 33-40.

- INSUA, A. y C. THIRIOT-QUIEVREUX, 1992. Karyotypes of *Cerastoderma edule*, *Venerupis pullastra* and *Venerupis rhomboides* (Bivalvia, Veneroidea). *Aquat., Living Resour.*, 5: 1-8.

- INSUA, A. y C, THIRIOT-QUIEVREUX, 1992. Karyotype and nucleolus organizer regions in *Ostrea puelchana* (Bivalvia: Ostreidae). *Veliger* (en prensa).

FINANCIACION

Este trabajo se encuadra en el proyecto de investigación "Inducción de patrones de bandas cromosómicas en moluscos", dirigido por Josefina Méndez Felpeto y financiado mediante una subvención concedida por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Plan Nacional de I+D).

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. La citogenética en los moluscos bivalvos.....	2
1.2. Caracterización de los cariotipos mediante las técnicas de bandeo.....	6
1.3. Especies de taxonomía compleja: el caso del género <i>Mytilus</i>	9
1.4. Objetivos de este estudio.....	11
2. MATERIAL Y METODOS.....	13
2.1. Especies estudiadas.....	14
2.2. Acondicionamiento de los animales.....	14
2.3. Obtención de las preparaciones cromosómicas.....	14
2.4. Tinción.....	18
2.5. Observación y fotografiado.....	18
2.6. Tratamiento <i>in vivo</i> de los animales.....	19
2.7. Elaboración del cariotipo y análisis morfométrico.....	19
2.8. Técnicas de tinción selectiva.....	22
2.8.1. Tinción de las regiones organizadoras del nucleolo.....	23
2.8.2. Tinción de la heterocromatina constitutiva.....	23
2.9. Tratamiento estadístico.....	24
3. RESULTADOS.....	26
3.1. Familia Mytilidae.....	27
3.1.1. <i>Mytilus galloprovincialis</i>	27
3.1.1.1. Morfología cromosómica y cariotipo.....	27
3.1.1.2. Regiones organizadoras del nucleolo.....	27
3.1.2. <i>Mytilus edulis</i>	28
3.1.2.1. Morfología cromosómica y cariotipo.....	28
3.1.2.2. Regiones organizadoras del nucleolo.....	29
3.1.2.3. Heterocromatina constitutiva.....	30

	Página
3.1.3. <i>Mytilus trossulus</i>	30
3.1.3.1. Número de cromosomas.....	30
3.1.3.2. Morfología cromosómica y cariotipo.....	30
3.1.3.3. Regiones organizadoras del nucleolo.....	31
3.1.3.4. Heterocromatina constitutiva.....	32
3.1.4. <i>Perna perna</i>	32
3.1.4.1. Número de cromosomas.....	32
3.1.4.2. Morfología cromosómica y cariotipo.....	32
3.1.4.3. Regiones organizadoras del nucleolo.....	33
Ilustraciones.....	34
3.2. Familia Ostreidae.....	52
3.2.1. <i>Crassostrea gigas</i>	52
3.2.1.1. Regiones organizadoras del nucleolo.....	52
3.2.1.2. Heterocromatina constitutiva.....	53
3.2.2. <i>Ostrea edulis</i>	53
3.2.2.1. Regiones organizadoras del nucleolo.....	53
3.2.2.2. Heterocromatina constitutiva.....	54
3.2.3. <i>Ostrea denselamellosa</i>	54
3.2.3.1. Número de cromosomas.....	54
3.2.3.2. Morfología cromosómica y cariotipo.....	55
3.2.3.3. Regiones organizadoras del nucleolo.....	55
3.2.3.4. Heterocromatina constitutiva.....	56
3.2.4. <i>Ostrea puelchana</i>	56
3.2.4.1. Número de cromosomas.....	56
3.2.4.2. Morfología cromosómica y cariotipo.....	56
3.2.4.3. Regiones organizadoras del nucleolo.....	57
Ilustraciones.....	58
3.3. Familia Cardiidae.....	74
3.3.1. <i>Cerastoderma edule</i>	74
3.3.1.1. Número de cromosomas.....	74
3.3.1.2. Morfología cromosómica y cariotipo.....	74
3.3.1.3. Regiones organizadoras del nucleolo.....	75
3.3.1.4. Heterocromatina constitutiva.....	75

	Página
3.4. Familia Veneridae.....	76
3.4.1. <i>Venerupis pullastra</i>	76
3.4.1.1. Número de cromosomas.....	76
3.4.1.2. Morfología cromosómica y cariotipo.....	76
3.4.1.3. Regiones organizadoras del nucleolo.....	77
3.4.1.4. Heterocromatina constitutiva.....	77
3.4.2. <i>Venerupis rhomboides</i>	77
3.4.2.1. Número de cromosomas.....	77
3.4.2.2. Morfología cromosómica y cariotipo.....	77
3.4.3. <i>Ruditapes philippinarum</i>	78
3.4.3.1. Regiones organizadoras del nucleolo.....	78
3.4.4. <i>Venerupis aurea</i>	79
3.4.4.1. Regiones organizadoras del nucleolo.....	80
Ilustraciones.....	81
4. DISCUSION.....	93
4.1. Número de cromosomas.....	94
4.2. Alteración del número de cromosomas.....	100
4.3. Morfología cromosómica y cariotipo.....	103
4.4. Bando cromosómico.....	117
4.4.1. Regiones organizadoras del nucleolo.....	117
4.4.2. Heterocromatina constitutiva.....	125
4.5. Las relaciones taxonómicas en el género <i>Mytilus</i>	126
5. CONCLUSIONES.....	130
6. BIBLIOGRAFIA.....	134
ANEXO.....	158

1. INTRODUCCION

Los moluscos bivalvos figuran entre los invertebrados más notables por su diversidad de especies y su amplia distribución geográfica, estando presentes en todos los océanos y mares del mundo. Este grupo incluye formas tan conocidas como las ostras, los mejillones o las almejas, explotadas con fines comerciales directamente del medio natural y también después de ser cultivadas bajo condiciones controladas.

Todos los bivalvos son acuáticos y están particularmente adaptados para habitar en fondos fangosos o arenosos y en ciertos casos fijados a las rocas. En muchos de ellos la locomoción es restringida y está controlada por un órgano muscular denominado pie. La mayoría de las especies son gonocóricas o unisexuales aunque también son frecuentes diversos tipos de hermafroditismo, que van desde el más estricto (permanente con producción simultánea de gametos de ambos sexos) hasta cambios múltiples de sexo a lo largo del ciclo vital (Pérez Camacho y Román, 1987). A excepción de posibles casos de autofecundación, en los que el encuentro de los gametos se produce en las vías genitales, en casi todos los bivalvos la fecundación tiene lugar en el agua circundante, al ser expulsados los gametos de los dos sexos por la corriente exhalante; en algunos, en cambio, la fecundación tiene lugar en la cavidad branquial, tras la entrada de los espermatozoides por el flujo inhalante (Barnes, 1985). El desarrollo puede ser directo o indirecto y muchas especies presentan una larga fase larvaria planctónica que facilita una gran dispersión (Brusca y Brusca, 1990).

Todas estas características, así como la particularidad de poseer una concha mineral que aumenta la probabilidad de conservación y que permite disponer de numerosos datos paleontológicos desde el Cámbrico inferior (Pojeta y Runnegar, 1985), hacen que los bivalvos constituyan excelentes modelos para el estudio de las características cariológicas y las relaciones entre las especies.

1.1. LA CITOGENETICA EN LOS MOLUSCOS BIVALVOS

Los primeros estudios cromosómicos en bivalvos datan de principios de siglo (Jordan, 1910; Morris, 1917) y en ellos se utilizó la técnica de corte en parafina para la obtención de los cromosomas. Los resultados aportados describen el número de cromosomas de algunas especies, pero fueron desestimados posteriormente y la técnica dejó de utilizarse, puesto que hay una probabilidad muy pequeña de que en un corte estén contenidos todos los cromosomas de una metafase (Patterson, 1969).

En los años cincuenta, el empleo de la técnica citológica de squash y la tinción con orceína acética en huevos y embriones marcó el verdadero inicio de la investigación

citogenética en bivalvos, al permitir mejorar la determinación del número y la forma de los cromosomas. Aunque esta técnica es utilizada por diferentes autores, incluso actualmente, tampoco aporta resultados completamente satisfactorios debido a que la dispersión de los cromosomas es a menudo insuficiente y su morfología tiende a ser modificada. La obtención de cromosomas se mejora a partir del trabajo de Ieyama e Inaba (1974) quienes, basándose en los métodos utilizados en mamíferos, realizan las preparaciones cromosómicas a partir de una suspensión celular de tejido gonadal, lo que permite una mejor dispersión y visualización de la morfología de los cromosomas. Los cultivos celulares, habitualmente utilizados en vertebrados para la obtención de los cromosomas, no son practicados en bivalvos y aunque se realizaron varios ensayos de cultivos de explantes y de células en monocapa (Li y Stewart, 1966; Brewster y Nicholson, 1979), únicamente Cornet (1992) en un reciente trabajo obtiene cromosomas a partir de explantes de manto y de pie en *Mytilus edulis*. Actualmente, en la mayor parte de las especies, los cromosomas se obtienen de suspensiones celulares de huevos, embriones, tejido gonadal o tejido branquial.

El perfeccionamiento de las técnicas provocó un aumento del número de especies estudiadas; así, en la primera revisión de la citogenética de moluscos, realizada por Patterson en 1969, figuran 22 especies de bivalvos pertenecientes a 8 familias, mientras que la revisión realizada por Nakamura en 1985 consta de 125 distribuidas en 22 familias. Sin embargo, en comparación con otros grupos zoológicos, en particular de vertebrados, la citogenética de bivalvos todavía está poco desarrollada; de unas 8000 especies englobadas aproximadamente en 150 familias (Boss, 1982) las especies examinadas representan menos de un 3%.

El número de cromosomas se conoce actualmente en 166 especies; las dotaciones diploides más bajas, $2n = 12$ y $2n = 14$, se describieron en la familia Anomiidae (Ieyama e Inaba, 1974; Ieyama, 1984a; Thiriot-Quévieux, comunicación personal) y la más elevada, $2n = 46$, fue señalada en una especie de Petricolidae (Menzel, 1968a), pero $2n = 38$ es el número más frecuente entre los bivalvos analizados (Nakamura, 1985). En ciertas especies con estrategias reproductivas particulares se observaron dotaciones cromosómicas superiores; la especie hermafrodita *Corbicula leana* (Corbiculidae) representa el primer ejemplo triploide ($3n = 54$) descrito (Okamoto y Arimoto, 1986) y esta dotación se relacionó con la capacidad de autofecundarse y la posible reproducción por partenogénesis. Otros casos de dotaciones cromosómicas elevadas corresponden a tres especies de la familia Lasaeidae caracterizadas por tener un desarrollo directo y por presentar fenómenos de poliploidía: *Lasaea consanguinea* con $2n = 100-120$ (Thiriot-Quévieux et al., 1988a), *L. rubra* con un número de cromosomas

comprendido entre 63 y 340 y diferentes niveles de ploidía (3, 4, 5 y 6) (Thiriot-Quévieux et al., 1989) y *L. subviridis* que muestra entre 90 y 100 cromosomas y un nivel 3 de ploidía (O Foighil y Thiriot-Quévieux, 1991). Estas especies son hermafroditas, poseen una gónada masculina muy reducida y se reproducen sin fecundación, siendo *L. subviridis* el único molusco en el que se detectó pseudogamia (O Foighil y Thiriot-Quévieux, 1991).

Independientemente de la existencia de especies poliploides, la disponibilidad de individuos poliploides en especies comestibles es de gran interés desde el punto de vista de su explotación comercial. Las técnicas de inducción de poliploidía, puestas a punto en anfibios y aplicadas en los últimos años en los peces, también fueron practicadas en bivalvos cultivados con el fin de incrementar su tasa de crecimiento. Estas técnicas se basan en el bloqueo de la meiosis I o II, mediante agentes químicos (citocalasina B) o físicos (choque térmico o presión hidrostática), y permitieron la obtención de poliploides (sobre todo triploides) en las especies *Crassostrea virginica* (Stanley et al., 1981; 1984), *Crassostrea gigas* (Chaiton y Allen, 1985; Quillet y Panelay, 1986; Downing y Allen, 1987), *Mytilus edulis* (Yamamoto y Sugawara, 1988; Beaumont y Kelly, 1989), *Mya arenaria* (Allen et al., 1982; Mason et al., 1988), *Pecten maximus* (Beaumont, 1986), *Argopecten irradians* (Tabarini, 1984), *Chlamys nobilis* (Komaru et al., 1988), *Chlamys varia* (Baron et al., 1989), *Pinctada fucata martensis* (Wada et al., 1989; Uchimura et al., 1989) y *Ruditapes philippinarum* (Beaumont y Contaris, 1988; Gosling y Nolan, 1989; Dufy y Diter, 1990; Diter y Dufy, 1990).

En muchas de las especies en las que se determinó el número de cromosomas, se señaló la presencia de células aneuploides, detectándose tanto en huevos y embriones (Ahmed y Sparks, 1970; Ahmed, 1973; Longwell et al., 1967; Dixon, 1982; Wada et al., 1990) como en el tejido branquial de juveniles y adultos (Thiriot-Quévieux, 1984a,b; 1986; Thiriot-Quévieux et al., 1987; 1988b; 1991; Cornet y Soulard, 1987; 1989; 1990a,b). En el caso de *Mytilus edulis* se puso de manifiesto una relación positiva entre la tasa de aneuploidía y la contaminación por hidrocarburos (Dixon, 1982), mientras que en la ostra *Crassostrea gigas* se detectó una relación negativa con la tasa de crecimiento de los individuos (Thiriot Quévieux, 1986; Thiriot-Quévieux et al., 1988c; 1992).

El cariotipo define el número, el tamaño y la morfología de los cromosomas de una especie (Blaxhall, 1983). En relación a la morfología de los cromosomas de bivalvos, ciertos cariotipos fueron descritos según la forma de los cromosomas, clasificándose éstos de manera

aproximada en metacéntricos, submetacéntricos, subtlocéntricos y telocéntricos. Otros cariotipos, sin embargo, fueron establecidos a partir de las medidas de los brazos cromosómicos y la determinación precisa de la posición del centrómero, clasificándose en este caso los cromosomas de acuerdo con la nomenclatura establecida por Levan et al. (1964) para la posición del centrómero. En la revisión de Nakamura (1985) figura el cariotipo de 55 especies repartidas en 22 familias, siendo Mytilidae, Pteriidae y Ostreidae las representadas por un mayor número de especies. Desde esta revisión se estableció el cariotipo de otras 30 especies distribuidas en las siguientes familias: Malletidae (Thiriot-Quévieux et al., 1987; 1991), Yoldiidae (Thiriot-Quévieux et al., 1991) Mytilidae (Jacobi et al., 1990), Arcidae (Wada y Komaru, 1985a), Limidae (Thiriot-Quévieux et al., 1991), Ostreidae (Ieyama, 1990), Gryphaeidae (Vitturi et al., 1985; Ieyama, 1990), Lasaeidae (Thiriot-Quévieux et al., 1988a; 1989; O Foighil y Thiriot-Quévieux, 1991; Thiriot-Quévieux, 1992), Cyamiidae, Gaimardiidae (Thiriot-Quévieux et al., 1988b), Carditidae (Thiriot-Quévieux et al., 1991), Mactridae (Wada et al., 1990), Tellinidae (Cornet y Soulard, 1990a), Semelidae (Cornet y Soulard, 1987), Scrobicularidae (Cornet y Soulard, 1989), Donacidae (Cornet y Soulard, 1990b), Corbiculidae (Okamoto y Arimoto, 1986), Veneridae (Ieyama, 1985; Borsa y Thiriot-Quévieux, 1990) y Laternulidae (Thiriot-Quévieux et al., 1991).

El análisis comparativo de los cromosomas de diferentes poblaciones de una especie es prácticamente inexistente en bivalvos, únicamente Thiriot-Quévieux (1984c) comparó los cariotipos de cuatro poblaciones de *Ostrea edulis* y Dixon y Flavell (1986) los cariotipos de individuos de dos poblaciones de *Mytilus edulis*, detectándose en ambos trabajos pequeñas diferencias en los tipos cromosómicos identificados o en sus proporciones. En algunos casos varios autores determinaron el cariotipo de la misma especie a partir de individuos de diferente origen geográfico: *M. edulis* (Ieyama, 1983a; Moynihan y Mahon, 1983; Thiriot-Quévieux, 1984d; Dixon y Flavell, 1986), *M. galloprovincialis* (Thiriot-Quévieux, 1984d, Dixon y Flavell, 1986; Pasantes et al., 1990), *Crassostrea virginica* (Longwell et al., 1967; Rodríguez-Romero et al., 1978) y *Ruditapes philippinarum* (Ieyama, 1985; Borsa y Thiriot-Quévieux, 1990). La composición del cariotipo descrita por cada autor en cada población no es totalmente coincidente, excepto la descrita por Longwell et al. (1967) y Rodríguez-Romero et al. (1978) en *C. virginica*. En *M. edulis* y *M. galloprovincialis* todos los autores diferencian cromosomas metacéntricos, submetacéntricos y subtlocéntricos, pero en distintas proporciones.

La existencia de polimorfismos cromosómicos sólo se documentó en una especie de Isognomonidae, *Isognomon alatus*, observándose distinta dotación y variaciones en la

morfología de los cromosomas entre individuos de distintas poblaciones (Durán-González et al., 1984).

1.2. CARACTERIZACION DE LOS CARIOTIPOS MEDIANTE LAS TECNICAS DE BANDEO

El cariotipo establecido a partir de cromosomas teñidos con los colorantes clásicos, como el Giemsa, aportan una idea precisa sobre la morfología cromosómica, pero el tamaño, la posición del centrómero y, ocasionalmente, la presencia de constricciones secundarias constituyen la únicas características distintivas. Las técnicas de bandeo, haciendo intervenir diferentes componentes cromosómicos (ADN y proteínas), así como la dinámica de replicación del ADN y la condensación de las cromátidas, permiten poner en evidencia estructuras, llamadas bandas, en los cromosomas mitóticos o meióticos, de manera que pueden reconocerse regiones cromosómicas específicas (Dutrillaux y Couturier, 1981). El bandeo de los cromosomas se realiza rutinariamente en mamíferos y también en otros vertebrados, sin embargo, en invertebrados la aplicación de estas técnicas es mucho más restringida. Aunque existen diferentes tipos de bandeo, la coloración selectiva de las regiones organizadoras del nucleolo (NORs) y de la heterocromatina constitutiva (bandas C) son las más utilizadas en los invertebrados.

Los NORs corresponden a los lugares cromosómicos que contienen las secuencias de ADN que codifican los ARN ribosómicos 18 y 28 S (ADNr) (Ritossa y Spiegelman, 1965; Wallace y Birnstiel, 1969). Los cistrones ribosómicos están presentes en copias múltiples, organizadas en tándem y separadas por secuencias que no son transcritas (Miller, 1981). Durante la interfase el ADNr es transcrito a moléculas de pre-ARNr que, asociadas a proteínas específicas, forman el nucleolo (Howell, 1982). En muchos organismos los NORs muestran la misma posición que las constricciones secundarias en los cromosomas mitóticos (Tantravahi et al., 1976), pero su localización cromosómica puede ser determinada por diferentes técnicas de bandeo: bandas N (Matsui y Sasaki, 1973; Funaki et al., 1975), tinción con azul de coomasie (Wang y Juurlink, 1979), tinción con nitrato de plata (Howell et al., 1975; Goodpasture y Bloom, 1975) y en algunos casos mediante tinción con fluorocromos específicos, como mitramicina o cromomicina A₃ (Schmid, 1982). La tinción con nitrato de plata es la más utilizada por ser sencilla, rápida y específica. Los métodos iniciales fueron modificados más tarde por distintos

autores pero, aparentemente, todos presentan la misma sensibilidad y, en general, los NORs identificados con esta tinción se conocen como Ag-NORs (Howell, 1982).

Aunque la tinción con nitrato de plata permite determinar la localización cromosómica del ADNr, el análisis de los Ag-NORs en células híbridas de ratón y humanos (Miller et al., 1976a,b), en células de diferentes estados de la embriogénesis (Engel et al., 1977) y de la espermatogénesis de vertebrados (Hofgärtner et al., 1979a; Schmid et al., 1977) indica que esta coloración no tiñe directamente el ADNr. Además, estudios realizados sobre la tinción de los NORs en células tratadas con inhibidores de la síntesis de ARNr (Hofgärtner et al., 1979b; Hubbell et al., 1980) revelaron una relación directa entre la tinción de los NORs y la actividad transcripcional del ADNr, de manera que únicamente son teñidos los NORs que fueron activos transcripcionalmente en la interfase precedente. Por otra parte, distintas pruebas citoquímicas, basadas en el tratamiento de las preparaciones cromosómicas con ADNasa, ARNasa o enzimas proteolíticas demostraron que el material teñido corresponde a proteínas no histónicas, asociadas a los NORs activos (Goodpasture y Bloom, 1975; Howell, 1977; Hubbell et al., 1979; Lischwe et al., 1979).

Los NORs presentan un gran interés en la investigación citogenética puesto que constituyen una estructura cromosómica visible, con una función metabólica y genética conocida (Bickham y Rogers, 1985). Entre los invertebrados, los insectos representan el grupo donde se llevaron a cabo un mayor número de estudios (Czaker, 1978; Fernández-Piqueras et al., 1983; Rufas et al., 1985; Yadav y Yadav, 1987; Palomeque et al., 1990a). En los moluscos, los trabajos realizados comprenden solamente la identificación de los NORs en el bivalvo *M. edulis* (Dixon et al., 1986) y en los gasterópodos *Bulinus tropicus*, *Bulinus truncatus* y *Bulinus natalensis* (Goldman et al., 1983), *Biomphalaria glabrata* (Goldman et al., 1983; Kawano et al., 1987), *Biomphalaria tenagophila* y *Biomphalaria straminea* (Kawano et al., 1987), *Pneumodermopsis canephora*, *Pneumodermopsis paucidens*, *Pneumoderma atlanticum*, *Cavolinia inflexa* y *Creseis acicula* (Thiriou-Quévieux, 1988; 1990), *Tricolia speciosa* y *Buccinulum corneum* (Vitturi y Catalano, 1989; 1990) y *Hellicella virgata* (Vitturi et al., 1991).

La heterocromatina constitutiva representa un tipo de cromatina con características estructurales específicas (John, 1988), constituyendo segmentos cromosómicos o cromosomas enteros con una apariencia más condensada que la eucromatina durante la mayor parte o todo el ciclo celular (Hilliker y Sharp, 1988). Frecuentemente contiene ADN satélite altamente repetitivo (Comings y Mattoccia, 1972) y muestra una tendencia a replicarse en un período corto de tiempo (Masubuchi, 1976). Aunque hasta hace poco se consideró inerte genéticamente, se

identificaron algunos loci génicos, así como efectos fenotípicos, asociados a regiones heterocromáticas específicas (Hilliker y Sharp, 1988).

Este tipo de heterocromatina se tiñe específicamente mediante el procedimiento de bandas C (Arrigui y Hsu, 1971; Yunis et al., 1971; Sumner, 1972) y en muchos casos también mediante fluorocromos con afinidad por pares de nucleótidos particulares, AT o GC (Schmid, 1980a).

La distribución de la heterocromatina constitutiva facilita la identificación de los cromosomas, pudiendo localizarse en los centrómeros, telómeros o intercalada en otras regiones del cromosoma. Además, permite analizar las reorganizaciones cromosómicas; cuando un cambio estructural afecta a una banda C, estas regiones heterocromáticas pueden conservar su forma característica, al menos inicialmente, (Yosida y Sagai, 1975) y en ciertos casos pueden aparecer bandas C adicionales (Barnai, 1977). El interés de conocer la distribución de las bandas C también se debe en gran parte a su variabilidad; ésta puede manifestarse a nivel interespecífico o intraespecífico, permitiendo distinguir especies relacionadas, diferenciar poblaciones de una misma especie o incluso individuos de una población (John, 1981).

En los invertebrados, la tinción de la heterocromatina constitutiva, al igual que ocurre con la de los NORs, se realizó con mayor frecuencia en insectos (Camacho et al., 1981; Santos et al., 1983; Juan y Petitpierre, 1989; Palomeque et al., 1990b). En los bivalvos nunca se determinó la localización de la heterocromatina constitutiva en cromosomas metafásicos y en otros moluscos solamente se obtuvieron bandas C en los gasterópodos *Planorbarius corneus* (Bottke, 1982), *Ashmunella proxima* y *Ashmunella lenticulata* (Babrakzai y Miller, 1984) y *Helicella virgata* (Vitturi et al., 1991).

Las técnicas de tinción diferencial inducen bandas claras y oscuras a lo largo de los cromosomas, garantizando la identificación inequívoca de los pares cromosómicos del complemento. Los métodos de bandeado más comunes comprenden las bandas Q (Caspersson et al., 1968), G (Seabright, 1971) y R (Dutrillaux y Lejeune, 1971) y a pesar de su utilidad en los estudios citogenéticos se utilizaron en muy pocas especies de invertebrados. En los bivalvos, Rodríguez-Romero et al. (1979a) aplicaron el método de bandas G en *Crassostrea virginica* y Méndez et al. (1990) indujeron un patrón de bandas con 2 x SSC en *Mytilus galloprovincialis*, sin embargo, el reducido tamaño de los cromosomas dificulta la obtención de un buen bandeado y la calidad de las bandas todavía no es comparable con la obtenida en las especies de vertebrados.

Otro tipo de técnica permite visualizar los intercambios recíprocos de ADN entre cromátidas hermanas (SCE). El análisis de estos intercambios constituye una de las pruebas más sensibles para detectar la exposición de células u organismos a agentes mutágenos que afectan a los cromosomas (Latt et al., 1981). Los métodos utilizados se basan en la incorporación de bromodesoxiuridina en lugar de la timidina, durante dos ciclos de replicación consecutivos del ADN, de manera que una cromátida tiene el ADN bisustituido y la otra cromátida monosustituido, provocando distinta afinidad al colorante Giemsa o colorantes fluorescentes (Latt, 1974; Perry y Wolff, 1974; Lin y Alfi, 1976). En los bivalvos *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, debido a su capacidad de bioconcentración, se evaluó el efecto de diferentes mutágenos sobre la frecuencia de SCE en células de huevos, embriones o adultos (Dixon y Clarke, 1982; Harrison y Jones, 1982; Brunetti et al., 1986), con la finalidad de detectar estos agentes en el medio marino.

1.3. ESPECIES DE TAXONOMIA COMPLEJA: EL CASO DEL GENERO *MYTILUS*

La taxonomía del género *Mytilus* se basó tradicionalmente en los caracteres morfológicos, sobre todo en las características de la concha. Lamy (1936) realizó una revisión del género y reconoce como especies distintas *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758, *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819, *M. trossulus* Gould, 1850, *M. chilensis* Hupé, 1854, *M. platensis* Orbigny, 1846, *M. planulatus* Lamarck, 1819 y *M. desolationis* Lamy, 1936. En una revisión posterior, Soot-Ryen (1955) considera como especies únicamente *M. californianus* Conrad, 1837, *M. coruscus* Gould, 1861 y la mayor parte de las especies reconocidas por Lamy (1936) como subespecies de *M. edulis*. *M. trossulus*, tratada como una especie separada por Lamy (1936), es considerada como un sinónimo de *M. edulis* por Soot-Ryen (1955). También *M. aoteanus*, descrita por Powell (1958), es tratada como una subespecie de *M. edulis* por Fleming (1959) y posteriormente Scarlato y Starobogatov (1979) describen dos nuevas subespecies de *M. edulis*, *M. edulis kussakini* y *M. edulis zhirmunskii*.

Esta confusa distinción de taxones se debe en gran parte a que los caracteres morfológicos son enormemente plásticos, estando influenciados por la edad de los individuos, la densidad de la población, el tipo de hábitat y el nivel mareal (Seed, 1968). Dentro de la problemática del género, la relación taxonómica de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* es objeto de una especial atención; algunos autores contemplan *M. galloprovincialis* como una verdadera especie mientras que para otros se trata de una "subespecie", "raza" o "ecotipo" del complejo *M. edulis* (véanse revisiones Gosling, 1984; Koehn, 1991; Gosling, 1992a; Gardner, 1992).

Con el fin de determinar las diferencias genéticas entre *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, en los años setenta comenzaron a aplicarse las técnicas de electroforesis, revelando distintas frecuencias alélicas en algunos loci alozímicos (Ahmad y Beardmore, 1976; Skibinski et al., 1978; Grant y Cherry, 1985; Varvio et al., 1988, McDonald y Koehn, 1988). También se llevaron a cabo estudios inmunológicos (Bisignano et al., 1980; Brock, 1985) y análisis del ADN mitocondrial (Skibinski, 1985; Edwards y Skibinski, 1987) para caracterizar las dos formas.

Las relaciones citotaxonómicas fueron analizadas en tres *Mytilus* por Thiriot-Quévieux (1984d); esta autora compara los cariotipos de *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. desolationis* y señala que las tres formas de mejillón pueden ser diferenciadas cariotípicamente por la posición del centrómero de dos pares cromosómicos. Sin embargo, en otro estudio comparativo entre dos poblaciones de *M. edulis* y una de *M. galloprovincialis*, Dixon y Flavell (1986) no detectan las diferencias señaladas por Thiriot-Quévieux (1984d).

M. edulis y *M. galloprovincialis* manifiestan diferencias a otros niveles como son la distinta sensibilidad a los parásitos *Pinnotheres pisum* (Seed, 1971) y *Prosorhynchus squamatus* (Coustau et al. 1991a), la tasa de crecimiento (Seed, 1971) y la ultraestructura de los espermatozoides (Hodgson y Bernard, 1986; Crespo et al., 1990). Teniendo en cuenta que ambos tipos de mejillones son cultivados y comercializados, su diferenciación precisa, independientemente del interés taxonómico y evolutivo, es de gran importancia para su explotación.

Trabajos recientes en varias poblaciones de *Mytilus* pusieron de manifiesto la posible existencia de otra forma de mejillón, al encontrarse diferencias genéticas entre los mejillones del Mar Báltico y *M. edulis* y *M. galloprovincialis* de distintos orígenes geográficos, respecto a la variabilidad alozímica (Theisen, 1978; Bulnheim y Gosling, 1988; Varvio et al. 1988; Johannesson et al., 1990; Väinölä y Hvilsom 1991). Por otra parte, las poblaciones de *Mytilus* de la costa atlántica y pacífica norteamericana presentan una gran heterogeneidad genética y algunas de ellas muestran, para algunos loci alozímicos, frecuencias alélicas similares a los mejillones del Báltico (Koehn et al., 1984; Varvio et al., 1988; McDonald y Koehn, 1988). La diferenciación genética de las poblaciones de estas regiones son interpretadas por algunos autores como el resultado de la acción de agentes selectivos (Theisen, 1978; Gartner-Kepkay et al., 1980; Johannesson et al., 1990). Pero para otros representan una línea evolutiva independiente (Bulnheim y Gosling, 1988; Varvio et al., 1988; Väinölä y Hvilsom, 1991) y, aunque no hay un consenso sobre el status taxonómico de estas poblaciones, en algunos trabajos se considera que constituyen una verdadera especie (McDonald y Koehn, 1988; Koehn,

1991), atribuyéndole el nombre específico de *Mytilus trossulus* Gould, 1850 (véase revisión Gosling, 1992a,b).

1.4. OBJETIVOS DE ESTE ESTUDIO

Bajo un aspecto fundamental, el estudio de los cariotipos constituye un complemento indispensable para determinar el grado de parentesco y comprender la evolución de las especies. En todos los grupos de animales, la especiación se acompaña de cambios genéticos que en muchos casos implican sólo genes individuales, pero en otros afectan a fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros, traduciéndose a menudo en modificaciones visibles del cariotipo (Dreux, 1977). La dilucidación de los mecanismos que permiten explicar las diferencias entre los cariotipos ofrece la posibilidad de reconstituir los cariotipos ancestrales y establecer una filogenia cromosómica (Dutrillaux y Couturier, 1983). Sin embargo, el número de especies de bivalvos estudiadas, así como los datos disponibles (mayoritariamente número y morfología de los cromosomas) son todavía insuficientes para determinar los procesos evolutivos implicados, sobre todo teniendo en cuenta que la aplicación de las técnicas de bandedo es imprescindible para establecer las relaciones cariotípicas entre las especies.

Un gran número de bivalvos son explotados con fines comerciales y las especies cultivadas son cada vez más numerosas. En el campo de la investigación aplicada, el conocimiento de sus cariotipos resulta indispensable antes de emprender cualquier tipo de experiencias destinadas a la obtención de híbridos interespecíficos o de mejora genética.

Los bivalvos explotados comercialmente presentan también ciertas ventajas para el estudio de los cromosomas. La ausencia de cultivos celulares, que proveen regularmente células en división, hace que la disponibilidad de metafases sea aleatoria y dependiente de la tasa espontánea de división celular. En las especies comercializadas, al ser muchas de ellas cultivadas bajo condiciones controladas, esta dificultad puede ser paliada en parte por la posibilidad de obtener animales juveniles en fase de crecimiento activo. Además, al ser objeto de explotación regular constituyen un material particularmente disponible.

En este trabajo se trata de caracterizar el cariotipo de bivalvos comerciales todavía no estudiados: *Mytilus trossulus* y *Perna perna* de la familia Mytilidae, *Ostrea denselamellosa* y *Ostrea puelchana* de la familia Ostreidae, *Cerastoderma edule* de la familia Cardiidae, *Venerupis pullastra* y *Venerupis rhomboides* de la familia Veneridae. Para ello, se analiza en

primer lugar el cariotipo respecto a la morfología de los cromosomas y en segundo lugar se aplican, en la mayor parte de estas especies, las técnicas de tinción selectiva, NOR y bandas C.

Por otra parte, se pretende determinar criterios susceptibles de diferenciar las especies de una misma familia, aplicándose las mismas técnicas de tinción selectiva, en la medida de lo posible, a otras especies de las mismas familias y con cariotipos ya conocidos: *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* (Mytilidae), *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* (Ostreidae), *Ruditapes philippinarum* y *Venerupis aurea* (Veneridae).

En el caso de *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, cuya taxonomía es objeto de controversia, se presta especial atención a su citotaxonomía. Dado que la composición del cariotipo de las poblaciones estudiadas de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* es variable, se reexamina la morfología de los cromosomas antes de aplicar las técnicas de bandeo, con el fin de comparar los cariotipos resultantes siguiendo los mismos métodos.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. ESPECIES ESTUDIADAS

Se estudiaron moluscos bivalvos de interés comercial: mejillones, ostras, berberechos y almejas. Las diferentes especies, las localidades donde se recolectaron y el número de individuos utilizados se detallan en la **tabla 1**. Los ejemplares de cada especie, de tamaño comprendido entre 1 y 3 cm, proceden de poblaciones naturales o bien de poblaciones cultivadas. Los lugares de recolección se indican en la **figura 1**.

Las especies examinadas de la familia Veneridae se citan a menudo en la bibliografía con diferentes nombres específicos (véanse sinónimos en Fischer-Piette y Métivier, 1971; Partridge, 1977). En este trabajo se adoptan los nombres específicos utilizados por la FAO (Fischer et al., 1987).

2.2. ACONDICIONAMIENTO DE LOS ANIMALES

La recolección y el cambio del medio natural o de los tanques de cultivo al laboratorio provoca un estrés en los animales que, con frecuencia, se traduce en una considerable reducción o, incluso, en una interrupción de la proliferación celular. Por ello, es necesario tratar a los animales para realizar las preparaciones cromosómicas lo antes posible, o bien intentar adaptarlos a las condiciones del laboratorio con el fin de recuperar el ritmo celular normal.

Los ejemplares de todas las especies se transportaron en recipientes húmedos lo más rápidamente posible (menos de 24 horas). Una vez en el laboratorio, se mantuvieron en acuarios con agua de mar aireada, a una temperatura de 17-20°C, alimentándose regularmente con la microalga *Isochrysis galbana*. En el caso de *M. trossulus*, al proceder del Mar Báltico, se rebajó la salinidad del agua.

La mayor parte de los animales de cada muestra se mantuvieron en las condiciones descritas de 7 a 12 días y otros se trataron el mismo día de la llegada al laboratorio para la obtención de las preparaciones cromosómicas.

2.3. OBTENCION DE LAS PREPARACIONES CROMOSOMICAS

Las preparaciones cromosómicas se obtuvieron mediante la técnica de suspensión celular descrita por Thiriot-Quévieux y Ayraud (1982). Las diferentes etapas de esta técnica se detallan a continuación.

Especies	Localidad	Nº individuos
Familia Mytilidae		
<i>Mytilus edulis</i> Linné, 1758	Wimereux (Francia)	58
<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	Niza (Francia)	219
<i>Mytilus trossulus</i> Gould, 1850	Trosa (Suecia)	48
<i>Perna perna</i> (Linné, 1758)	Sidi Fredj (Argelia)	8
Familia Ostreidae		
<i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793) *	La Tremblade, IFREMER (Francia)	176
<i>Ostrea edulis</i> Linné, 1758 *	La Tremblade, IFREMER (Francia)	527
<i>Ostrea denselamellosa</i> Linschke, 1869 *	La Tremblade, IFREMER (Francia), progenitores japoneses	293
<i>Ostrea puelchana</i> Orbigny, 1841 *	Ronce les Bains, IFREMER (Francia), progenitores argentinos	24
Familia Cardiidae		
<i>Cerastoderma edule</i> (Linné, 1758)	Baldayo (Galicia)	72
	Ría del Pasaje (Galicia)	23
Familia Veneridae		
<i>Venerupis pullastra</i> (Montagu, 1803)	Baldayo (Galicia)	77
<i>Venerupis rhomboides</i> (Pennant, 1777)	Ria de Arosa (Galicia)	65
<i>Ruditapes philippinarum</i> (Adams y Reeve, 1850) *	La Tremblade, IFREMER (Francia)	237
<i>Venerupis aurea</i> (Gmelin, 1791)	Sète (Francia)	89

Tabla 1.- Especies estudiadas, lugar de recolección y número de individuos utilizados.

* Poblaciones cultivadas

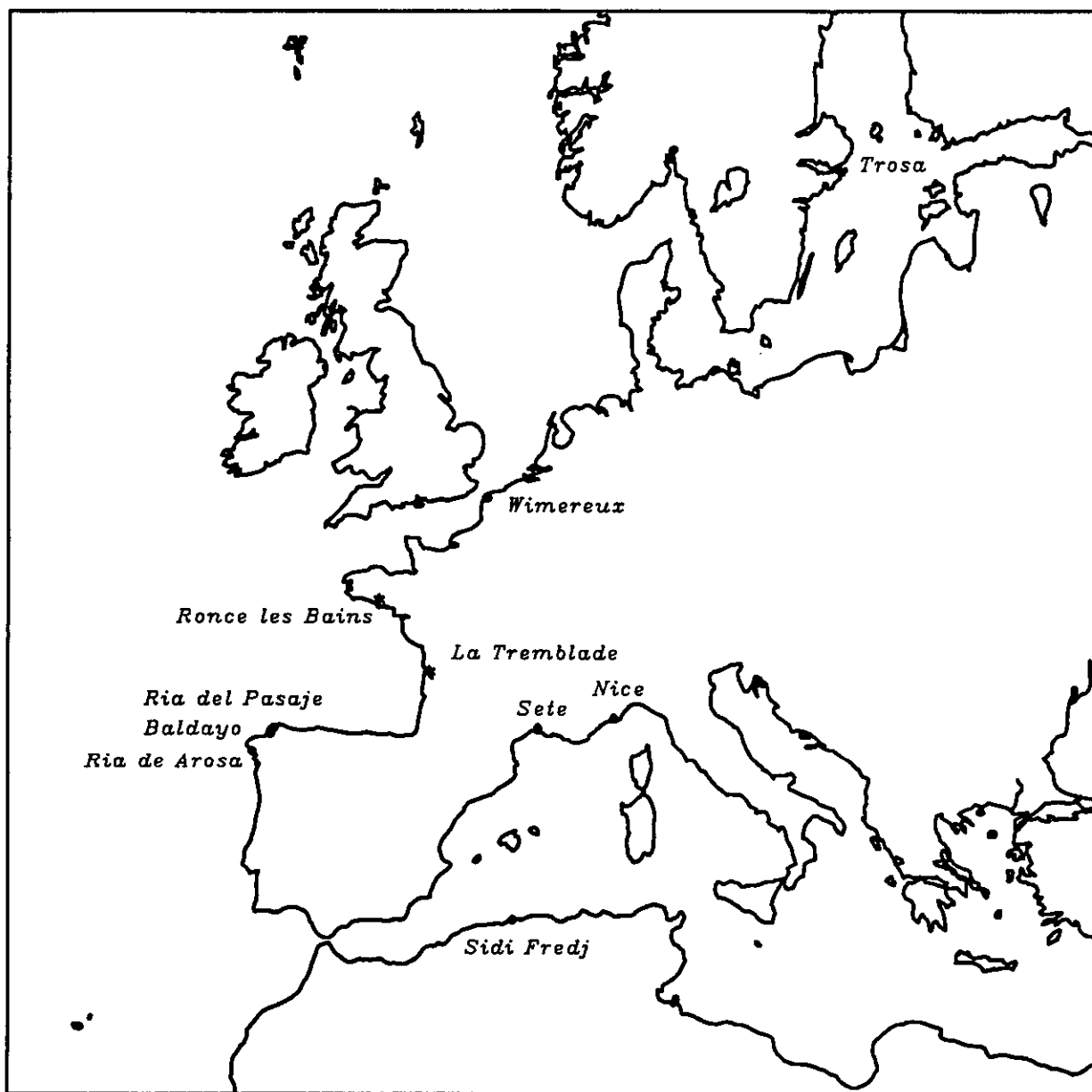


Figura 1.- Localización geográfica de los lugares de recolección.

• Poblaciones naturales • Poblaciones cultivadas

Bloqueo de la mitosis en metafase

La colchicina es un alcaloide que interfiere la formación del huso mitótico y bloquea la división celular. Esto provoca la acumulación de células en el estado de metafase, así como el acortamiento y la condensación de los cromosomas. Un tiempo de tratamiento con la colchicina demasiado largo produce una alta condensación cromosómica, por el contrario, un tiempo demasiado corto y/o una concentración débil puede provocar la ausencia de metafases.

Los animales se trataron con una solución de colchicina al 0,005% en agua de mar, conteniendo la microalga *Isochrysis galbana*, de 6 a 10 horas según las especies:

- *C. edule*, *V. pullastra*, *V. rhomboides*, *R. philippinarum* y *V. aurea*, de 6 a 7 horas
- *C. gigas*, *O. edulis*, *O. denselamellosa* y *O. puelchana*, de 7 a 8 horas
- *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus* y *P. perna*, de 8 a 10 horas

Una vez finalizado el tratamiento, se diseccionaron las branquias.

Choque hipotónico

El tratamiento con una solución hipotónica tiene por finalidad provocar la turgencia de las células y una buena dispersión de los cromosomas; la naturaleza y la concentración, así como la duración del tratamiento, son importantes y varían según la especie de que se trate.

Las soluciones utilizadas y el tiempo de tratamiento fueron los siguientes:

- soluciones de agua de mar al 50% y al 25%, durante 30 minutos cada una, en las especies *C. edule*, *V. pullastra*, *V. rhomboides*, *R. philippinarum* y *V. aurea*
- solución de citrato de sodio al 9%, durante 30 minutos, en *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus*, *P. perna*, *C. gigas*, *O. edulis*, *O. denselamellosa* y *O. puelchana*.

Para facilitar la penetración de la solución en el tejido, la branquia se fragmentó sin cortarla completamente.

Fijación

La fijación está destinada a conservar las células sin alterar ni deformar su contenido. La solución fijadora debe ser preparada en el momento de emplearse y a la temperatura de 4°C.

Las branquias se fijaron con una solución de 3 volúmenes de alcohol etílico absoluto y 1 volumen de ácido acético, realizándose tres baños sucesivos de 20 minutos cada uno. El material fijado puede conservarse varios días a 4°C en la solución fijadora, pero se intentó realizar la siguiente etapa de la técnica el mismo día de la fijación.

Extensión

La obtención de extensiones cromosómicas a partir de tejidos sólidos requiere una disociación previa de las células, la cual puede ser obtenida mediante el tratamiento con una solución ácida.

La branquia entera o un fragmento (según el tamaño) se colocó en un portaobjetos excavado con unas gotas de una solución de ácido acético al 50% durante unos instantes, agitándose con una pinzas para facilitar la liberación de las células. La suspensión celular se recogió con una pipeta Pasteur y se dejó caer desde una altura aproximada de 20 cm sobre un portaobjetos calentado a 44°C. El líquido se reaspiró rápidamente, formándose varias aureolas de núcleos y metafases dispersos.

2.4. TINCION

La tinción con el colorante Giemsa es la más frecuentemente utilizada y permite distinguir exactamente la morfología de los cromosomas, siendo de gran utilidad en el caso de que se pretenda obtener el cariotipo estándar.

Las preparaciones cromosómicas se tiñeron con una solución Giemsa, compuesta de 4 ml del colorante, 4 ml de tampón fosfato de pH 6,8 y 92 ml de agua destilada, de 8 a 10 minutos. El tampón se preparó a partir de dos soluciones: solución A con 7,8 g de dihidrógenofosfato de sodio en 250 ml de agua destilada, y solución B con 17,9 g de monohidrógenofosfato de disodio en 250 ml de agua destilada. Para un volumen final de 200 ml, se tomaron 51 ml de la primera solución y 49 ml de la segunda. Transcurrido el tiempo de tinción, las preparaciones se lavaron con agua destilada, dejándose secar al aire.

2.5. OBSERVACION Y FOTOGRAFIADO

Las preparaciones cromosómicas se sometieron a un chequeo sistemático, seleccionándose las mejores metafases. Estas se fotografiaron con un fotomicroscopio Zeiss III y película Kodak Technical Pan 2415. Para el revelado de la película se utilizó el revelador Kodak D-76 y el fijador Kodak Unifix, y para el revelado del papel (Kodabrome) se empleó el revelador Kodak Dektol y el fijador anterior.

2.6. TRATAMIENTO *IN VIVO* DE LOS ANIMALES

La sustitución de la timidina por su análogo bromodesoxiuridina (BrdU), durante la fase de síntesis del ADN, retarda la condensación de las regiones ricas en pares de bases AT, provocando un alargamiento neto de los cromosomas (Zakharov y Egolina, 1972). Estos, al aumentar en longitud, permiten que la posición del centrómero sea más fácilmente visualizada.

Las especies *C. gigas*, *V. pullastra* y *R. philippinarum* muestran a menudo cromosomas altamente condensados y de pequeño tamaño. Por ello, un lote de individuos de cada muestra se trató con una solución de 50 µg/ml de BrdU en agua de mar, durante un período de 3 a 5 días, renovándose la solución dos veces por día. Diez o doce horas antes de finalizar la experiencia, se añadió un 0,005% de colchicina a la solución de BrdU y las branquias se procesaron para la obtención de las preparaciones cromosómicas de la misma manera que las de los animales no tratados.

2.7. ELABORACION DEL CARIOTIPO Y ANALISIS MORFOMETRICO

Los cromosomas de las mejores metafases teñidas con Giemsa se recortaron de las fotografías y se ordenaron de acuerdo al tamaño y a la morfología para obtener el cariotipo.

Un cromosoma metafásico presenta dos características morfológicas cuantificables: la longitud y la posición del centrómero. Levan et al. (1964) describieron un sistema de nomenclatura para uniformizar la terminología y simplificar el reconocimiento de los cromosomas. Este sistema se basa en la determinación de la posición del centrómero mediante el cálculo del índice centromérico (Ic): $100 \times (\text{longitud del brazo corto} / \text{longitud total del cromosoma})$, o de la relación entre brazos, conocida como "arm ratio" (Ar): $\text{longitud del brazo largo} / \text{longitud del brazo corto}$. Los cromosomas se clasifican posteriormente en cuatro categorías según los valores de estos parámetros. Si el centrómero se localiza en la región media, el cromosoma es metacéntrico (m); si está en la región submedia, el cromosoma es submetacéntrico (sm); si está en la región subterminal, el cromosoma es subtelocéntrico y si está en la región terminal, el cromosoma es telocéntrico.

Este sistema de nomenclatura es empleado internacionalmente pero algunos autores hacen el cálculo del "arm ratio" como la relación entre la longitud del brazo corto y la longitud del brazo largo (Conferencia de París, 1971). Los valores límite entre las cuatro categorías establecidas por Levan et al. (1964) para el índice centromérico y el "arm ratio", así como los

valores de este último parámetro, calculados de acuerdo con la Conferencia de París (1971), figuran en la **tabla 2**.

El análisis morfométrico se basa, por tanto, en la medida de la longitud del brazo corto y de la longitud del brazo largo de cada cromátida del cromosoma, efectuándose en este trabajo en las 10 mejores metafases de cada especie. Las medidas se realizaron directamente sobre los cariotipos con una tableta digitalizadora (Summa Sketcht II), acoplada a un microordenador Apple Macintosh Classic equipado con un programa en lenguaje Basic. En cada cromátida se midió la longitud del brazo corto y la longitud del brazo largo, siendo cada medida la suma de las longitudes de varios segmentos.

Mediante una "macro" del programa Excel se trataron las medidas y se calcularon los siguientes parámetros:

- longitud absoluta del complemento diploide, igual a la suma de las longitudes de todos los cromosomas;
- longitud absoluta del complemento haploide, igual a la mitad de la longitud absoluta del complemento diploide;
- longitud absoluta de un par cromosómico, igual a la media de las longitudes de los dos cromosomas;
- longitud relativa de un par cromosómico, igual a $100 \times (\text{longitud absoluta} / \text{longitud absoluta del complemento haploide})$;
- índice centromérico de un par cromosómico, igual a la media de los índices centroméricos [$100 \times (\text{longitud del brazo corto} / \text{longitud total de la cromátida})$] de las cuatro cromátidas ;
- "arm ratio" de un par cromosómico, igual a la media de los "arm ratios" ($\text{longitud del brazo corto} / \text{la longitud del brazo largo de la cromátida}$) de las cuatro cromátidas.

Posteriormente, a partir de los 10 valores de cada parámetro, se calculó la media (M) de las longitudes absolutas del complemento diploide y de las longitudes relativas, de los índices centroméricos y de los "arm ratios" de cada par cromosómico, así como también la desviación típica (DT) y los límites de confianza de cada una de las medias para un nivel de confianza del 95%. En los casos en los que el límite de confianza de la media del índice centromérico, o del "arm ratio", cubre dos de las categorías establecidas por Levan et al. (1964) se indican las dos.

La caracterización de los cariotipos, mediante las medidas de los cromosomas de varias metafases, permite la elaboración de un modelo gráfico que facilita los análisis comparativos. En este trabajo, el cariotipo de cada especie se representa por un idiograma,

Posición del centrómero	Nomenclatura	Índice centromérico	Arm ratio	
			I	II
Punto medio	Metacéntrico (M)	50	1	1
Región media	metacéntrico (m)	37,5–50,0	1,00–1,67	0,59–1,00
Región submedia	submetacéntrico (sm)	25,0–37,5	1,67–3,00	0,33–0,59
Región subterminal	subtelocéntrico (st)	12,5–25,0	3,00–7,00	0,14–0,33
Región terminal	telocéntrico (t)	0–12,5	7,00–∞	0,00–0,14
Punto terminal	Telocéntrico (T)	0	∞	0

Tabla 2.- Nomenclatura de los cromosomas establecida por Levan et al. (1964) y valores del índice centromérico y del "arm ratio" para cada categoría cromosómica.

I: Levan et al. (1964); II: Conferencia de París (1971)

tomando los valores de la longitud relativa media y del índice centromérico medio de cada par cromosómico.

El cariotipo puede también caracterizarse por el número fundamental (NF), que corresponde al número de brazos cromosómicos (Matthey, 1945), calculándose a partir de la dotación haploide y asignando un valor de 4 a los cromosomas metacéntricos y submetacéntricos y de 2 a los cromosomas subtelocéntricos y telocéntricos (Nakamura, 1985).

En la actualidad no existe una regla absoluta para ordenar los cromosomas de una especie no estudiada anteriormente. Algunos autores adoptan el criterio de tamaño decreciente, y otros ordenan en primer lugar los cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, posteriormente los subtelocéntricos y telocéntricos, y cada categoría por orden de tamaño decreciente. La ausencia de regla estricta hace que el cariotipo de una misma especie puede conocer diferentes ordenaciones. En este trabajo, los cromosomas se presentan siguiendo el criterio de tamaño decreciente en las tablas de medidas y en los cariotipos, y por categorías morfológicas en los idiogramas para facilitar la comparación entre especies.

2.8. TECNICAS DE TINCION SELECTIVA

Las técnicas de tinción selectiva se aplicaron en función de la disponibilidad de los animales y del número de metafases en cada individuo, no pudiendo ser efectuadas sistemáticamente en todas las especies. De todo el material utilizado, las especies procedentes de las plantas de cultivo del IFREMER en La Tremblade fueron particularmente disponibles. Aunque la obtención de metafases es aleatoria, variando de unas especies a otras e incluso de unas muestras a otras, los animales cultivados mostraron en general un mayor número de metafases que los de poblaciones naturales, debido probablemente a que el cambio de medio es menos brusco.

La tinción de las regiones organizadoras del nucleolo se aplicó con prioridad en las especies con cariotipo ya conocido y en las restantes especies una vez determinado el cariotipo estándar. A continuación, si se disponía de preparaciones cromosómicas, se realizó la tinción de la heterocromatina constitutiva. Finalmente, la primera tinción se pudo afectar en todas las especies salvo *V. rhomboides* y la segunda en *M. edulis*, *M. trossulus*, *C. gigas*, *O. edulis*, *O. denselamellosa*, *C. edule* y *V. pullastra*.

2.8.1. TINCION DE LAS REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Los NORs se tiñeron mediante la técnica de precipitación argéntica, empleándose una combinación de los métodos desarrollados por Howell y Black (1980) y Gold y Ellison (1982) con algunas modificaciones.

Se prepararon dos soluciones: una solución coloidal, compuesta de 2 g de gelatina, 1 ml de ácido fórmico y 100 ml de agua destilada, y una solución de nitrato de plata con 4 g de este compuesto y 8 ml de agua destilada. Las preparaciones cromosómicas se trataron con dos gotas de la solución coloidal y 4 gotas de la de nitrato de plata, incubándose, tapadas con un cubreobjetos, sobre una placa calentada a 44°C, de 5 a 9 minutos. La tinción se interrumpió con un lavado en agua destilada y, una vez secas las preparaciones, se observaron al microscopio, fotografiándose las mejores metafases. Los cromosomas y los núcleos muestran una coloración amarillo-dorada mientras que la de los NORs y los nucleolos es negra.

Esta tinción se aplicó directamente a las preparaciones cromosómicas, pero en algunas especies también se aplicó a preparaciones teñidas anteriormente con el colorante Giemsa y destañadas por sucesivos baños de alcohol de 100°, 95°, 70° y 50°. Las mejores metafases se fotografiaron después de cada tinción para precisar la morfología de los cromosomas teñidos con nitrato de plata y facilitar la elaboración de los cariotipos.

2.8.2. TINCION DE LA HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

La técnica empleada se basa en la descrita por Sumner (1972) pero, teniendo en cuenta que no se conocía su efectividad en los cromosomas de bivalvos, antes de adoptar un protocolo definitivo se realizaron varios ensayos sobre algunos aspectos de la técnica:

- envejecimiento de las preparaciones cromosómicas, utilizándose preparaciones de 6 a 25 días;
- temperatura y duración del tratamiento con hidróxido de bario, realizándose dos modalidades, (i) temperatura de 50°C desde 20 segundos hasta los minutos necesarios para provocar la degradación total de los cromosomas y (ii) temperatura ambiente y una duración de 10 a 45 minutos;
- tinción con Giemsa, probándose la concentración del colorante, 4% y 2%, y el tiempo de coloración, de 5 minutos a 1 hora y media.

Se utilizaron también preparaciones cromosómicas de un gasterópodo disponible en el laboratorio, *Pneumodermposis canephora*, para verificar la eficacia de la técnica puesto que esta especie muestra regularmente claras bandas C.

En base a los ensayos realizados, el protocolo adoptado para todas las especies se detalla a continuación. Las preparaciones cromosómicas se dejaron envejecer de 15 a 25 días y se incubaron en ácido clorhídrico 0,2 N durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron abundantemente en agua destilada y se sometieron al tratamiento con hidróxido de bario 0,3 N, a la temperatura de 50°C, de 15 segundos a 5 minutos. Se lavaron una vez más las preparaciones y se trataron con una solución de 2 x SSC (cloruro de sodio 0,3 M, citrato de trisodio 0,03 M) a 60°C, durante una hora. Después de un nuevo lavado con agua destilada, las preparaciones cromosómicas se tificaron durante una hora y media con Giemsa al 2%. La observación de las preparaciones y las fotografías se realizaron en el microscopio con contraste de fases.

2.9. TRATAMIENTO ESTADISTICO

En el caso de los mejillones y las almejas se realizaron algunos tests estadísticos y métodos de análisis de datos para comparar algunos pares cromosómicos o los cariotipos.

Se aplicó el test t de Student a las medias de los índices centroméricos, así como a las medias de las longitudes relativas de cada par cromosómico de *M. edulis* y *M. trossulus*, para determinar si la media de estos parámetros difiere entre los dos mejillones.

Los valores de los parámetros morfométricos (Índice centromérico y longitud relativa) de los cromosomas Ag-NORs subtelocéntricos de las metafases medidas en *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus* se sometieron a un análisis de la varianza de una vía. Este análisis se realizó para cada par cromosómico, tratando cada parámetro individualmente.

Los métodos de ordenación o factoriales permiten el estudio de masas complejas de información, poniendo de manifiesto agrupamientos, oposiciones o tendencias, imposibles de discernir en un tabla grande de datos. Existen varios métodos adaptados a diferentes tipos de datos, siendo posible aplicarlos solos o conjuntamente con los métodos de clasificación. En este trabajo se aplicó el análisis de componentes principales (ACP) que trata tablas de datos

compuestas de individuos y variables numéricas. A propósito de los individuos se trata de evaluar su semejanza y a propósito de las variables se trata de evaluar su relación. El conjunto de variables es resumido en un pequeño número de variables sintéticas, llamadas componentes principales. Estas representan, por tanto, una serie de nuevas variables, combinaciones lineales de las variables iniciales, no correlacionadas entre ellas; calculándose de manera que el primer componente explique el máximo de la varianza, el segundo componente explique el máximo de la varianza que queda por explicar y así sucesivamente (Pimentel, 1979). Finalmente se espera que un máximo de varianza sea explicada por un mínimo de componentes principales.

La clasificación ascendente jerárquica (CAH) permite crear un agrupamiento jerarquizado entre los individuos, a menudo representado por un dendrograma. El método parte de una matriz de distancias entre individuos, agrupando posteriormente los individuos cuyas distancias son mínimas de acuerdo con un criterio de agregación. En este trabajo, se siguió el método de Ward (1963) donde el criterio de agregación es la minimización de la relación entre la varianza intragrupo y la varianza intergrupo.

El ACP y la CAH se aplicaron a las medidas morfométricas (Índice centromérico y longitud relativa) de cinco especies de Veneridae. Los datos utilizados para calcular la matriz de distancias en el CAH corresponden a las coordenadas de los individuos en los dos primeros ejes del ACP.

Tanto los test estadísticos como los métodos de análisis de datos se realizaron utilizando el programa informático BIOMEKO (Centre d'Etudes Physico-sociologiques et Ecologiques, CEPE-CNRS Montpellier).

3. RESULTADOS

3.1. FAMILIA MYTILIDAE

3.1.1. *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

Las dotaciones cromosómicas haploide y diploide de *M. galloprovincialis*, $n = 14$, $2n = 28$, se determinaron en individuos de diferentes poblaciones en trabajos precedentes (Lubet, 1959; Rassoto et al., 1981; Thiriou-Quévroux y Ayraud, 1982; Dixon y Flavell, 1986; Pasantes et al., 1990).

3.1.1.1. MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA Y CARIOTIPO

La morfología cromosómica se examinó en cromosomas teñidos con Giemsa, se elaboraron 24 cariotipos, de 17 individuos, y se midieron los cromosomas en 10 de ellos. La longitud absoluta media del complemento diploide es de $149,40 \mu\text{m}$ ($DT = 23,14$). En la **tabla 3** se especifican los valores de las medias y desviaciones típicas de los parámetros longitud relativa (RI), "arm ratio" (Ar) e índice centromérico (Ic) de cada par cromosómico, así como la clasificación resultante. La longitud relativa está comprendida entre el 9,68% y el 5,16%, encontrándose la mayor diferencia de tamaño entre pares consecutivos entre los pares 1 y 2. Los 14 pares cromosómicos se clasifican en metacéntricos, pares 1, 2, 4, 7 y 9, submetacéntricos, pares 12, 13 y 14, y subtelocéntricos, pares 3, 5, 6, 8, 10 y 11, no observándose telocéntrico alguno. El número fundamental correspondiente a esta clasificación es 44. Teniendo en cuenta el intervalo de confianza de la media de los índices centroméricos o de los "arm ratios", algunos cromosomas pueden clasificarse en dos categorías: submetacéntricos-subtelocéntricos, pares 12, 13 y 14 y subtelocéntricos-submetacéntricos, pares 3, 8, 10 y 11. En este caso el número fundamental puede tomar valores entre 38 y 52. La dotación haploide se presenta por tipos morfológicos en la **figura 2** y el cariotipo, organizado por orden de tamaño decreciente, en la **figura 3 A**.

3.1.1.2. REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Se analizaron 71 metafases teñidas con nitrato de plata de un total de 42 individuos, oscilando entre 1 y 6 las metafases de cada uno; 40 de las metafases se tifieron previamente con Giemsa (véase una metafase en la **figura 4**) para precisar la morfología y la localización de los cromosomas en el cariotipo. El número de regiones organizadoras del nucleolo teñidas con

plata (Ag-NORs) varía entre uno y cuatro, observándose diferencias entre individuos y entre las células de un mismo individuo; así en un ejemplar, del que se analizaron 6 metafases, se observó 1 metafase con dos Ag-NORs, 4 con tres Ag-NORs y 1 con cuatro Ag-NORs. En el total de metafases, se contabilizaron 6 con un Ag-NOR, 29 con dos Ag-NORs, 20 con tres Ag-NORs y 16 con cuatro Ag-NORs. En todos los casos se localizaron terminalmente en el brazo largo de los pares cromosómicos 6 (subtelocéntrico) y 10 (subtelocéntrico-submetacéntrico). La distribución de los Ag-NORs en las células examinadas se especifica en la **tabla 4**; el caso más frecuente corresponde a la presencia simultánea de cuatro Ag-NORs (22,54%), aunque dos Ag-NORs en el par 6 (19,72%) o dos en el par 6 y uno en el 10 (16,90%) muestran frecuencias no muy inferiores. Algunos de los cariotipos Ag-NORs observados se muestran en la **figura 3 B,C,D**. La frecuencia de Ag-NORs en cada par cromosómico se representa en la **figura 5**; en los dos pares la proporción de Ag-NORs en homocigosis (par 6: 59,16%; par 10: 40,84%) es superior a la proporción en heterocigosis (par 6: 33,80%; par 10: 30,99%), pero en el par 6 la diferencia entre ambas proporciones es mayor y la proporción de células sin Ag-NORs menor (par 6: 7,04%; par 10: 28,17%).

En el núcleo interfásico se contó el número de nucleolos revelados por la tinción, examinándose de 100 a 113 células en 8 individuos. Ninguno de ellos muestra un número constante de nucleolos, detectándose entre uno y cuatro en proporciones variables. La frecuencia (%) de nucleolos por núcleo y el número medio de nucleolos por individuo se detalla en la **tabla 5**; el porcentaje más elevado corresponde a uno o dos nucleolos y el número medio está comprendido entre 1,48 y 2,61.

3.1.2. *MYTILUS EDULIS*

El número de cromosomas, $n = 14$, $2n = 28$, de *M. edulis* fue determinado por Lubet (1959) y confirmado por otros autores en diferentes poblaciones (Ahmed y Sparks, 1970; Ieyama e Inaba, 1974; Thiriou-Quévieux y Ayraud, 1982; Moynihan y Mahon, 1983; Dixon y Flavell, 1986)

3.1.2.1. MORFOLOGIA CROMOSOMICA Y CARIOTIPO

Se examinaron 17 cariotipos, de 8 individuos, y se midieron los cromosomas de 10 de ellos, siendo la longitud absoluta media del complemento diploide de 167,41 μm (DT = 22,32). En la **tabla 6** se especifican, para cada par cromosómico, los valores de las medias y

desviaciones típicas de la longitud relativa, "arm ratio" e índice centromérico, así como la clasificación resultante. La longitud relativa está comprendida entre el 9,62% y el 5,17%, encontrándose la mayor diferencia de tamaño entre los pares 1 y 2. Los 14 pares cromosómicos se clasifican en metacéntricos, pares 1, 2, 5, 6, 8 y 12, submetacéntricos, par 11, y subtelocéntricos, pares 3, 4, 7, 9, 10, 13 y 14. El número fundamental que corresponde a esta clasificación es 42. Considerando el intervalo de confianza de la media de los índices centroméricos o de los "arm ratios", algunos pares cromosómicos pueden clasificarse en dos categorías: par 11, submetacéntrico-subtelocéntrico, los pares 4, 9, 10, 13 y 14, subtelocéntricos-submetacéntricos y el par 7, subtelocéntrico-telocéntrico. En este caso el número fundamental puede variar entre 40 y 52. La dotación haploide se representa por tipos morfológicos en la **figura 6** y el cariotipo, organizado por tamaño cromosómico decreciente, se muestra en la **figura 7A**.

3.1.2.2. REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Se analizaron 73 metafases teñidas con nitrato de plata de un total de 20 individuos, variando entre 1 y 8 las metafases de cada uno. Del total de metafases, 41 se tiñeron previamente con Giemsa (véase una metafase en la **figura 8**). El número de Ag-NORs oscila entre uno y cuatro, detectándose diferencias inter e intraindividuales; así en un individuo, del que se analizaron 8 metafases, se observaron 3 metafases con un Ag-NOR, 4 con dos Ag-NORs y 1 con tres Ag-NORs. Respecto al total de metafases, se contabilizaron 11 con un Ag-NOR, 28 con dos Ag-NORs, 21 con tres Ag-NORs y 13 con cuatro Ag-NORs. Estos se localizaron siempre terminalmente en el brazo largo de los pares cromosómicos 4 (subtelocéntrico-submetacéntrico) y 10 (subtelocéntrico-submetacéntrico). La distribución de los Ag-NORs en las células examinadas se especifica en la **tabla 7**; un Ag-NOR en cada par cromosómico portador (20,54%), dos en el par 4 y uno en el par 10 (19,18%), y los cuatro teñidos simultáneamente (17,81%) constituyen los casos más frecuentes. Algunos de los cariotipos Ag-NORs observados se muestran en la **figura 7 B,C,D**. La frecuencia de Ag-NORs en cada par cromosómico se representa en la **figura 9**; los dos pares muestran pequeñas diferencias entre la proporción de Ag-NORs en homocigosis (par 4: 47,94%; par 10: 34,25%) y en heterocigosis (par 4: 43,84%; par 10: 41,09%), pero el porcentaje de células sin Ag-NORs en el par 4 (8,22%) es inferior al del par 10 (24,66%).

La tinción de los nucleolos en el núcleo interfásico se analizó en 8 individuos, examinándose de 100 a 107 núcleos en cada uno. El número de nucleolos teñidos oscila entre

uno y cuatro en todos los individuos analizados. La frecuencia de nucleolos por núcleo y el número medio de nucleolos por individuo se detalla en la **tabla 8**; las proporciones más elevadas corresponden a uno o dos nucleolos y el número medio toma valores entre 1,65 y 2,19.

3.1.2.3. HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

Se sometieron 71 preparaciones cromosómicas de diferentes individuos a la técnica de bandas C. Independientemente del tiempo de incubación en el hidróxido de bario (de 1 a 5 minutos), pocas metafases responden al tratamiento, encontrándose una respuesta más favorable en las metafases poco condensadas. En 15 metafases, obtenidas de 11 individuos, algunos cromosomas muestran bandas C centroméricas, pero el número y los cromosomas bandeados varían de unas células a otras. En 10 de ellas se observaron bloques de heterocromatina constitutiva teñida en los telómeros del brazo largo de uno o dos cromosomas subtélócéntricos (véase una metafase en la **figura 10**), correspondiendo éstos con los cromosomas portadores de organizadores nucleolares .

3.1.3. *MYTILUS TROSSULUS*

3.1.3.1. NUMERO DE CROMOSOMAS

Los cromosomas del mejillón del Mar Báltico se analizan por primera vez en este trabajo, y los individuos examinados presentan una dotación cromosómica diploide de $2n = 28$.

3.1.3.2. MORFOLOGIA CROMOSOMICA Y CARIOTIPO

Se examinaron 13 cariotipos, de 6 individuos, y se midieron los cromosomas de 10 de ellos, siendo la longitud absoluta media del complemento diploide de 307,37 μm (DT = 35,48). En la **tabla 9** se especifican, para cada par cromosómico, los valores de las medias y desviaciones típicas de la longitud relativa, "arm ratio" e Índice centromérico, así como la clasificación resultante de los cromosomas. La longitud relativa está comprendida entre el 9,78% y el 5,76%, correspondiendo la mayor diferencia de tamaño a los pares 1 y 2. Los 14 pares cromosómicos se clasifican en metacéntricos, pares 1, 2, 6, 7, 9 y 13, submetacéntricos, pares 3 y 11, y subtélócéntricos, pares 4, 5, 8, 10, 12 y 14. El número fundamental

correspondiente a esta clasificación es 44. Teniendo en cuenta el intervalo de confianza de la media de los índices centroméricos o de los "arm ratios", el par cromosómico 3 puede clasificarse como submetacéntrico-subtelocéntrico y el par 14 como subtelocéntrico-submetacéntrico. En este caso el número fundamental puede estar comprendido entre 42 y 46. La dotación haploide se representa por tipos morfológicos en la **figura 11** y el cariotipo, organizado por tamaño cromosómico decreciente, en la **figura 12 A**.

3.1.3.3. REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Se analizaron 84 metafases teñidas con nitrato de plata de un total de 16 individuos, oscilando entre 2 y 17 las metafases de cada uno. Del total de metafases, 20 se tñieron anteriormente con Giemsa (véase una metafase en la **figura 13**). El número de Ag-NORs varía entre uno y cinco, observándose diferencias inter e intraindividuales; así por ejemplo, en un individuo, del que se examinaron 17 metafases, se observaron 2 metafases con dos Ag-NORs, 6 con tres Ag-NORs y 9 con cuatro Ag-NORs. Respecto al total de metafases, se observaron 14 con un Ag-NOR, 21 con dos Ag-NORs, 26 con tres Ag-NORs, 17 con cuatro Ag-NORs y 6 con cinco Ag-NORs. Estos se localizaron en los telómeros del brazo largo de los pares cromosómicos 4 y 10 (ambos subtelocéntricos) y en los telómeros de un brazo del par 7 (metacéntrico). Puesto que en un cromosoma metacéntrico es difícil diferenciar los dos brazos, el Ag-NOR se asignó arbitrariamente al brazo "corto". Un individuo del que se examinaron 9 metafases muestra, en 4 de ellas, un Ag-NOR adicional en el brazo corto de un cromosoma del par 10. La distribución de los Ag-NORs en las células examinadas se especifica en la **tabla 10**; los casos más frecuentes corresponden a un Ag-NOR en el par 4 (14,29%) y a un Ag-NOR en los pares 4 y 10 (13,10%), sin embargo, la distribución de frecuencias presenta una gran dispersión. Algunos de los cariotipos Ag-NORs observados se muestran en la **figura 12 B,C,D**. La frecuencia de Ag-NORs en cada par portador se representa en la **figura 14**; en los tres pares los porcentajes de Ag-NORs en heterocigosis (par 4: 58,34%; par 10: 44,05%; par 7: 35,74%) son claramente superiores a los porcentajes en homocigosis (par 4: 32,14%; par 10: 23,81%; par 7: 13,10%), pero el par 4 muestra una proporción de células sin Ag-NORs (9,52%) mucho más baja que los otros dos pares (par 10: 32,14%; par 7: 51,19%).

Los nucleolos teñidos en el núcleo interfásico se analizaron en 5 individuos, examinándose de 105 a 120 núcleos en cada uno. El número de nucleolos observado oscila entre un mínimo de uno y un máximo de cinco. La frecuencia de nucleolos por núcleo y el número medio de nucleolos por individuo se detalla en la **tabla 11**; las proporciones más

elevadas corresponden a uno o dos nucleolos y el número medio está comprendido entre 1,50 y 2,03.

3.1.3.4. HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

Se sometieron 39 preparaciones cromosómicas de diferentes individuos a la técnica de bandas C. Independientemente del tiempo de incubación en hidróxido de bario (de 1 a 5 minutos), pocas metafases responden al tratamiento. En 14 metafases obtenidas de 5 individuos, varios cromosomas submetacéntricos y subtelocéntricos muestran bandas C centroméricas, pero estos cromosomas varían de unas células a otras. En 10 de ellas se diferenciaron bandas C teloméricas en uno o dos cromosomas subtelocéntricos, y en 8 se observaron en los telómeros de uno de los brazos de un cromosoma metacéntrico (véase una metafase en la **figura 15**). Ambos tipos de cromosomas se corresponden con los portadores de organizadores nucleolares. Uno de los cromosomas metacéntricos más grande muestra un bloque teñido de heterocromatina constitutiva intersticial en 8 metafases.

3.1.4. *PERNA PERNA*

3.1.4.1. NUMERO DE CROMOSOMAS

Se contaron los cromosomas de 62 metafases de 4 individuos, observándose 28 cromosomas en 55 metafases, 27 en 5 y 26 en 2. La dotación diploide de estos individuos corresponde por tanto a $2n = 28$ y la proporción de células aneuploides al 11,29%. Esta dotación cromosómica confirma las observaciones realizadas por Ahmed (1974) y Jacobi et al. (1990) en individuos de otras poblaciones.

3.1.4.2. MORFOLOGIA CROMOSOMICA Y CARIOTIPO

Se examinaron 24 cariotipos, de 4 individuos, y se midieron los cromosomas de 10 de ellos, siendo la longitud absoluta media del complemento diploide de $198,32 \mu\text{m}$ ($DT = 30,73$). En la **tabla 12** se especifican, para cada par cromosómico, los valores de las medias y desviaciones típicas de la longitud relativa, "arm ratio" e índice centromérico, así como la clasificación resultante. La longitud relativa está comprendida entre el 10,77% y el 4,84%, representando el último par menos de la mitad de la longitud del primero; la mayor diferencia de

tamaño entre pares consecutivos se observa entre los pares 1 y 2. Los 14 pares cromosómicos se clasifican en metacéntricos, pares 1, 2, 12 y 14, submetacéntricos, pares 3 y 11, subtelocéntricos, pares 5, 8, 10 y 13, y telocéntricos, pares 4, 6, 7 y 9. El número fundamental correspondiente a esta clasificación es 40. Considerando el intervalo de confianza de la media de los índices centroméricos o de los "arm ratios", el par 8 puede clasificarse como subtelocéntrico-submetacéntrico y el par 4 como telocéntrico-subtelocéntrico. En este caso el número fundamental puede oscilar entre 40 y 42. La dotación haploide se representa por tipos morfológicos en la **figura 16** y el cariotipo, organizado por tamaño decreciente, en la **figura 17 A**.

3.1.4.3. REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Los cromosomas NOR se analizaron en 25 metafases de 4 individuos, tificándose todas ellas con Giemsa antes de someterse a la tinción con nitrato de plata (véase una metafase en la **figura 18**). En esta especie las metafases se analizaron sin separar los individuos y del total de metafases 22 muestran dos Ag-NORs y las 3 restantes un Ag-NOR. En todas las células los Ag-NORs se localizaron terminalmente en el brazo corto del par 4 (telocéntrico-subtelocéntrico). El único par cromosómico portador de organizadores nucleolares muestra, por tanto, Ag-NORs en homocigosis en la mayoría de la células. En la **figura 17 B** se presenta un cariotipo con los dos Ag-NORs teñidos simultáneamente.

Los nucleolos teñidos con plata en el núcleo interfásico se contaron en un total de 561 células, el 72,19% de los núcleos muestran un nucleolo y el 27,81% muestran dos.

Par cromos.	Long. relativa		Arm ratio		Índice centromérico		Clasificación
	M	DT	M	DT	M	DT	
1	9,68	0,22	0,73	0,04	41,98	1,42	m
2	8,46	0,31	0,79	0,10	43,64	2,72	m
3	8,38	0,57	0,32	0,06	24,07	3,39	st-sm
4	7,79	0,33	0,80	0,07	44,36	2,33	m
5	7,55	0,31	0,28	0,06	21,96	3,23	st
6	7,32	0,28	0,28	0,07	21,80	4,07	st
7	7,32	0,33	0,80	0,05	44,34	1,49	m
8	6,82	0,29	0,31	0,08	23,52	4,26	st-sm
9	6,62	0,35	0,83	0,07	45,18	2,20	m
10	6,58	0,17	0,31	0,05	23,21	2,75	st-sm
11	6,46	0,29	0,31	0,07	23,10	4,24	st-sm
12	6,07	0,28	0,36	0,06	25,96	3,26	sm-st
13	5,79	0,35	0,37	0,08	26,85	4,29	sm-st
14	5,16	0,36	0,37	0,07	26,71	3,47	sm-st

Tabla 3.- Longitud relativa "arm ratio", índice centromérico y clasificación de cada par cromosómico de *M. galloprovincialis*.

M: media; DT: desviación típica

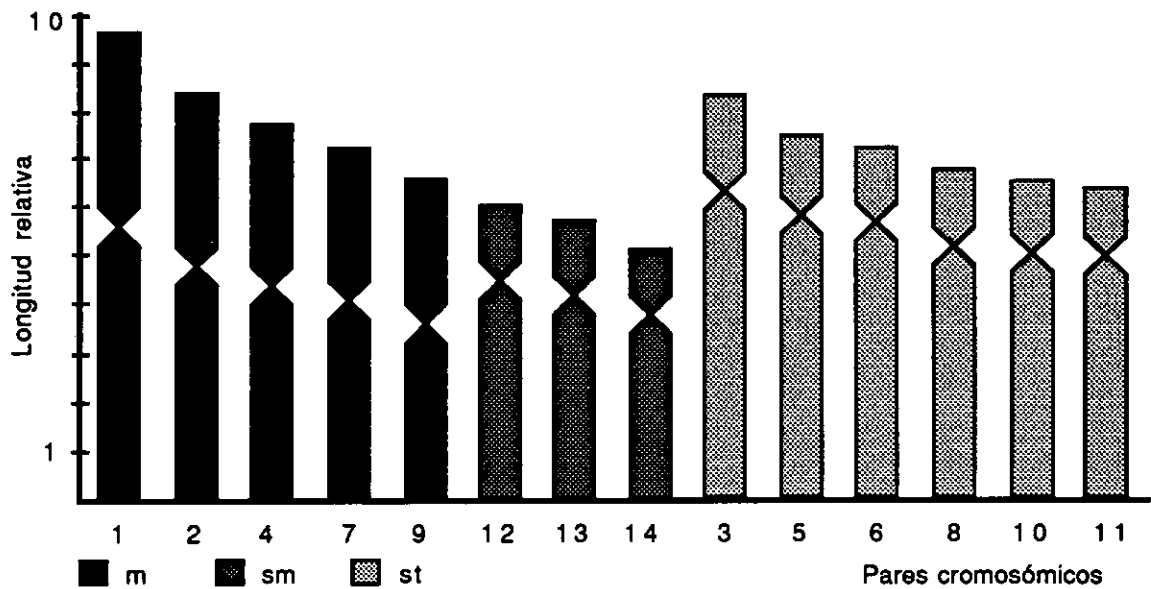


Figura 2.- Idiograma representativo del cariotipo de *M. galloprovincialis*, elaborado a partir de los valores de la longitud relativa e índice centromérico de cada par cromosómico.

Figura 3.- Cariotipos de *M. galloprovincialis*. **A** Cariotipo estándar Giemsa. **B-D** Ejemplos de cariotipos Ag-NOR; véase un Ag-NOR en los pares 6 y 10 (**B**), dos Ag-NORs en el par 6 y uno en el par 10 (**C**), dos Ag-NORs en los pares 6 y 10 (**D**). Barra = 5 μ m

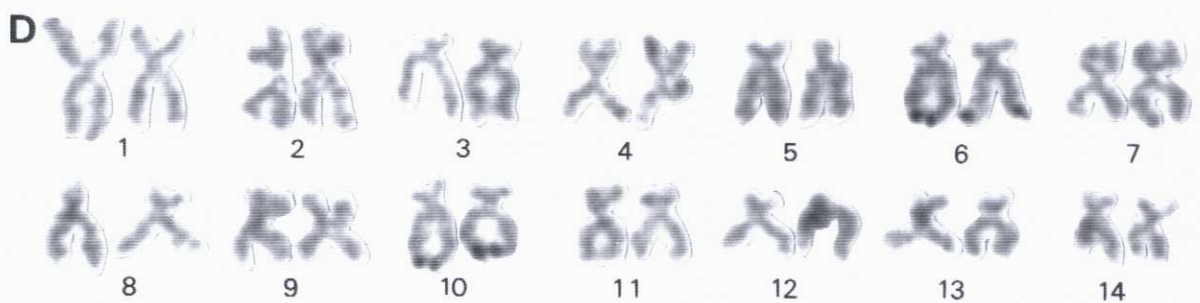
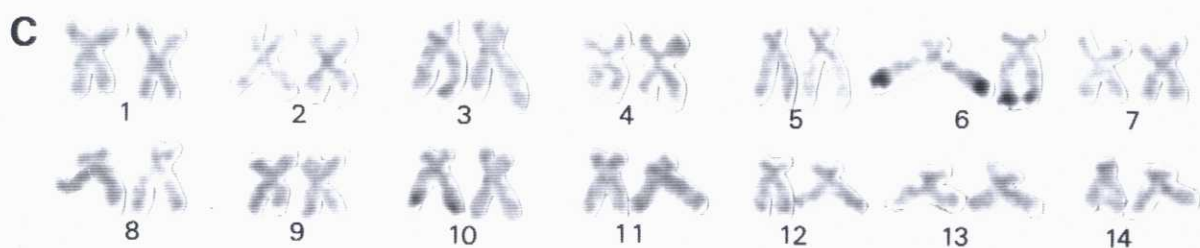
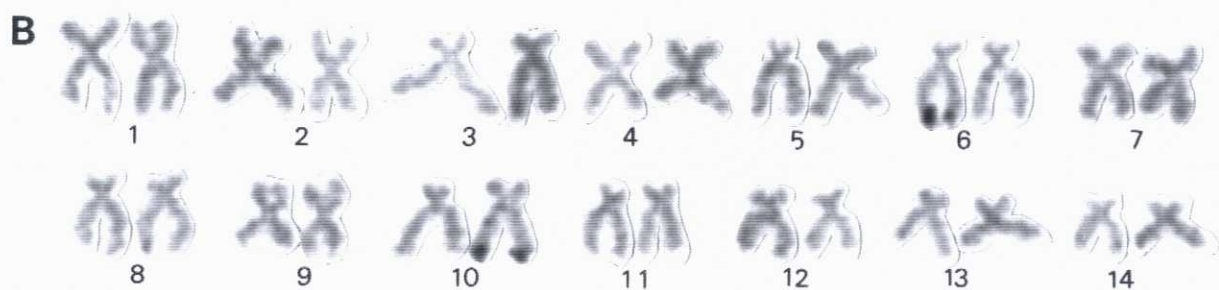
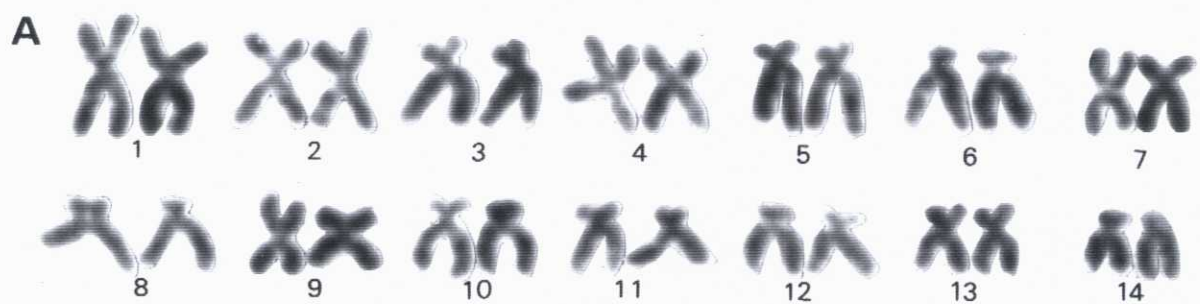
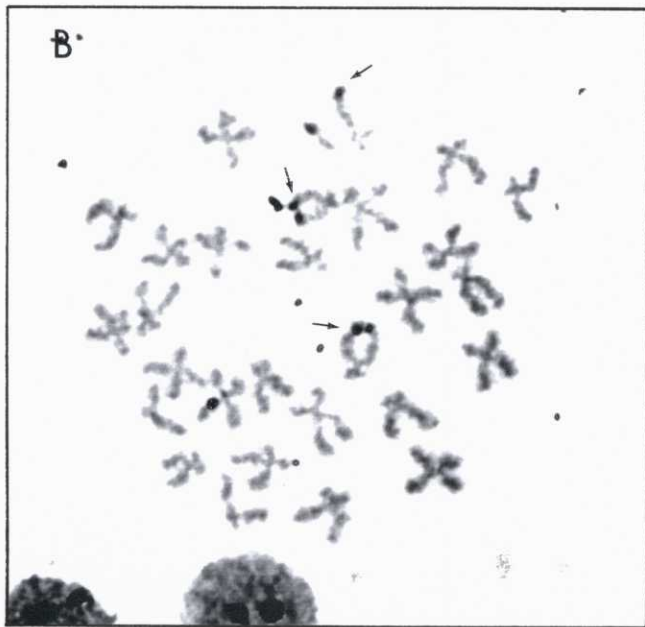
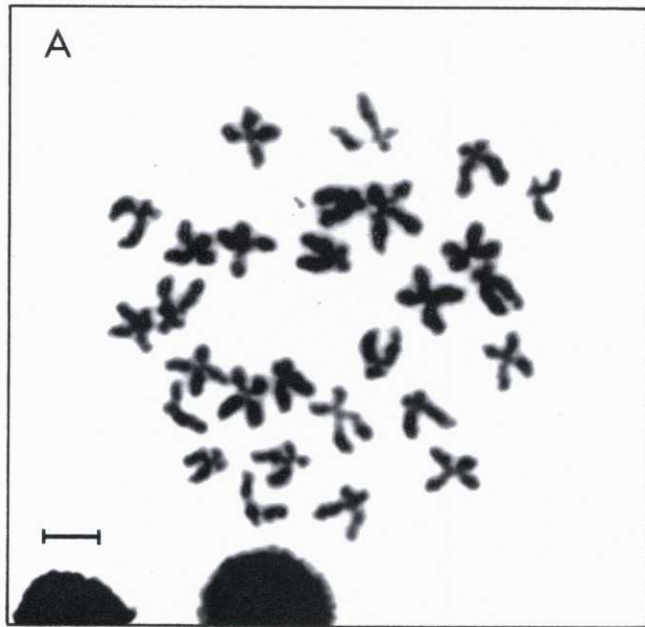


Figura 4.- Metafase mitótica de *M. gallopovincialis*. **A** Teñida con Giemsa. **B** Misma metafase teñida con nitrato de plata. Las flechas indican los cromosomas Ag-NOR. Barra = 5 μ m



Distribución Ag-NORs/célula		Nº de células examinadas	Porcentaje
par 6	par 10		
1	—	6	8,45
—	1	—	—
1	1	10	14,08
2	—	14	19,72
—	2	5	7,04
2	1	12	16,90
1	2	8	11,27
2	2	16	22,54

Tabla 4.- Distribución de los Ag-NORs en el total de células examinadas de *M. galloprovincialis*.

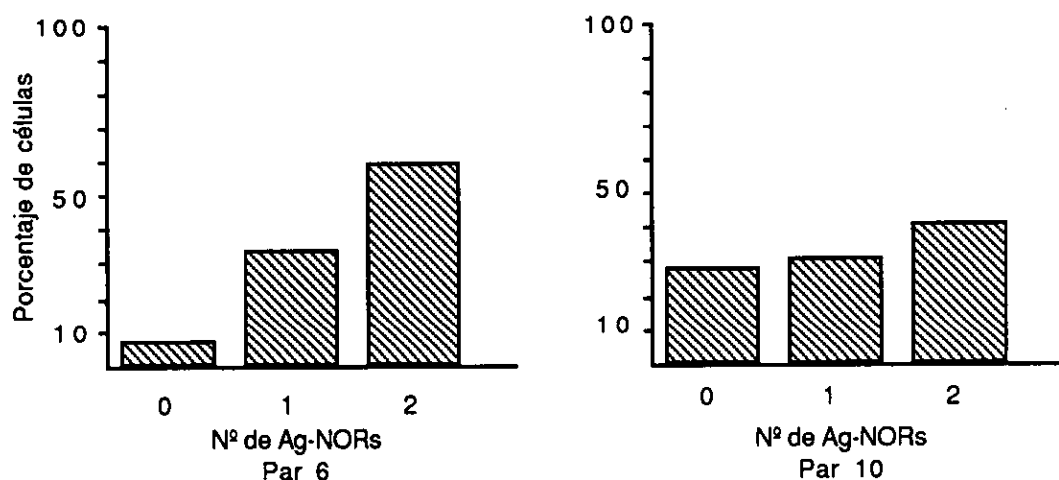


Figura 5.- Proporción de células examinadas de *M. galloprovincialis* con cero, uno o dos Ag-NORs en cada par portador.

Individuos	Frecuencia (%) de nucleolos/núcleo				Total núcleos	M
	1	2	3	4		
1	38,10	37,14	16,19	8,57	105	1,95
2	25,46	36,36	30,00	8,18	110	2,20
3	11,88	42,58	33,66	11,88	101	2,45
4	34,51	40,71	17,70	7,08	113	1,97
5	54,00	44,00	2,00	—	100	1,48
6	11,32	36,79	31,13	20,76	106	2,61
7	12,87	45,55	24,75	16,83	101	2,45
8	17,65	41,18	32,35	8,82	102	2,32

Tabla 5.- Frecuencia de nucleolos por núcleo y número medio de nucleolos por individuo (M) en *M. galloprovincialis*.

Par cromos.	Long. relativa		Arm ratio		Índice centromérico		Clasificación
	M	DT	M	DT	M	DT	
1	9,62	0,61	0,79	0,05	43,97	1,72	m
2	8,31	0,28	0,69	0,06	40,65	2,07	m
3	8,26	0,34	0,29	0,04	22,38	2,55	st
4	7,63	0,29	0,31	0,06	23,73	3,42	st-sm
5	7,56	0,27	0,80	0,06	44,42	1,78	m
6	7,40	0,24	0,80	0,07	44,14	2,09	m
7	7,16	0,27	0,19	0,07	15,70	4,68	st-t
8	7,07	0,21	0,78	0,05	43,78	1,63	m
9	6,88	0,27	0,30	0,08	22,94	4,26	st-sm
10	6,75	0,35	0,33	0,06	24,47	3,19	st-sm
11	6,25	0,20	0,35	0,05	25,46	2,88	sm-st
12	6,11	0,17	0,77	0,07	43,45	2,11	m
13	5,85	0,33	0,30	0,05	23,14	2,67	st-sm
14	5,17	0,22	0,33	0,05	24,85	3,13	st-sm

Tabla 6.- Longitud relativa "arm ratio", índice centromérico y clasificación de cada par cromosómico de *M. edulis*.

M: media; DT: desviación típica

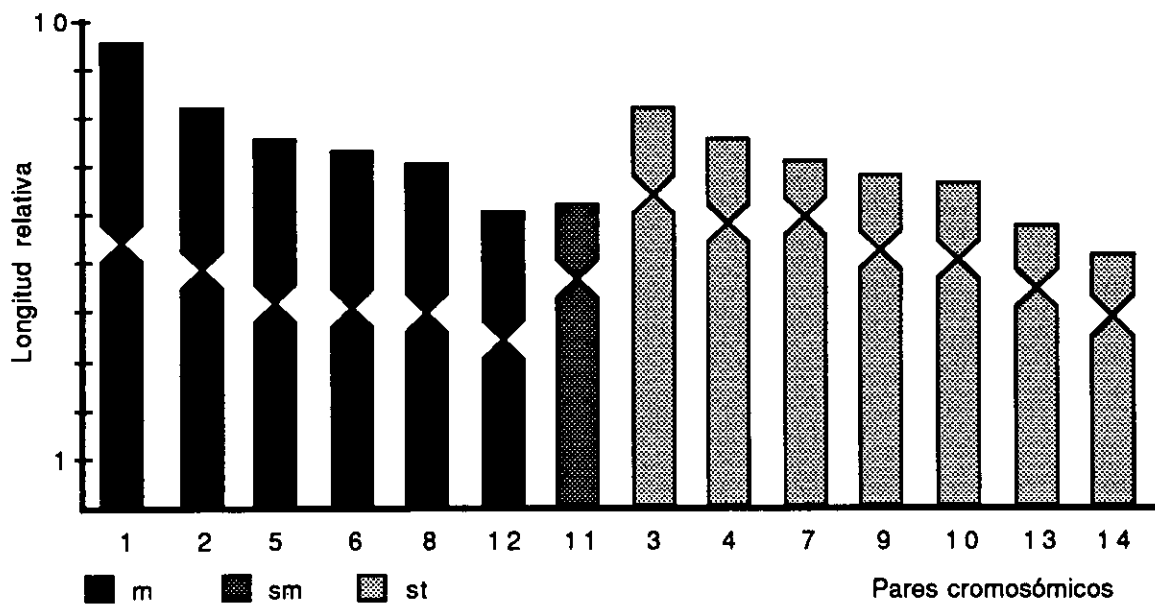


Figura 6.- Idiograma representativo del cariotipo de *M. edulis*, elaborado a partir de los valores de la longitud relativa e índice centromérico de cada par cromosómico.

Figura 7.- Cariotipos de *M. edulis*. **A** Cariotipo estándar Giemsa. **B-D** Ejemplos de cariotipos Ag-NORs; véase un Ag-NOR en los pares 4 y 10 (**B**), dos Ag-NORs en el par 4 y uno en el par 10 (**C**), dos Ag-NORs en los pares 4 y 10 (**D**). Barra = 5 μ m

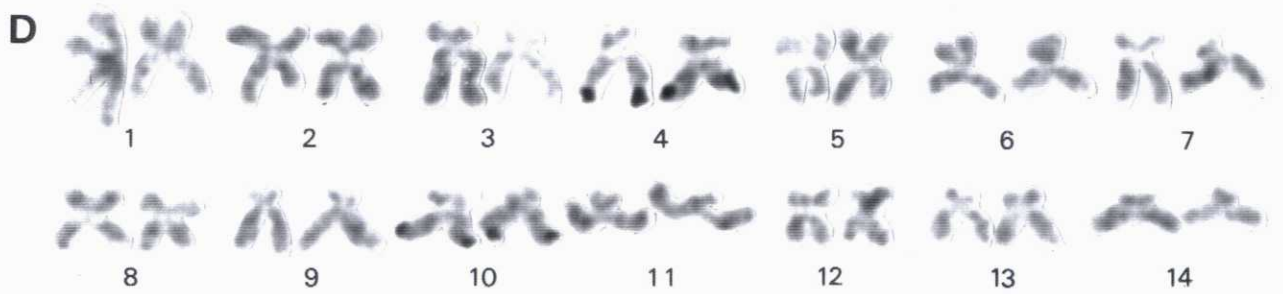
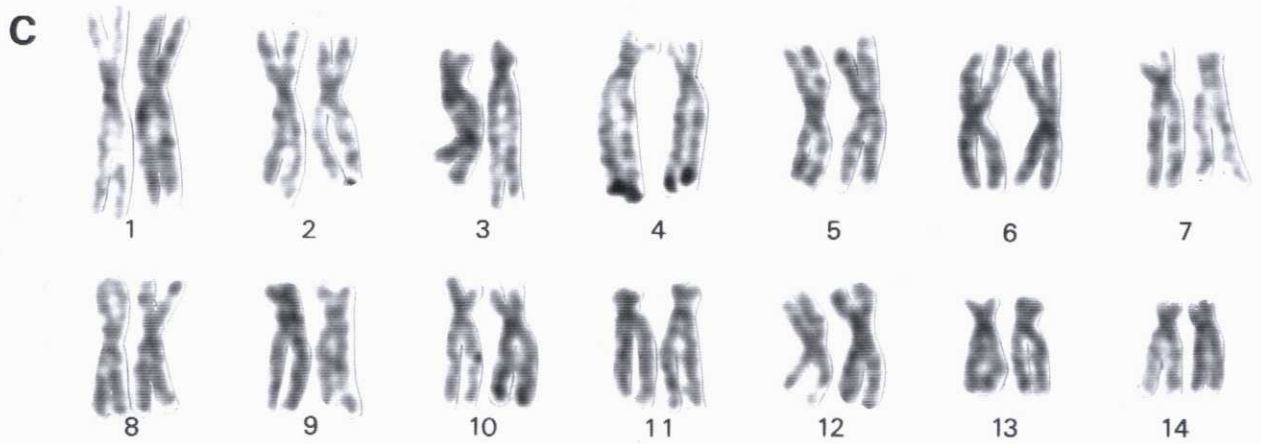
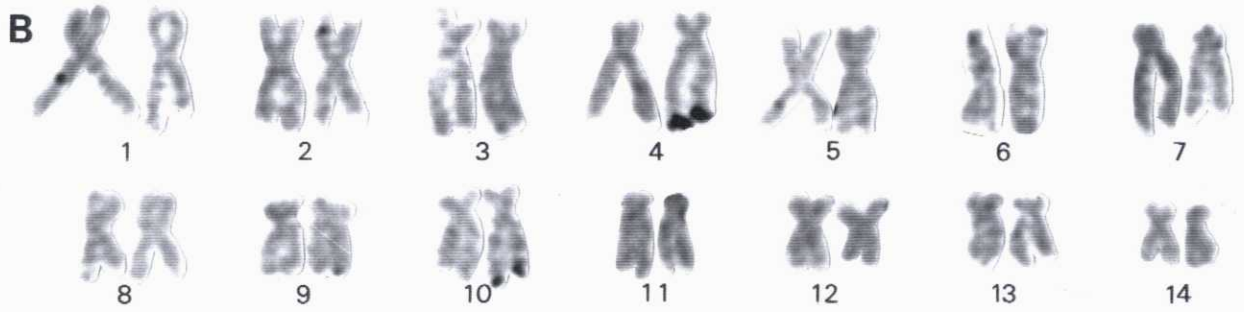
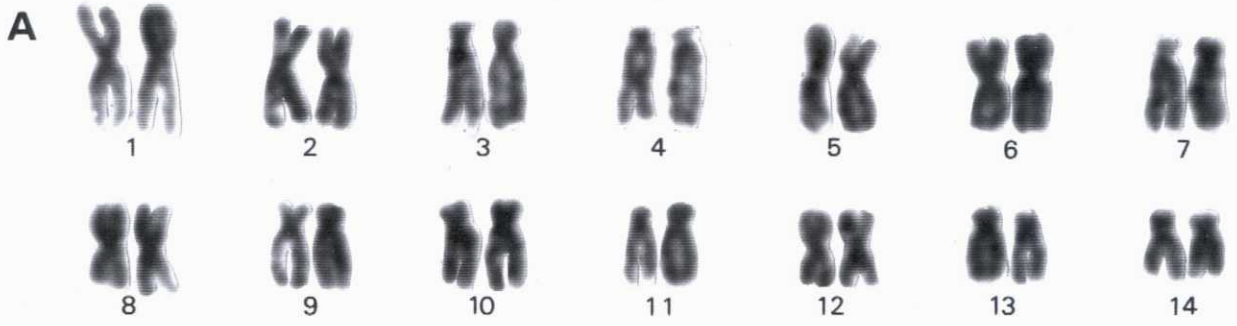
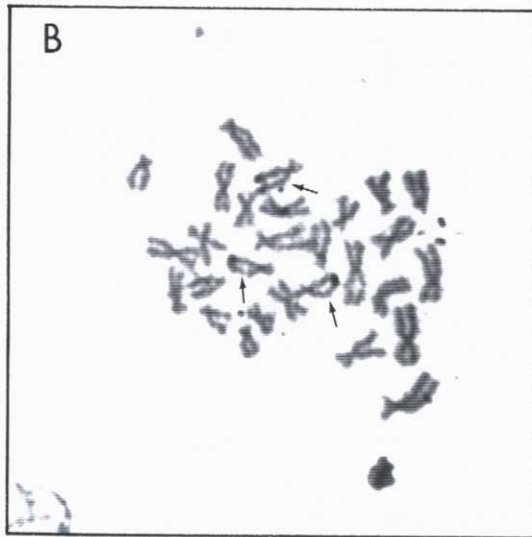
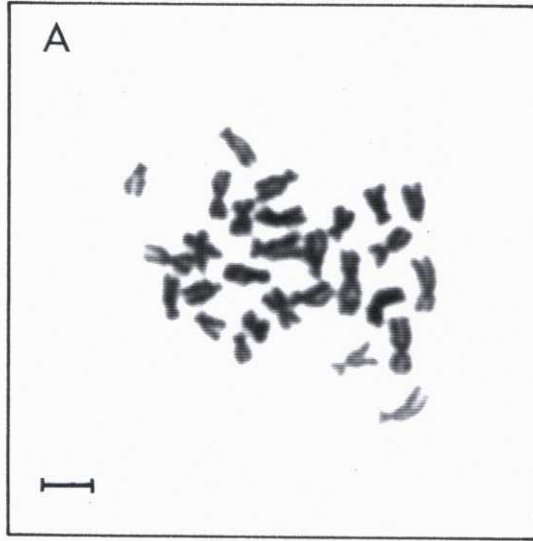


Figura 8.- Metafase mitótica de *M. edulis*. **A** Teñida con Giemsa. **B** Misma metafase teñida con nitrato de plata. Las flechas indican los cromosomas Ag-NOR. Barra = 5 μ m



Distribución Ag-NORs/célula		Nº de células examinadas	Porcentaje
par 4	par 10		
1	-	10	13,70
-	1	1	1,37
1	1	15	20,54
2	-	8	10,96
-	2	5	6,85
2	1	14	19,18
1	2	7	9,59
2	2	13	17,81

Tabla 7.- Distribución de los Ag-NORs en el total de células examinadas de *M. edulis*.

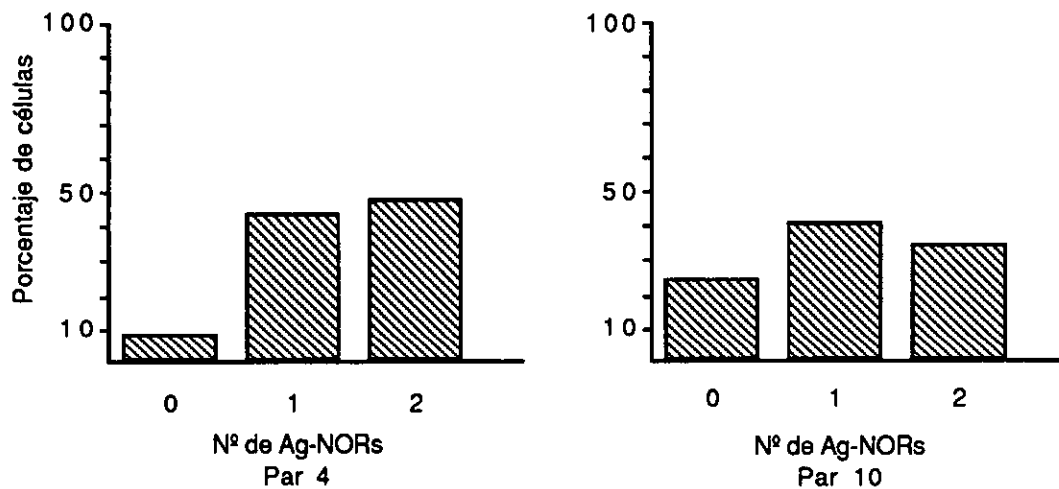
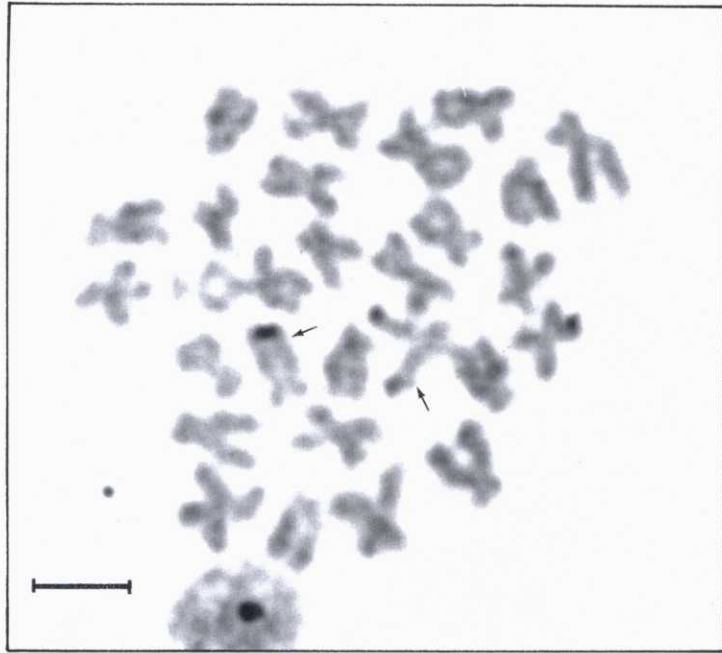


Figura 9.- Proporción de células examinadas de *M. edulis* con cero, uno o dos Ag-NORs en cada par portador.

Individuos	Frecuencia (%) de nucleolos/núcleo				Total núcleos	M
	1	2	3	4		
1	53,77	22,64	18,87	4,72	106	1,75
2	39,25	42,99	15,89	1,87	107	1,80
3	30,10	35,92	24,27	9,71	103	2,14
4	50,49	35,92	11,65	1,94	103	1,65
5	34,95	44,66	17,48	2,91	103	1,88
6	50,49	33,01	14,56	1,94	103	1,68
7	45,00	39,00	13,00	3,00	100	1,74
8	26,92	39,42	21,16	12,50	104	2,19

Tabla 8.- Frecuencia de nucleolos por núcleo y número medio de nucleolos por individuo (M) en *M. edulis*.

Figura 10.- Metafase mitótica de *M. edulis* sometida al tratamiento de bandas C. Las flechas indican bloques de heterocromatina constitutiva localizada en la misma posición que los Ag-NORs. Barra = 5 μ m



Par cromos.	Long. relativa		Arm ratio		Índice centromérico		Clasificación
	M	DT	M	DT	M	DT	
1	9,78	0,48	0,80	0,07	44,27	2,16	m
2	7,95	0,29	0,75	0,07	42,81	2,47	m
3	7,78	0,33	0,36	0,06	26,06	2,97	sm-st
4	7,66	0,47	0,29	0,05	22,44	3,12	st
5	7,50	0,27	0,24	0,05	19,02	3,15	st
6	7,45	0,16	0,76	0,06	42,95	2,03	m
7	7,18	0,25	0,72	0,04	41,74	1,36	m
8	6,94	0,24	0,23	0,04	18,28	2,46	st
9	6,75	0,24	0,72	0,07	41,53	2,44	m
10	6,66	0,29	0,28	0,05	21,99	2,81	st
11	6,53	0,25	0,39	0,07	27,96	3,70	sm
12	6,21	0,39	0,29	0,05	22,12	2,96	st
13	5,85	0,49	0,72	0,10	41,40	3,88	m
14	5,76	0,42	0,32	0,09	24,12	4,85	st-sm

Tabla 9.- Longitud relativa "arm ratio", Índice centromérico y clasificación de cada par cromosómico de *M. trossulus*.

M: media; DT: desviación típica

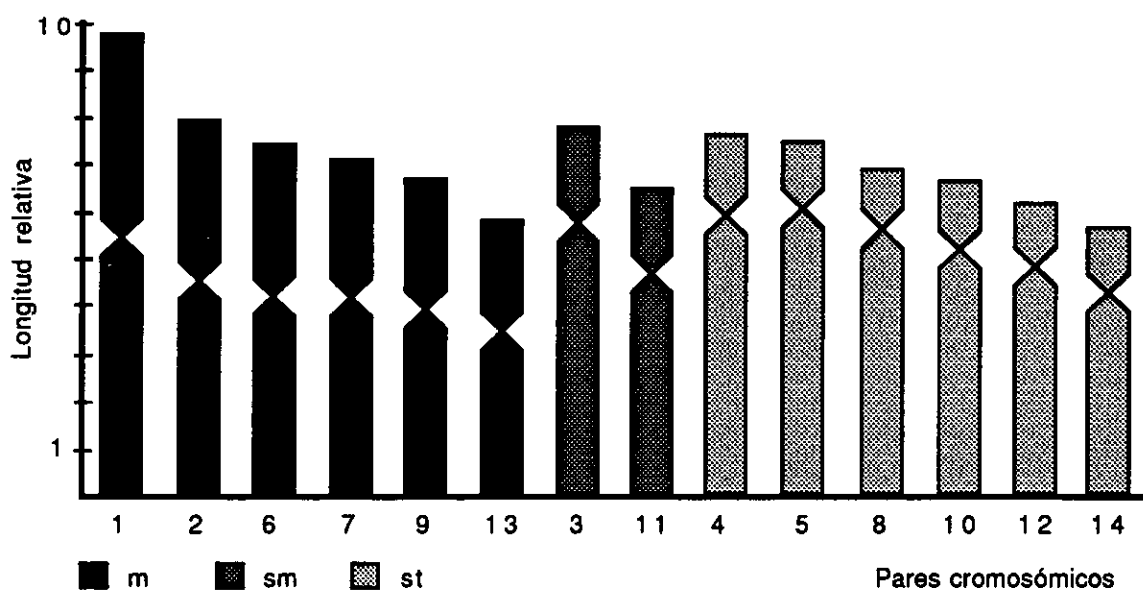


Figura 11.- Idiograma representativo del cariotipo de *M. trossulus*, elaborado a partir de los valores de la longitud relativa e índice centromérico de cada par cromosómico.

Figura 12.- Cariotipos de *M. trossulus*. **A** Cariotipo estándar Giemsa. **B-D** Ejemplos de cariotipos Ag-NORs; véase un Ag-NOR en el par 4 (**B**), dos Ag-NORs en el par 4 y uno en el par 7 (**C**), dos Ag-NORs en los pares 4 y 7 y uno en el par 10 (**D**). Barra = 5 μ m

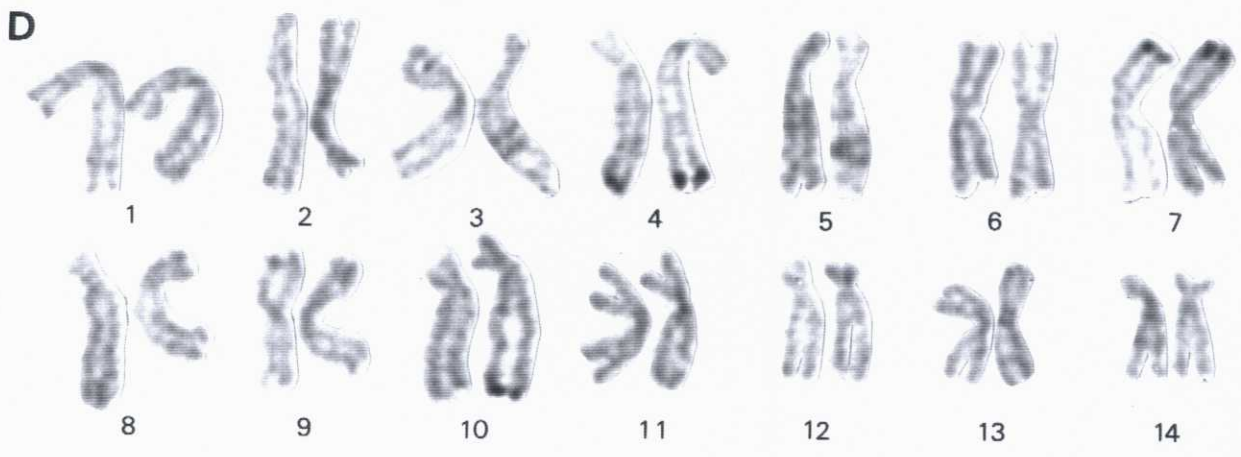
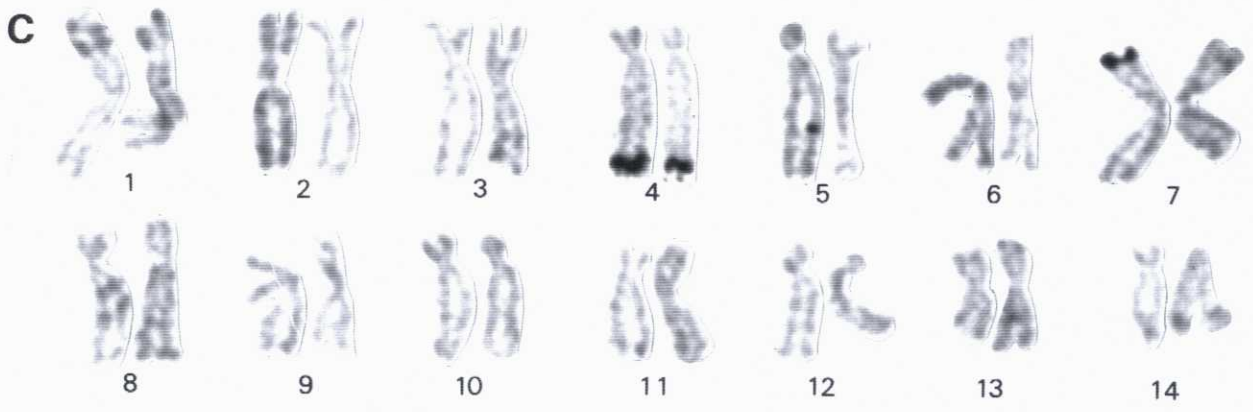
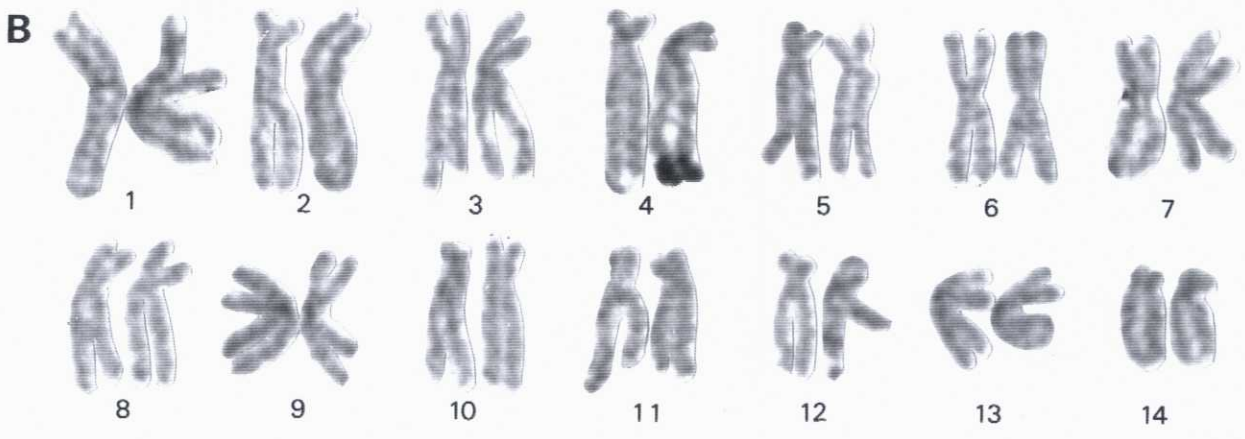
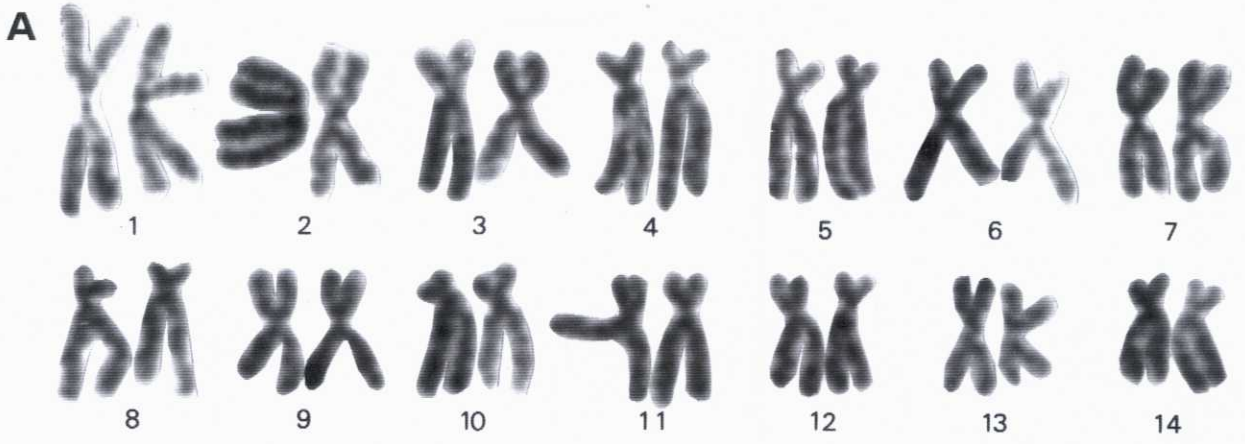
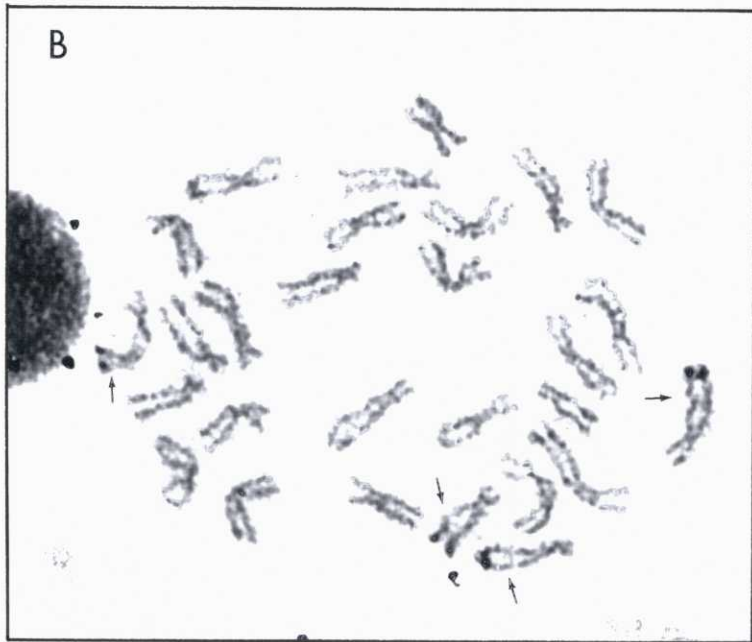


Figura 13.- Metafase mitótica de *M. trossulus*. **A** Teñida con Giemsa. **B** Misma metafase teñida con nitrato de plata. Las flechas indican los cromosomas Ag-NOR. Barra = 5 μ m



par 4	Distribución Ag-NORs/célula		Nº de células examinadas	Porcentaje
	par 10	par 7		
1	-	-	12.00	14.29
-	1	-	1.00	1.19
-	-	1	1.00	1.19
1	1	-	11.00	13.1
1	-	1	3.00	3.57
-	1	1	-	-
2	-	-	5.00	5.95
-	2	-	2.00	2.38
-	-	2	-	-
1	1	1	8.00	9.53
2	1	-	5.00	5.95
1	2	-	5.00	5.95
2	-	1	5.00	5.95
1	-	2	-	-
-	2	1	2.00	2.38
-	1	2	1.00	1.19
2	2	-	2.00	2.38
2	-	2	1.00	1.19
-	2	2	1.00	1.19
2	1	1	4.00	4.76
1	2	1	7.00	8.34
1	1	2	2.00	2.38
2	2	1	-	-
2	1	2	5.00	5.95
1	2	2	1.00	1.19

Tabla 10.- Distribución de los Ag-NORs en el total de células examinadas de *M. trossulus*.

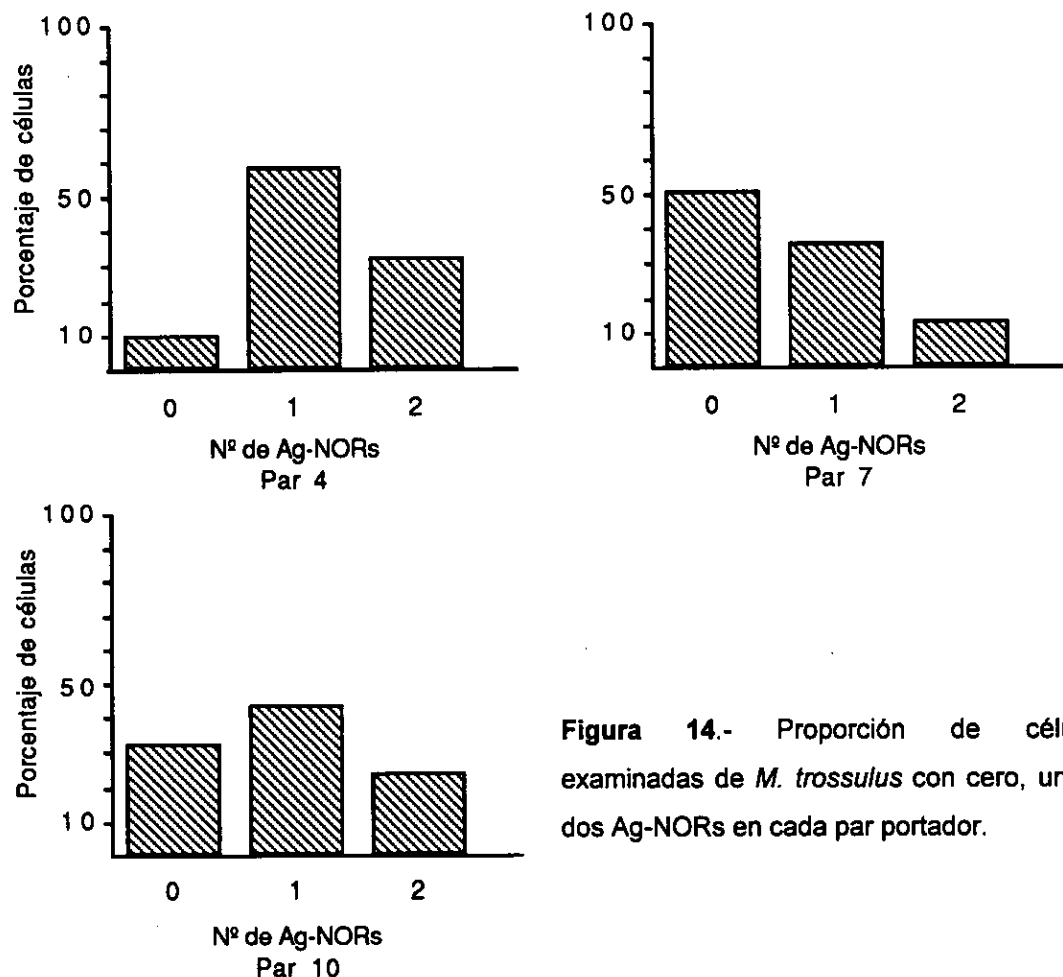


Figura 14.- Proporción de células examinadas de *M. trossulus* con cero, uno o dos Ag-NORs en cada par portador.

Individuos	Frecuencia (%) de nucleolos/núcleo					Total núcleos	M
	1	2	3	4	5		
1	41,67	37,5	17,5	3,33	-	120	1,83
2	29,09	47,27	17,27	4,55	1,82	110	2,03
3	52,29	33,95	9,17	4,54	-	109	1,66
4	46,67	33,33	15,24	3,81	0,95	105	1,81
5	58,88	32,71	8,41	-	-	107	1,50

Tabla 11.- Frecuencia de nucleolos por núcleo y número medio de nucleolos por individuo (M) en *M. trossulus*.

Figura 15.- Metafase mitótica de *M. trossulus* sometida al tratamiento de bandas C. Las flechas indican bloques de heterocromatina constitutiva localizada en la misma posición que los Ag-NORs. Barra = 5 μ m



Par cromos.	Long. relativa		Arm ratio		Indice centromérico		Clasificación
	M	DT	M	DT	M	DT	
1	10,77	0,61	0,72	0,06	41,52	2,06	m
2	9,17	0,41	0,75	0,09	42,73	3,01	m
3	8,71	0,42	0,38	0,07	27,25	3,67	sm
4	8,13	0,49	0,14	0,04	12,31	3,23	t-st
5	7,64	0,41	0,22	0,05	18,07	3,17	st
6	7,48	0,47	0,11	0,05	9,90	3,83	t
7	6,84	0,30	0,11	0,04	10,07	3,58	t
8	6,84	0,39	0,32	0,06	24,15	3,50	st-sm
9	6,54	0,26	0,10	0,03	8,70	2,71	t
10	6,43	0,30	0,27	0,09	20,78	5,26	st
11	5,83	0,51	0,38	0,08	27,10	3,90	sm
12	5,69	0,27	0,73	0,07	41,87	2,41	m
13	5,08	0,22	0,29	0,06	22,43	3,73	st
14	4,84	0,20	0,73	0,05	42,08	1,69	m

Tabla 12.- Longitud relativa "arm ratio", índice centromérico y clasificación de cada par cromosómico de *P. perna*.

M: media; DT: desviación típica

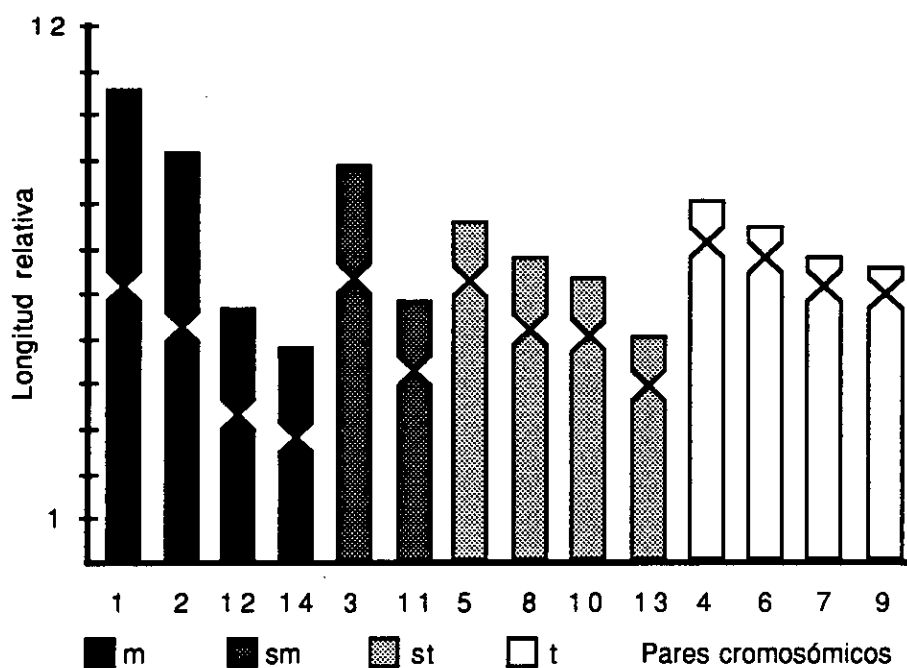
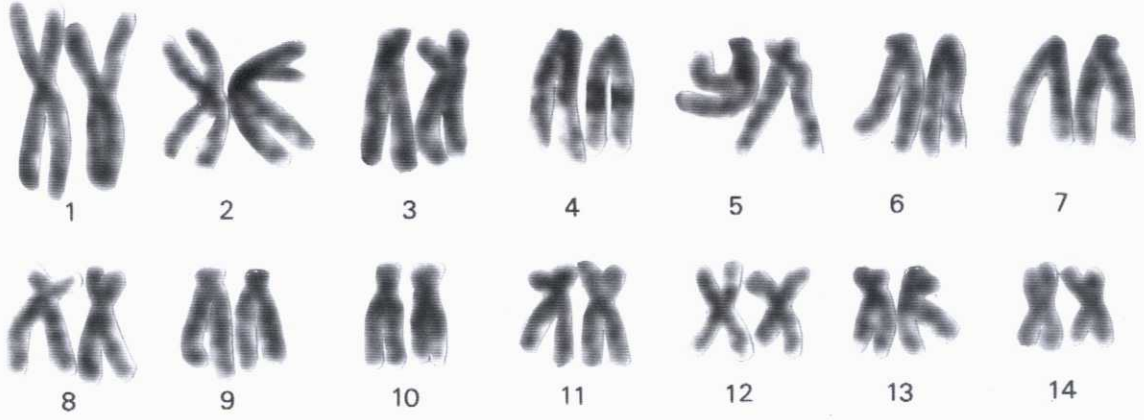


Figura 16.- Idiograma representativo del cariotipo de *P. perna*, elaborado a partir de los valores de la longitud relativa e índice centromérico de cada par cromosómico.

Figura 17.- Cariotipos de *P. perna*. **A** Cariotipo estándar Giemsa. **B** Cariotipo Ag-NOR, véase dos Ag-NORs en el par 4. Barra = 5 μ m

A



B

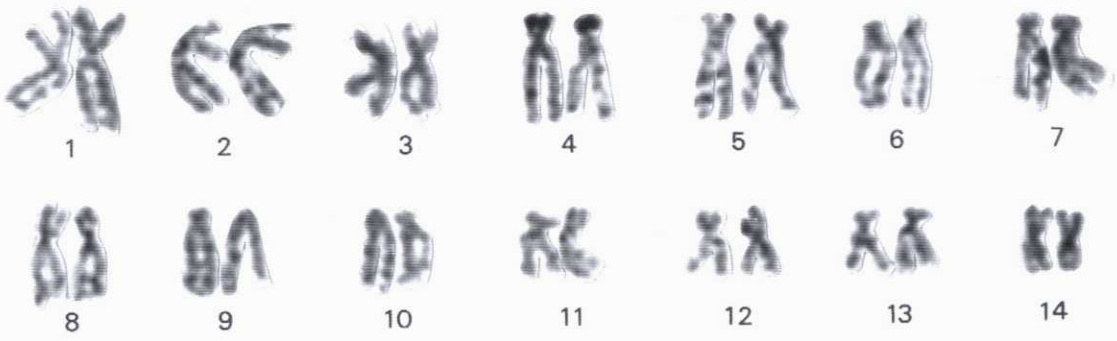
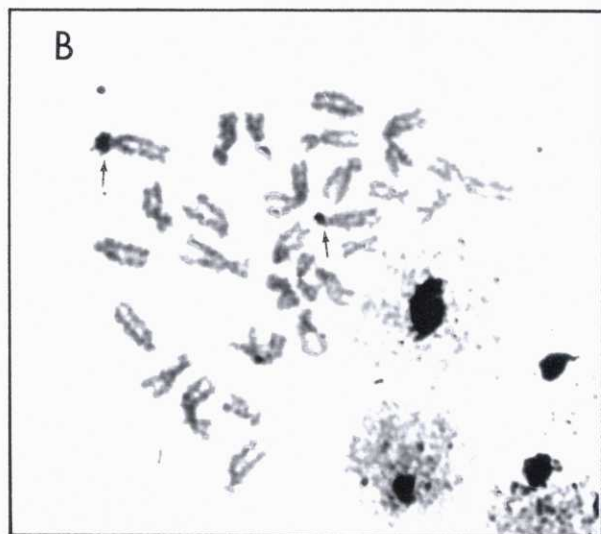
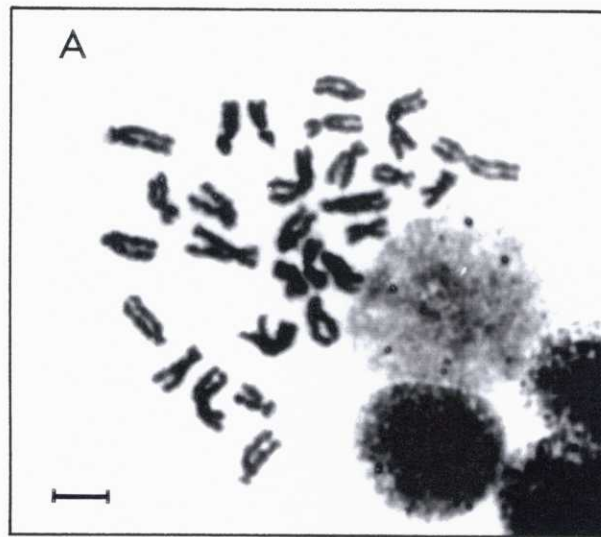


Figura 18.- Metafase mitótica de *P. perna*. **A** Teñida con Giemsa. **B** Misma metafase teñida con nitrato de plata. Las flechas indican los cromosomas Ag-NOR. Barra = 5 μ m



3.2. FAMILIA OSTREIDAE

3.2.1. CRASSOSTREA GIGAS

El número de cromosomas de esta especie, $2n = 20$, fue determinado por Ahmed y Sparks (1967) y confirmado por otros autores en distintas poblaciones (Longwell et al., 1967; Menzel, 1968a; Ahmed, 1973; Nadamitsu y Shinkawa, 1973; Ieyama e Inaba, 1974; Thiriot-Quévieux y Ayraud, 1982).

Entre los 176 individuos utilizados en este trabajo se encontró uno triploide, véase una metafase diploide ($2n = 20$) y una triploide ($3n = 30$) en la **figura 19**.

El cariotipo fue elaborado por Thiriot-Quévieux (1984c) de acuerdo con las medidas de los cromosomas y, según su descripción, los 10 pares cromosómicos se clasifican como metacéntricos.

3.2.1.1. REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Se analizaron 91 metafases teñidas con nitrato de plata de un total de 18 individuos, oscilando entre 1 y 11 las metafases de cada uno. Del total de metafases, 29 proceden de 7 individuos tratados *in vivo* con BrdU; la sustitución de la timidina por este análogo no interfiere la coloración específica de los NORs y provoca un aumento del tamaño de los cromosomas que facilita su diferenciación. El número de Ag-NORs oscila entre uno y dos, observándose 85 metafases con dos Ag-NORs y 6 con un único Ag-NOR. Más de la mitad de los individuos presentan en algunas células Ag-NORs de distinto tamaño (Ag-NORs heteromórficos). En todos los casos se localizaron terminalmente en uno de los brazos del par 10 (metacéntrico), asignándose arbitrariamente al brazo "largo". En la **figura 20 A,B** se muestran dos cariotipos con dos Ag-NORs de igual y distinto tamaño. El único par portador de organizadores nucleolares manifiesta una proporción elevada de Ag-NORs en homocigosis (93,40%) y baja en heterocigosis (6,60%).

La tinción de los nucleolos en el núcleo interfásico se analizó en 5 individuos, examinándose de 113 a 124 núcleos en cada uno. Los nucleolos teñidos varían de uno a dos en todos los individuos. La frecuencia de nucleolos por núcleo y el número medio de nucleolos por individuo se detalla en la **tabla 13**; las frecuencias más altas corresponden a uno o dos nucleolos y el número medio está comprendido entre 1,47 y 1,56.

3.2.1.2. HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

Se sometieron 50 preparaciones cromosómicas de diferentes individuos a la técnica de bandas C. La mayoría de las metafases muestran tinción pálida y homogénea; entre 15 y 30 segundos de incubación en el hidróxido de bario, 21 metafases de 8 individuos muestran bloques teñidos de heterocromatina constitutiva en un brazo de los cromosomas del par 10, correspondiendo éste con el par portador de organizadores nucleolares (véase una metafase en la **figura 21**). En 6 de las metafases se observó una banda C intersticial en un cromosoma de tamaño medio.

3.2.2. *OSTREA EDULIS*

La dotación cromosómica $2n = 20$ fue determinada por Longwell et al. (1967) y confirmada por otros autores en distintas poblaciones (Ahmed, 1973; Thiriote-Quévieux y Auraud, 1982; Thiriote-Quévieux, 1984c).

Como en el caso de *C. gigas*, se detectó un individuo triploide entre los 527 utilizados en el transcurso de este trabajo, véase una metafase diploide ($2n = 20$) y una triploide ($3n = 30$) en la **figura 22**.

Thiriote-Quévieux (1984c) analizó morfométricamente los cromosomas de esta especie; el cariotipo descrito comprende 5 pares metacéntricos y 5 submetacéntricos. Los cariotipos Ag-NOR se elaboraron de acuerdo con este modelo.

3.2.2.1. REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Se analizaron 79 metafases teñidas con nitrato de plata de un total de 22 individuos, variando entre 1 y 11 las metafases de cada uno. El número de Ag-NORs observados oscila entre uno y cuatro, detectándose diferencias inter e intraindividuales; así, en un individuo con 11 metafases analizadas se observó 1 con un Ag-NOR, 8 con dos Ag-NORs y 2 con tres Ag-NORs. Respecto al total de metafases, se contabilizaron 7 con un Ag-NOR, 54 con dos Ag-NORs, 12 con tres Ag-NORs y 6 con cuatro Ag-NORs. Estos se localizaron en los telómeros del brazo largo de los pares cromosómicos 9 y 10 (ambos submetacéntricos). En un individuo del que se examinaron 7 metafases se detectó un Ag-NOR adicional en los telómeros del brazo corto de un cromosoma del par 6 (submetacéntrico de mayor tamaño). La distribución de los Ag-NORs en las células analizadas se especifica en la **tabla 14**; los casos más frecuentes corresponden a la

presencia de dos Ag-NORs en el par 10 (36,71%) y a un Ag-NOR en los pares 9 y 10 (32,91%). Algunos de los cariotipos Ag-NORs observados se muestran en las **figuras 20 C,D y 23 A,B**. La frecuencia de Ag-NORs en cada par cromosómico se representa en la **figura 24**; en el par 9 el porcentaje de Ag-NORs en heterocigosis (39,24%) es muy superior al de homocigosis (13,92%) y la proporción de células sin Ag-NORs (46,84) supera los porcentajes anteriores; en el par 10, por el contrario, el porcentaje de Ag-NORs en homocigosis (50,63%) es ligeramente superior al de heterocigosis (44,31%) y la proporción de células sin Ag-NORs (5,06%) es relativamente pequeña.

La tinción de los nucleolos en el núcleo interfásico se analizó en 6 individuos, examinándose de 112 a 127 núcleos en cada uno. El número de nucleolos teñidos oscila entre uno y cuatro en todos los individuos analizados. La frecuencia de nucleolos por núcleo y el número medio de nucleolos por individuo se detalla en la **tabla 15**; la frecuencia más elevada corresponde a dos nucleolos y el número medio está comprendido entre 1,69 y 2,42.

3.2.2.2. HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

Se sometieron 349 preparaciones cromosómicas de diferentes individuos a la técnica de bandas C. La mayoría de las metafases muestran tinción homogénea, independientemente del tiempo de incubación en hidróxido de bario (de 30 segundos a 4 minutos). En 34 metafases, de 20 individuos, se observaron bloques teñidos de heterocromatina constitutiva centromérica en un número variable de cromosomas y los cromosomas bandeados en una metafase lo están raramente en otra. En la **figura 23 C** se muestra un cariotipo con bandas C centroméricas en todos los cromosomas pero este patrón no fue repetible en las células examinadas.

3.2.3. *OSTREA DENSELAMELLOSA*

3.2.3.1. NUMERO DE CROMOSOMAS

En 97 metafases de 29 individuos se observó la dotación cromosómica diploide de $2n = 20$, confirmando las observaciones realizadas por Ieyama e Inaba (1974) en individuos de otra población. Se contaron los cromosomas de 152 metafases de 4 individuos, observándose 127 con 20 cromosomas, 13 con 19, 4 con 18 y 8 con 17. La proporción de células aneuploides resultante es del 16,45%.

3.2.3.2. MORFOLOGIA CROMOSOMICA Y CARIOTIPO

Se examinaron 49 cariotipos, de 19 individuos, y se midieron los cromosomas en 10 de ellos, siendo la longitud absoluta media del complemento diploide de 147,67 μm (DT = 25,86). En la **tabla 16** se especifican, para cada par cromosómico, los valores de las medias y desviaciones típicas de la longitud relativa, "arm ratio" e Índice centromérico, así como la clasificación resultante de los cromosomas. La longitud relativa está comprendida entre el 13,67% y el 6,26%, representando el último par menos de la mitad de la longitud del primero. Los 10 pares cromosómicos se clasifican en metacéntricos, pares 1, 2, 3, 5, 7, 8 y 10, y submetacéntricos, pares 4, 6 y 9, no observándose ningún par subtelocéntrico o telocéntrico. El número fundamental que corresponde a esta clasificación es 40. La dotación haploide se representa por tipos morfológicos en la **figura 25** y el cariotipo, organizado por orden de tamaño decreciente, en la **figura 26 A**.

3.2.3.3. REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Se analizaron 152 metafases teñidas con nitrato de plata de un total de 53 individuos, variando entre 1 y 10 las metafases de cada uno. Del total de metafases, 39 se tiñeron previamente con Giemsa (véase una metafase en la **figura 27**). El número de Ag-NORs oscila entre uno y tres, detectándose diferencias inter e intraindividuales; así, en un individuo con 10 metafases se observó 1 con un Ag-NOR, 8 con dos Ag-NORs y 1 con tres Ag-NORs. Respecto al total de metafases, se contabilizaron 41 con un Ag-NOR, 92 con dos Ag-NORs y 19 con tres Ag-NORs. En todos los casos se localizaron en los telómeros de un brazo de los pares 3 y 8 (ambos metacéntricos), asignándose arbitrariamente al brazo "corto". La distribución de los Ag-NORs en las células analizadas se especifica en la **tabla 17**; el caso más frecuente corresponde a la presencia de un Ag-NOR en cada par portador (38,16%). Algunos de los cariotipos Ag-NORs se muestran en las **figuras 26 C y 28**. La frecuencia de los Ag-NORs en cada par portador se representa en la **figura 29**; en los dos pares la proporción de Ag-NORs en heterocigosis (par 3: 65,13%; par 8: 50,66%) es superior a la proporción en homocigosis (par 3: 25,66%; par 8: 9,21%), pero el porcentaje de células sin Ag-NORs en el par 3 es mucho más pequeño (9,21%) que el del par 8 (40,13%).

La tinción de los nucleolos en el núcleo interfásico se analizó en 6 individuos, examinándose de 101 a 107 núcleos en cada uno. El número de nucleolos teñidos oscila entre un mínimo de uno y un máximo de tres. La frecuencia de nucleolos por núcleo y el número

medio por individuo se detalla en la **tabla 18**; la proporción más elevada corresponde a uno o dos nucleolos y el número medio está comprendido entre 1,28 y 1,78.

3.2.3.4. HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

Se sometieron 30 preparaciones cromosómicas de diferentes individuos a la técnica de bandas C. Entre 1 y 4 minutos de incubación en el hidróxido de bario la mayoría de las metafases muestran tinción diferencial. Se analizaron 38 metafases de 13 individuos; los pares cromosómicos 6, 8, 9 y 10 presentan en todas ellas bloques teñidos de heterocromatina constitutiva centromérica (**figura 26 B**); los pares 2 y 5 presentan bloques idénticos en 11 y 7 metafases respectivamente. Los pares 3 y 8, portadores de organizadores nucleolares, y los pares 5, 6, 9 y 10 muestran bandas C teloméricas en algunas células.

3.2.4. *OSTREA PUELCHANA*

3.2.4.1. NUMERO DE CROMOSOMAS

La dotación cromosómica $2n = 20$ se observó en 70 metafases de 13 individuos. Se contaron los cromosomas de 263 metafases de 9 individuos, observándose 235 con 20 cromosomas, 19 con 19, 6 con 18 y 3 con 17, siendo la proporción de células aneuploides del 10,65%.

3.2.4.2. MORFOLOGIA CROMOSOMICA Y CARIOTIPO

Se examinaron 19 cariotipos, de 9 individuos, y se midieron los cromosomas de 10 de ellos, siendo la longitud absoluta media del complemento diploide de $146,20 \mu\text{m}$ ($DT= 16,32$). En la **tabla 19** se especifican, para cada par cromosómico, los valores de las medias y desviaciones típicas de la longitud relativa, "arm ratio" e índice centromérico, así como la clasificación de los cromosomas. La longitud relativa está comprendida entre el 13,96% y el 5,19%, el último par representa menos de la mitad de la longitud del primero y la mayor diferencia de tamaño se encuentra entre los pares 1 y 2 y entre 9 y 10. Los 10 pares de cromosomas se clasifican en metacéntricos, pares 1, 3, 6 y 8, en submetacéntricos, pares 2, 4, 5, 7 y 9, y telocéntrico, par 10. El número fundamental que corresponde a esta clasificación es

38. La dotación haploide se representa por tipos morfológicos en la **figura 30** y el cariotipo, organizado por orden de tamaño decreciente, en la **figura 31 A**.

3.2.4.3. REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Se analizaron 106 metafases teñidas con nitrato de plata de un total de 14 individuos, variando entre 1 y 24 las metafases de cada uno. Del total de metafases, 42 se tiñeron previamente con Giemsa (véase una metafase en la **figura 32**). El número de Ag-NORs oscila entre uno y tres, detectándose diferencias inter e intraindividuales; así, en un individuo, del que se analizaron 10 metafases, se observó 1 con un Ag-NOR, 4 con dos Ag-NORs y 5 con tres Ag-NORs. Respecto al total de metafases, se contabilizaron 35 con un Ag-NOR, 65 con dos Ag-NORs y 6 con tres Ag-NORs. Estos se localizaron siempre terminalmente en el brazo corto de los pares 2 y 4 (ambos subtelocéntricos). La distribución de los Ag-NORs en las células analizadas se especifica en la **tabla 20**; el caso más frecuente corresponde a la presencia de un Ag-NOR en cada uno de los pares portadores. Algunos de los cariotipos Ag-NORs observados se muestran en la **figura 31 B,C,D**. La frecuencia de Ag-NORs en cada par cromosómico se representa en la **figura 33**; en los dos pares la proporción de Ag-NORs en heterocigosis (par 2: 63,21%; par 4: 58,49%) es superior a la proporción en homocigosis (par 2: 16,98%; par 4: 8,49%), pero el porcentaje de células sin Ag-NORs en el par 2 (19,81%) es inferior al del par 4 (33,02%).

La tinción de los nucleolos en el núcleo interfásico se analizó en 5 individuos, examinándose de 103 a 106 núcleos en cada uno. El número de nucleolos teñidos oscila entre uno y cuatro, sin embargo, se encontraron cuatro nucleolos en un sólo individuo. La frecuencia de nucleolos por núcleo y el número medio de nucleolos por individuo se detalla en la **tabla 21**; las proporciones más elevadas corresponden a uno o dos nucleolos, y el número medio está comprendido entre 1,35 y 1,76.

Figura 19.- Metafases mitóticas de *C. gigas* teñidas con Giemsa. **A** Metafase normal $2n = 20$.
B Metafase triploide $3n = 30$. Barra = 5 μm

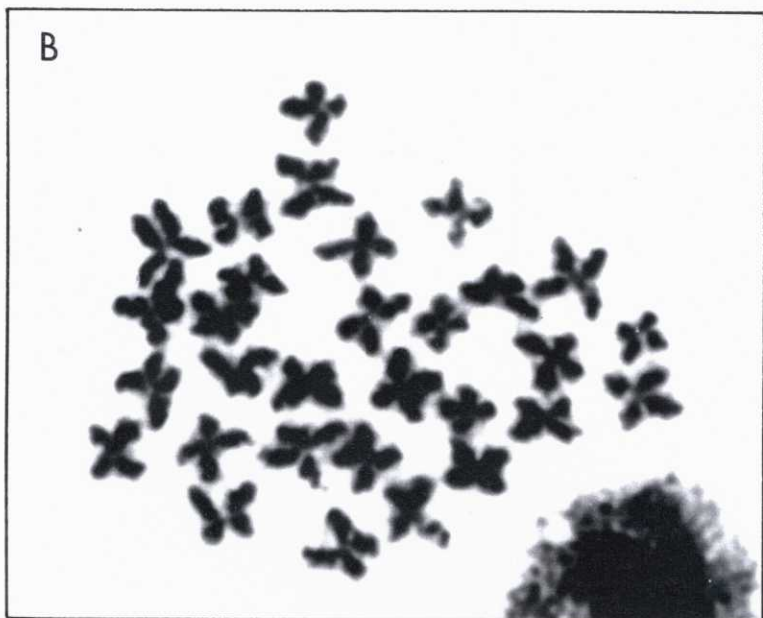
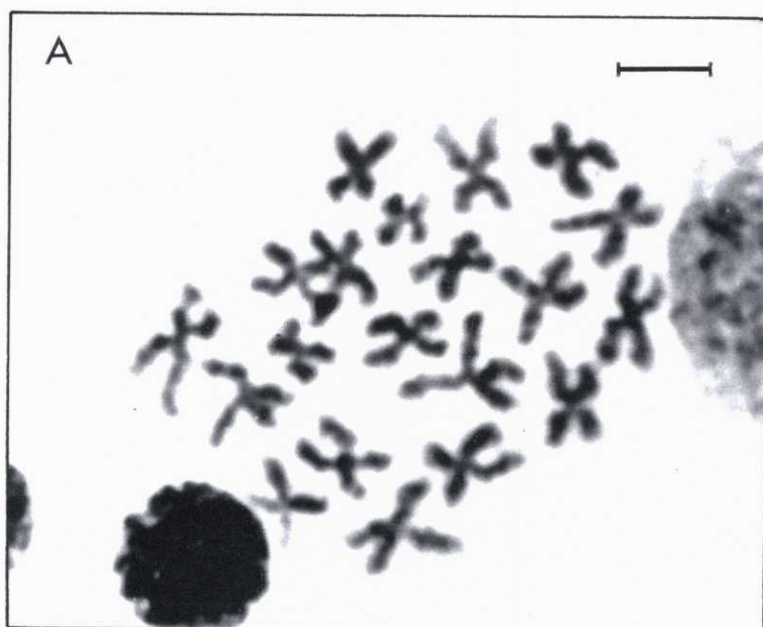
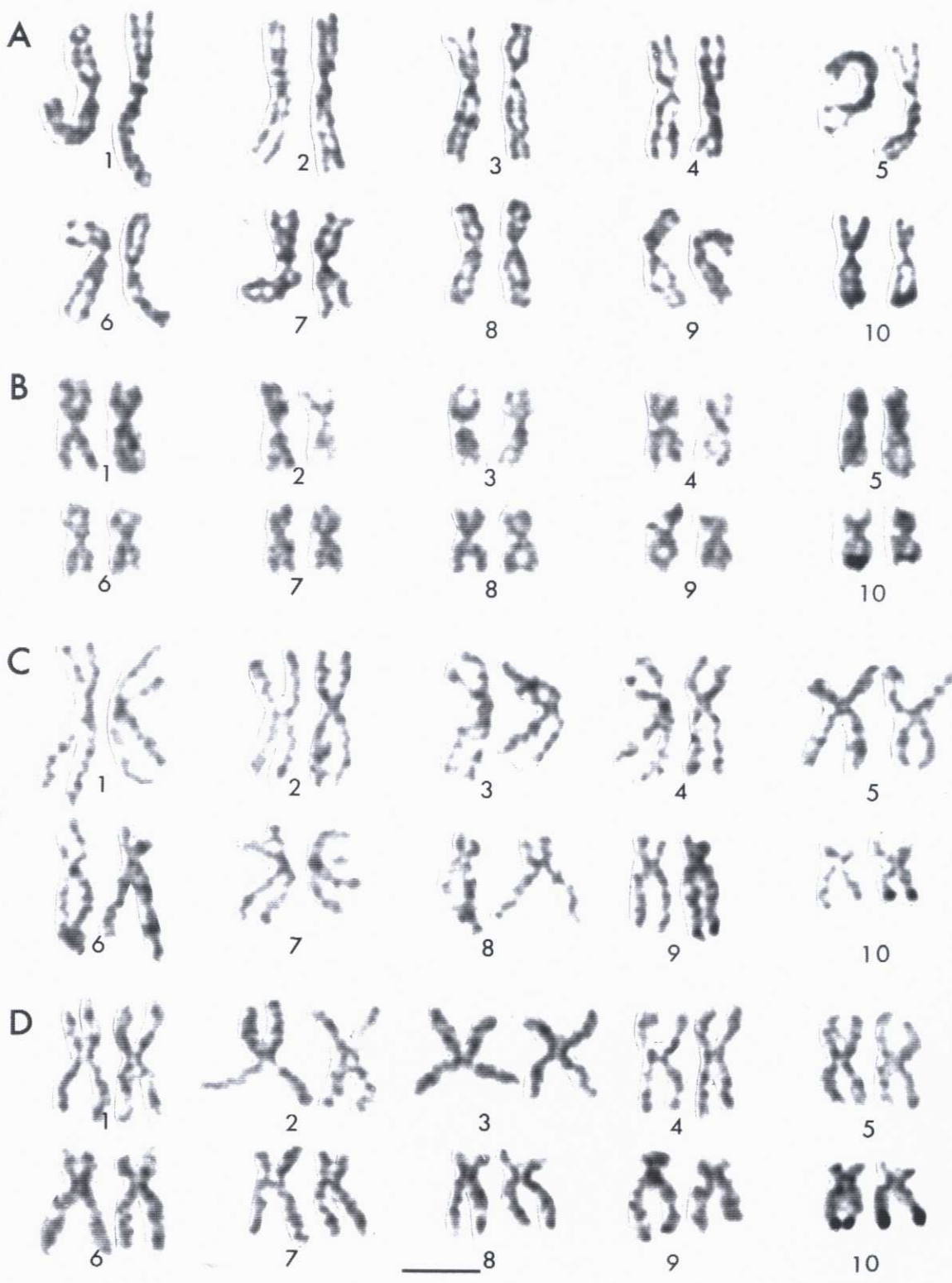


Figura 20.- Cariotipos Ag-NOR de *C. gigas* y *O. edulis*. **A-B** Cariotipos Ag-NOR de *C. gigas*; véase dos Ag-NORs en el par 10 de igual tamaño (**A**) y de distinto tamaño (**B**). **C-D** Ejemplos de cariotipos Ag-NORs de *O. edulis*; véase un Ag-NOR en los pares 9 y 10 (**C**), dos Ag-NORs en el par 10 (**D**). Barra = 5 μ m



Individuos	Frecuencia (%) de nucleolos/núcleo		Total núcleos	M
	1	2		
1	53,10	46,90	113	1,47
2	49,18	50,82	122	1,51
3	43,55	56,45	124	1,56
4	50,00	50,00	122	1,50
5	45,13	54,87	113	1,55

Tabla 13.- Frecuencia de nucleolos por núcleo y número medio de nucleolos por individuo (M) en *C. gigas*.

Figura 21.- Metafase mitótica de *C. gigas* sometida al tratamiento de bandas C. Las flechas indican bloques de heterocromatina constitutiva localizada en la misma posición que los Ag-NORs. Barra = 5 μ m

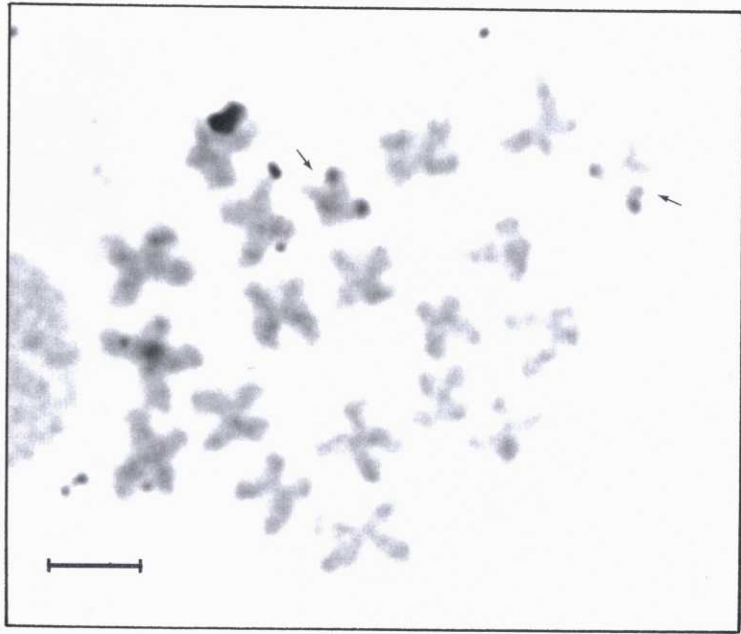


Figura 22.- Metafases mitóticas de *O. edulis* teñidas con Giemsa. **A** Metafase normal $2n = 20$.
B Metafase triploide $3n = 30$. Barra = 5 μm

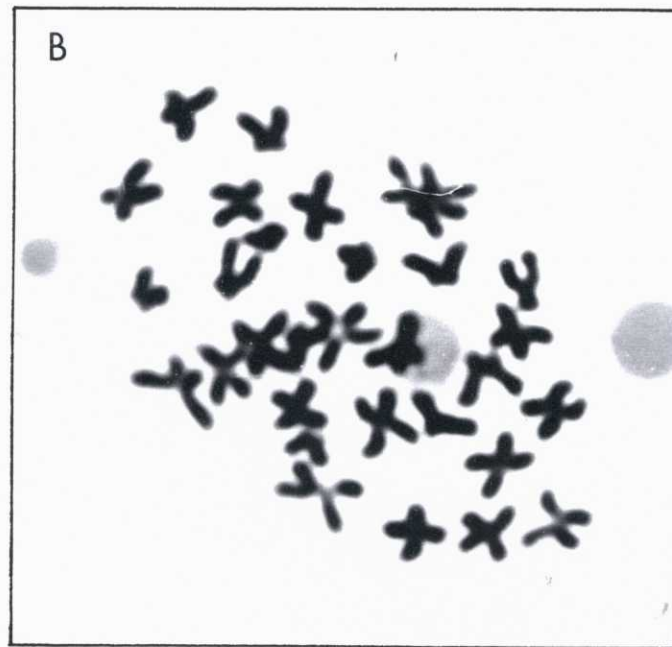
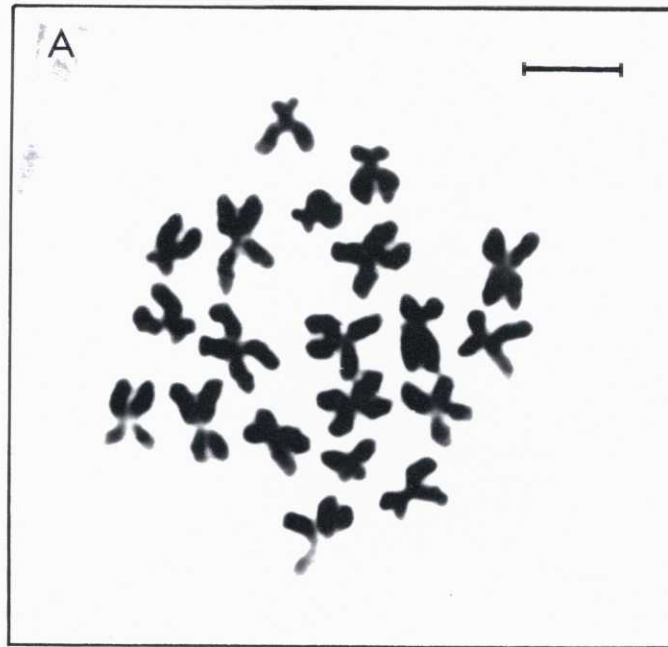
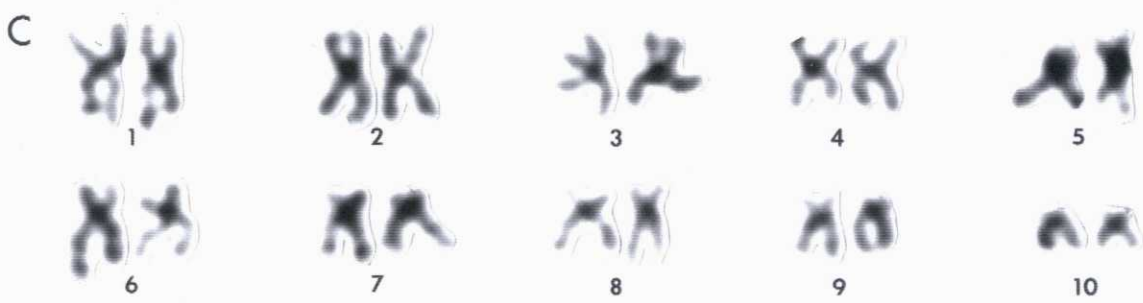
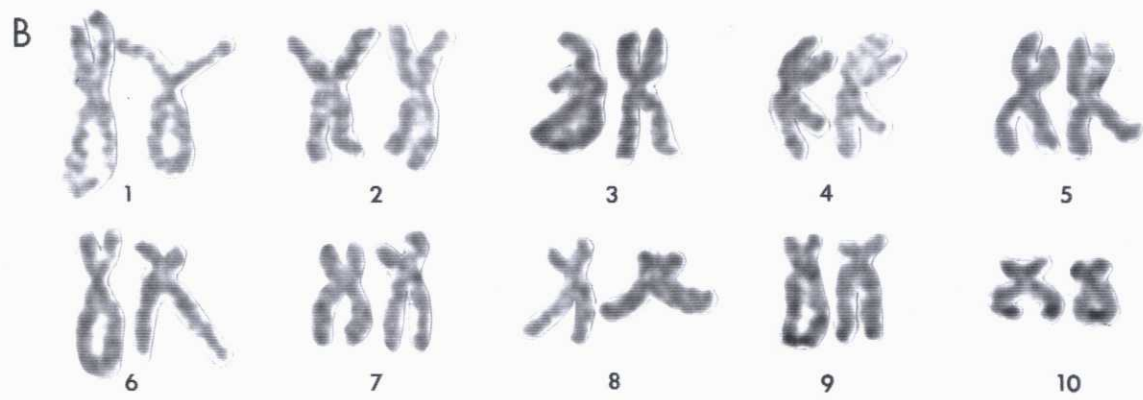
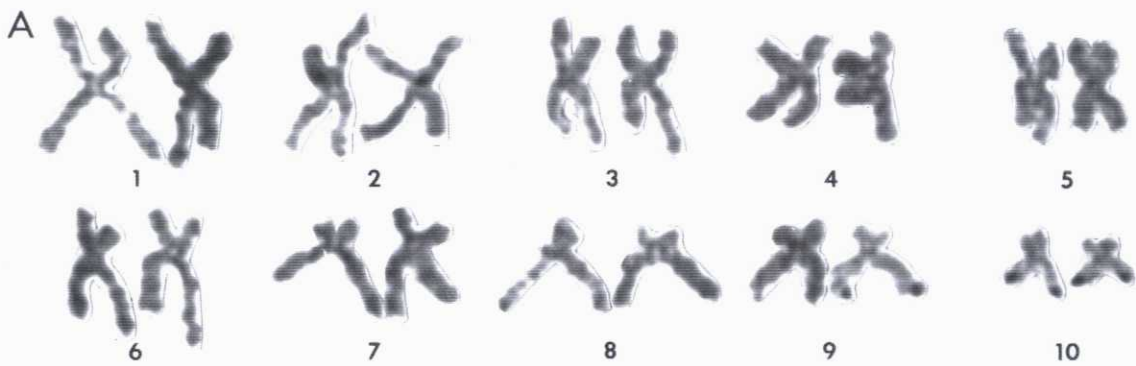


Figura 23.- Cariotipos de *O. edulis*. **A-B** Otros ejemplos de cariotipos Ag-NOR; véase un Ag-NOR en el par 9 y dos en el par 10 (**A**) y dos Ag-NORs en los pares 9 y 10 (**B**). **C** Cariotipo bandas C. Barra = 5 μ m



Distribución Ag-NORs/célula		Nº de células examinadas	Porcentaje
par 9	par 10		
1	-	-	-
-	1	8	10,13
1	1	26	32,91
2	-	4	5,06
-	2	29	36,71
2	1	1	1,27
1	2	5	6,33
2	2	6	7,59

Tabla 14.- Distribución de los Ag-NORs en el total de células examinadas de *O. edulis*.

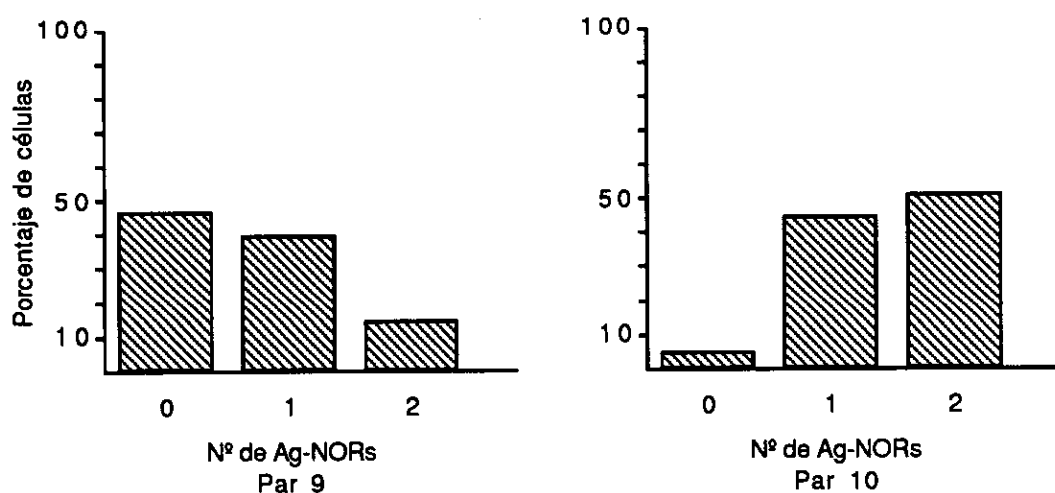


Figura 24.- Proporción de células examinadas de *O. edulis* con cero, uno o dos Ag-NORs en cada par portador.

Individuos	Frecuencia (%) de nucleolos/núcleo				Total núcleos	M
	1	2	3	4		
1	21,43	62,5	14,29	1,78	112	1,96
2	19,3	43,86	30,7	6,14	114	2,23
3	19,69	54,33	24,41	1,57	127	2,07
4	34,17	56,64	5,31	0,88	113	1,69
5	9,73	45,13	42,48	2,66	113	2,38
6	11,76	47,06	27,73	13,45	119	2,42

Tabla 15.- Frecuencia de nucleolos por núcleo y número medio de nucleolos por individuo (M) en *O. edulis*.

Par cromos.	Long. relativa		Arm ratio		Índice centromérico		Clasificación
	M	DT	M	DT	M	DT	
1	13,67	0,75	0,84	0,06	45,44	1,76	m
2	12,59	0,33	0,83	0,09	45,03	2,46	m
3	11,81	0,56	0,85	0,08	45,69	2,12	m
4	11,37	0,73	0,54	0,05	35,00	2,02	sm
5	10,75	0,74	0,82	0,07	44,83	1,97	m
6	9,71	0,49	0,49	0,04	32,59	2,00	sm
7	8,67	0,44	0,82	0,06	44,89	1,81	m
8	8,26	0,51	0,81	0,03	44,55	1,07	m
9	6,91	0,54	0,56	0,06	35,65	2,30	sm
10	6,26	0,54	0,81	0,07	44,47	2,02	m

Tabla 16.- Longitud relativa "arm ratio", Índice centromérico y clasificación de cada par cromosómico de *O. denselamellosa*.

M: media; DT: desviación típica

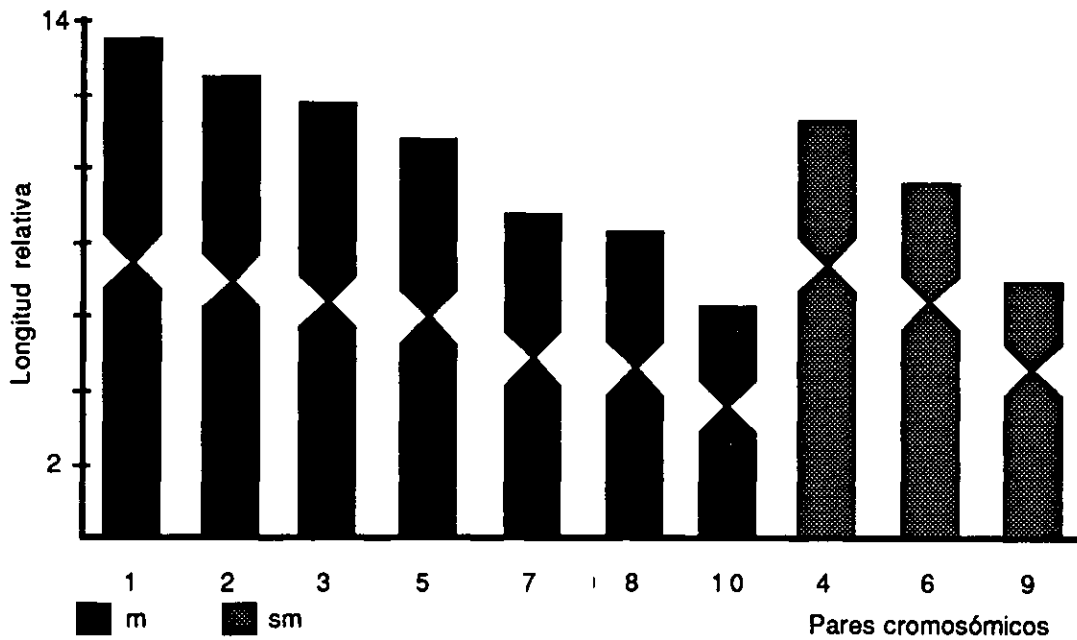
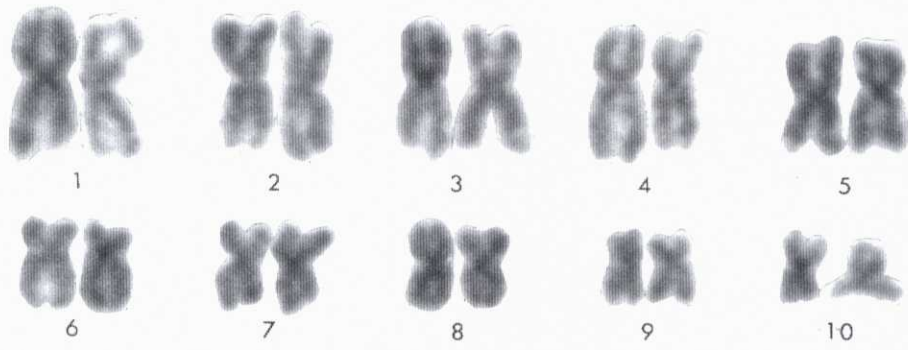
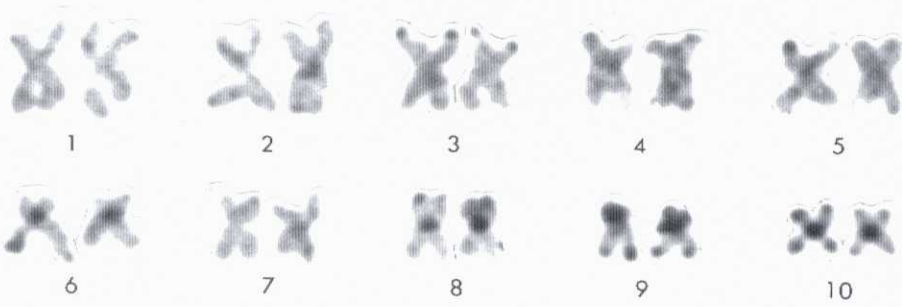


Figura 25.- Idiograma representativo del cariotipo de *O. denselamellosa*, elaborado a partir de los valores de la longitud relativa e índice centromérico de cada par cromosómico.

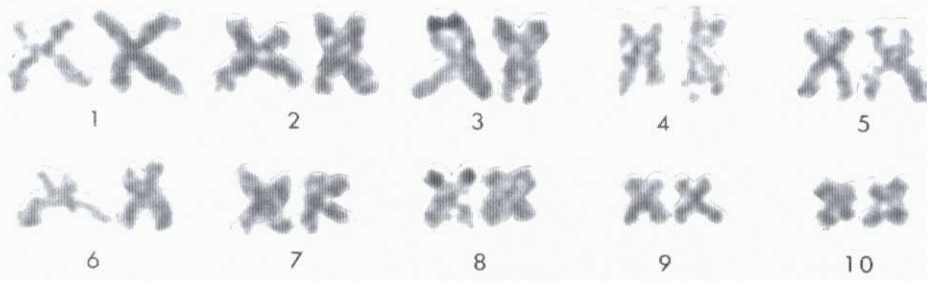
Figura 26.- Cariotipos de *O. denselamellosa*. **A** Cariotipo estándar Giemsa. **B** Cariotipo bandas C. **C** Cariotipo Ag-NOR, véase un Ag-NOR en los pares 3 y 8. Barra = 5 μ m



A



B



C



Figura 27.- Metafase mitótica de *O. denselamellosa*. **A** Teñida con Giemsa. **B** Misma metafase teñida con nitrato de plata. Las flechas indican los cromosomas Ag-NOR. Barra = 5 μ m

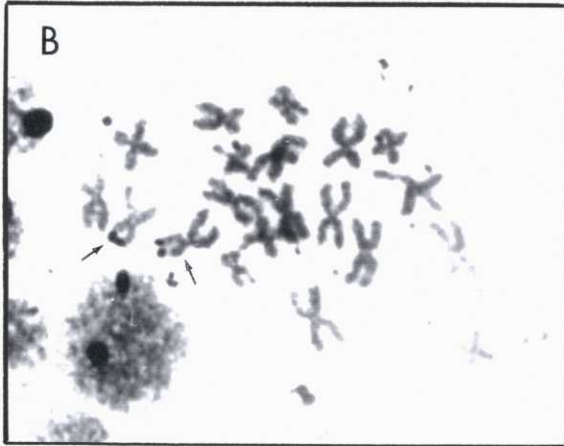
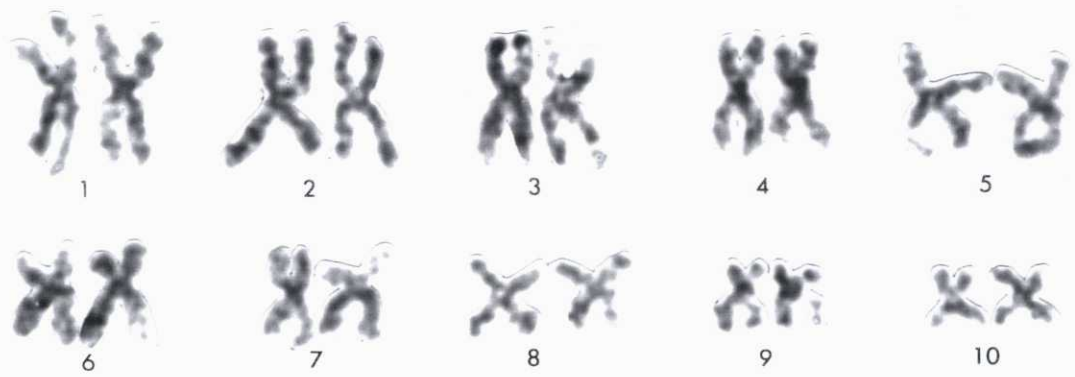
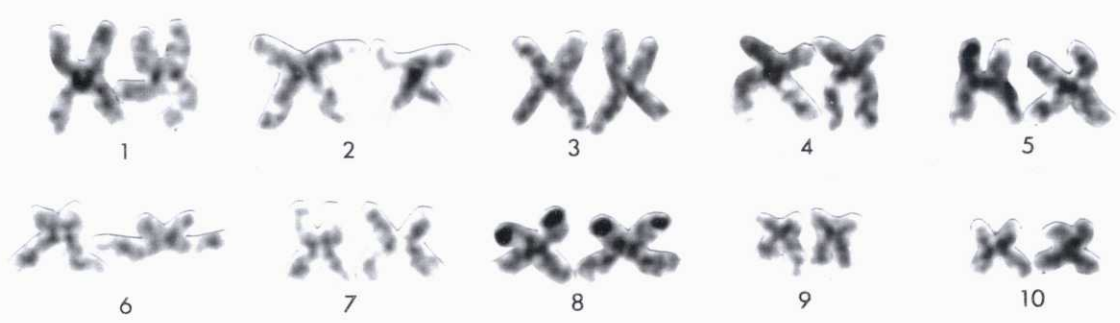


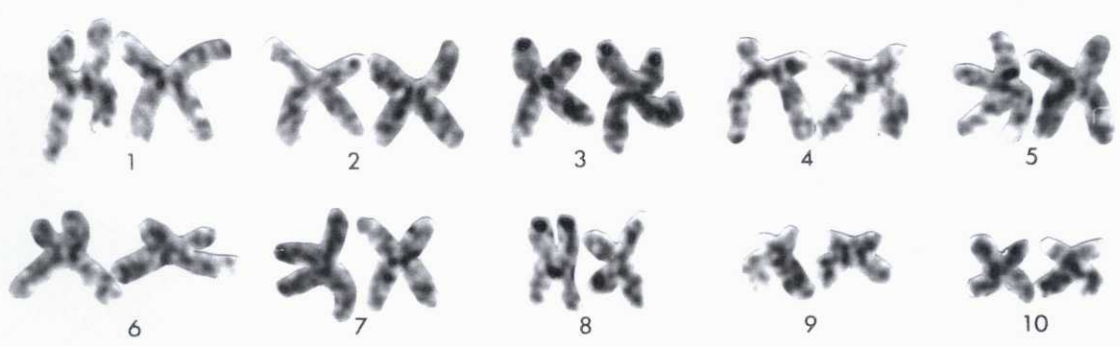
Figura 28.- Ejemplos de cariotipos Ag-NORs de *O. denselamellosa*; véase un Ag-NOR en el par 3 (A), dos Ag-NORs en el par 8 (B), dos Ag-NORs en el par 3 y uno en el par 8 (C). Barra = 5 μ m



A



B



C



Distribución Ag-NORs/célula		Nº de células examinadas	Porcentaje
par 3	par 8		
1	-	36	23,68
-	1	5	3,29
1	1	58	38,16
2	-	25	16,45
-	2	9	5,92
2	1	14	9,21
1	2	5	3,29

Tabla 17.- Distribución de los Ag-NORs en el total de células examinadas de *O. denselamellosa*.

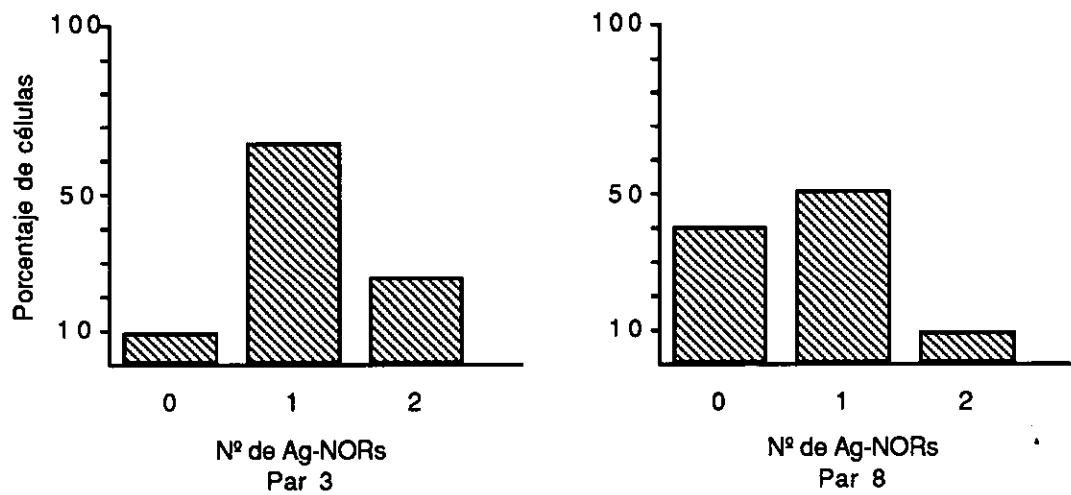


Figura 29.- Proporción de células examinadas de *O. denselamellosa* con cero, uno o dos Ag-NORs en cada par portador.

Individuos	Frecuencia (%) de nucleolos/núcleo			Total núcleos	M
	1	2	3		
1	71,96	28,04	-	107	1,28
2	42,57	50,50	6,93	101	1,64
3	37,26	57,84	4,90	102	1,68
4	29,70	62,38	7,92	101	1,78
5	49,04	50,00	0,96	104	1,52
6	36,79	62,27	0,94	106	1,64

Tabla 18.- Frecuencia de nucleolos por núcleo y número medio de nucleolos por individuo (M) en *O. denselamellosa*.

Par cromos.	Long. relativa		Arm ratio		Índice centromérico		Clasificación
	M	DT	M	DT	M	DT	
1	13,96	0,70	0,82	0,05	44,78	1,43	m
2	12,29	0,80	0,55	0,04	35,20	1,75	sm
3	11,61	0,55	0,83	0,09	45,22	2,54	m
4	11,13	0,60	0,48	0,04	32,17	1,97	sm
5	10,34	0,41	0,47	0,05	31,89	2,46	sm
6	10,01	0,27	0,78	0,07	43,49	2,26	m
7	9,08	0,65	0,36	0,03	26,16	1,61	sm
8	8,27	0,64	0,81	0,07	44,44	2,13	m
9	8,11	0,37	0,52	0,07	34,00	3,09	sm
10	5,19	0,36	0,06	0,02	5,39	1,35	t

Tabla 19.- Longitud relativa "arm ratio", índice centromérico y clasificación de cada par cromosómico de *O. puelchana*.

M: media; DT: desviación típica

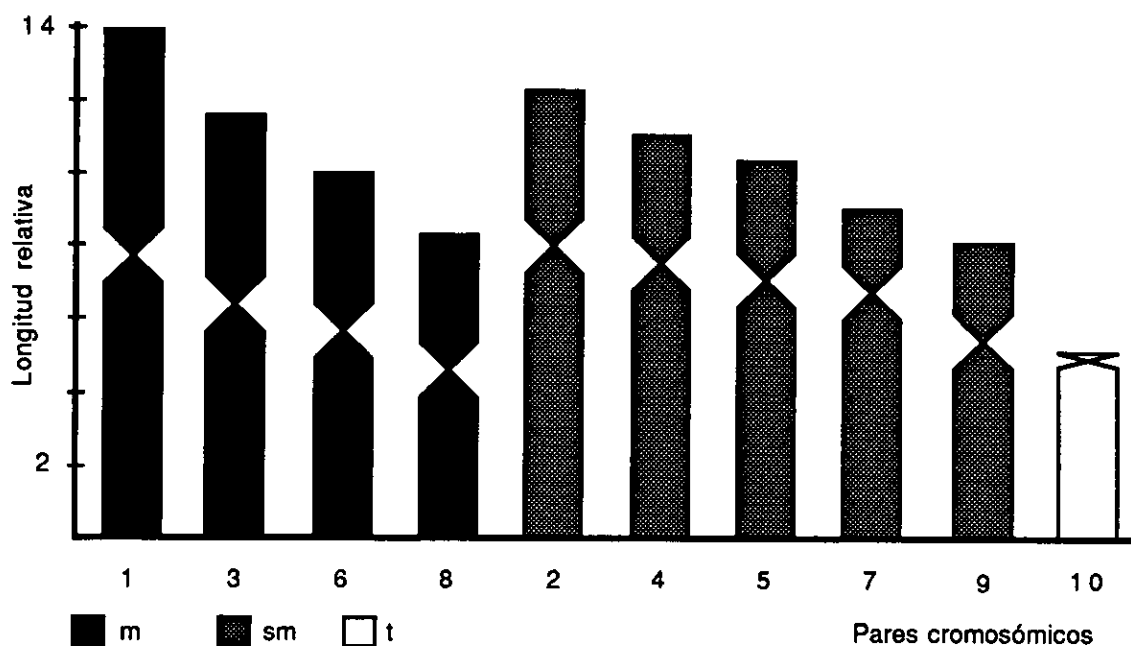


Figura 30.- Idiograma representativo del cariotipo de *O. puelchana*, elaborado a partir de los valores de la longitud relativa e índice centromérico de cada par cromosómico.

Figura 31.- Cariotipos de *O. puelchana*. **A** Cariotipo estándar Giemsa. **B-D** Cariotipos Ag-NOR; véase un Ag-NOR en el par 2 (**B**), un Ag-NOR en los pares 2 y 4 (**C**), dos Ag-NORs en el par 2 y uno en el par 4 (**D**). Barra = 5 μ m

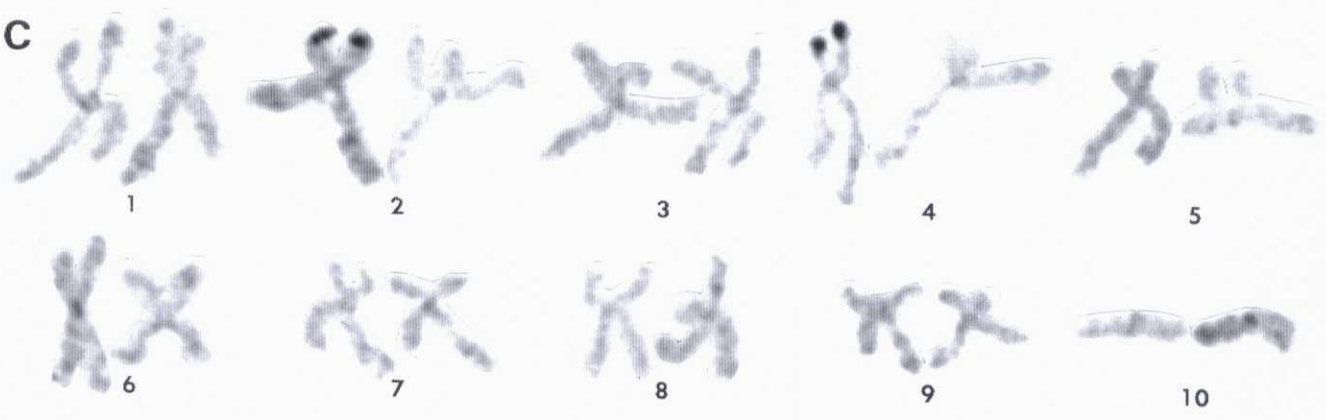
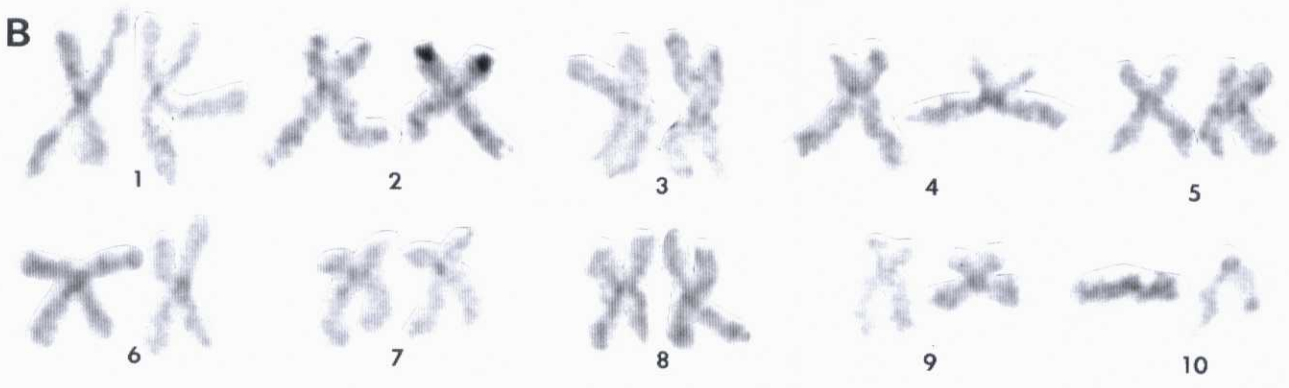
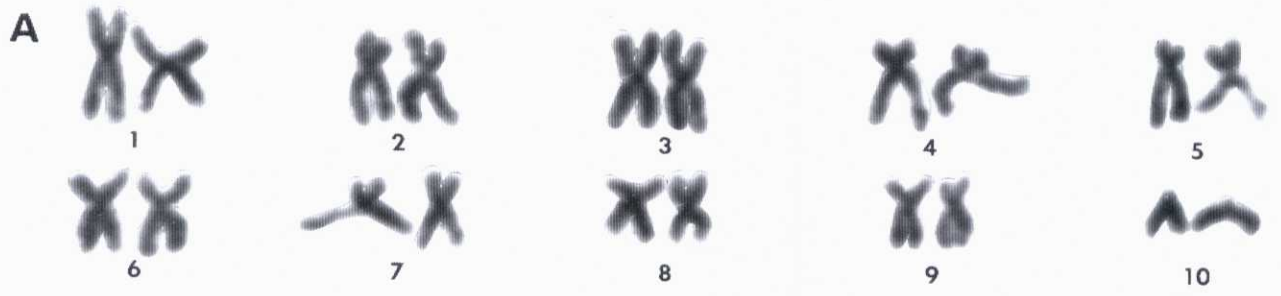
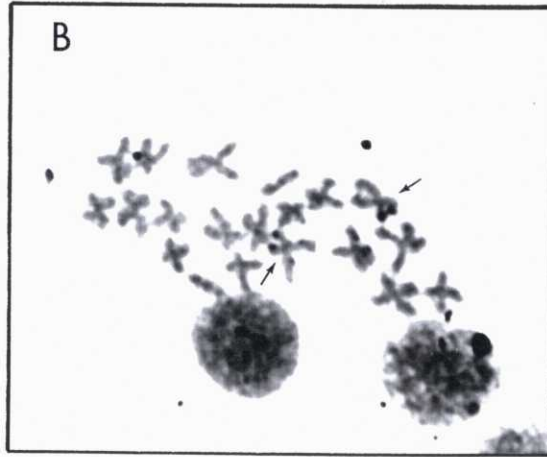
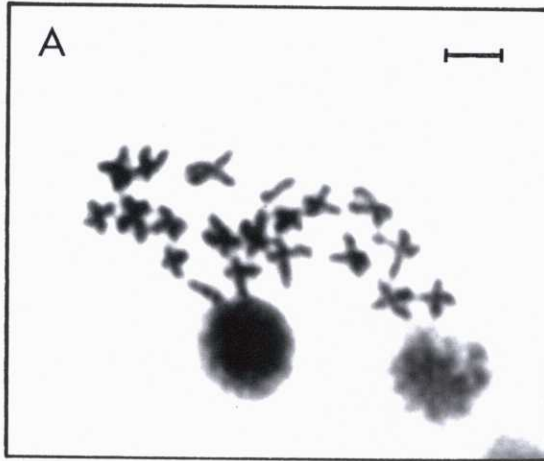


Figura 32.- Metafase mitótica de *O. puelchana*. **A** Teñida con Giemsa. **B** Misma metafase teñida con nitrato de plata. Las flechas indican los cromosomas Ag-NOR. Barra = 5 μ m



Distribución Ag-NORs/célula		Nº de células examinadas	Porcentaje
par 2	par 4		
1	-	21	19,81
-	1	14	13,21
1	1	44	41,51
2	-	14	13,21
-	2	7	6,60
2	1	4	3,77
1	2	2	1,89

Tabla 20.- Distribución de los Ag-NORs en el total de células examinadas de *O. puelchana*.

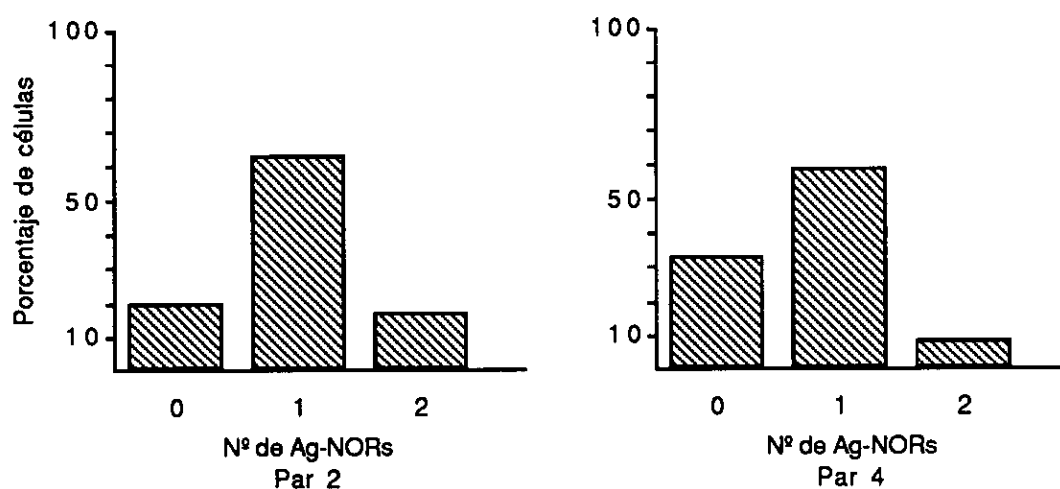


Figura 33.- Proporción de células examinadas de *O. puelchana* con cero, uno o dos Ag-NORs en cada par portador.

Individuos	Frecuencia (%) de nucleolos/núcleo				Total núcleos	M
	1	2	3	4		
1	56,31	33,98	7,77	1,94	103	1,55
2	29,81	64,42	5,77	-	104	1,76
3	41,51	50,94	7,55	-	106	1,66
4	67,31	30,77	1,92	-	104	1,35
5	51,89	39,62	8,49	-	106	1,57

Tabla 21.- Frecuencia de nucleolos por núcleo y número medio de nucleolos por individuo (M) en *O. puelchana*.

3.3. FAMILIA CARDIIDAE

3.3.1. *CERASTODERMA EDULE*

3.3.1.1. NUMERO DE CROMOSOMAS

Se contaron los cromosomas de 35 metafases de 14 individuos de la población de Baldayo; observándose 28 metafases con 38 cromosomas, 5 con 37, una con 36 y otra con 35. La dotación $2n = 38$ concuerda con la descrita por Koulman y Wolff (1977) en individuos de otra población. La proporción de células aneuploides corresponde al 20%. En 7 individuos de los que se analizaron 22 metafases se detectaron 1 ó 3 cromosomas supernumerarios o cromosomas B. Este tipo de cromosomas se diferencia del resto del complemento por su tamaño, mucho más pequeño que el cromosoma de menor tamaño del complemento estándar, y por la variabilidad numérica, inter e intraindividual; por ejemplo, un individuo del que se analizaron 5 metafases muestra un cromosoma B en todas ellas, mientras que otro con 6 metafases muestra un cromosoma B en sólo una.

La presencia de cromosomas B se confirmó en los individuos de la Ría del Pasaje; se contaron los cromosomas de 135 metafases de 10 individuos y 3 de ellos, con un número de metafases entre 11 y 35, presentan este tipo de cromosomas en todas las células, estando ausentes en todos los demás.

3.3.1.2. MORFOLOGIA CROMOSOMICA Y CARIOTIPO

Se examinaron 15 cariotipos, de 10 individuos, y se midieron los cromosomas de 10 de ellos, siendo la longitud absoluta media del complemento diploide de $189,39 \mu\text{m}$ ($DT= 20,26$). En la **tabla 22** se especifican, para cada par cromosómico, los valores de las medias y desviaciones típicas de la longitud relativa, "arm ratio" e índice centromérico, así como la clasificación de los cromosomas. La longitud relativa está comprendida entre el 7,17% y el 4,15%, encontrándose la mayor diferencia de tamaño entre los pares 1 y 2. Los 19 pares cromosómicos se clasifican en submetacéntricos, pares 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 15, 16 y 18, subtelocéntricos, pares 5, 12, 13 y 14, y telocéntricos, pares 9, 17 y 19. El número fundamental que corresponde a esta clasificación es 62. Teniendo en cuenta el intervalo de confianza de la media de los índices centroméricos o de los "arm ratios", el par 16 puede ser clasificado como submetacéntrico-metacéntrico, los pares 8, 15 y 18 como submetacéntricos-subtelocéntricos y

los pares 9, 17 y 19 como telocéntricos-subtelocéntricos. En este caso el número fundamental puede oscilar entre 56 y 62. La dotación haploide se representa por tipos morfológicos en la **figura 34** y un cariotipo con un cromosoma B, organizado por orden de tamaño decreciente, en la **figura 35 A**.

3.3.1.3. REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Se tiñeron 25 preparaciones cromosómicas de diferentes individuos con nitrato de plata y, en todas ellas, los cromosomas muestran tinción homogénea sin distinguirse las regiones organizadoras del nucleolo. Por el contrario, los nucleolos en el núcleo interfásico se tiñen específicamente; se analizaron de 101 a 105 núcleos en 5 individuos, observándose uno o dos nucleolos. La frecuencia de nucleolos por núcleo y el número medio de nucleolos por individuo se detalla en la **tabla 23**; la frecuencia más alta corresponde a un nucleolo y el número medio está comprendido entre 1,21 y 1,46.

3.3.1.4. HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

Se sometieron 29 preparaciones cromosómicas de diferentes individuos a la técnica de bandas C. Independientemente del tiempo de incubación en el hidróxido de bario (de 1 a 5 minutos) pocas metafases responden al tratamiento; únicamente 12 metafases de 2 individuos muestran bandas C en algunos cromosomas. Uno de los individuos presenta en las 6 metafases analizadas un cromosoma B con heterocromatina constitutiva centromérica teñida (véase una metafase en la **figura 36**).

3.4. FAMILIA VENERIDAE

3.4.1. *VENERUPIS PULLASTRA*

3.4.1.1. NUMERO DE CROMOSOMAS

Se contaron los cromosomas de 93 metafases de 10 individuos, observándose 38 cromosomas en 67 metafases, 37 en 13, 36 en 12 y 35 en 1, la dotación diploide resultante es $2n = 38$ y la proporción de células aneuploides del 27,95%.

3.4.1.2. MORFOLOGIA CROMOSOMICA Y CARIOTIPO

Se examinaron 13 cariotipos, de 4 individuos, y se midieron los cromosomas de 10 de ellos, siendo la longitud absoluta media del complemento diploide de 255,12 μm (DT = 29,85). En la **tabla 24** se especifican, para cada par cromosómico, los valores de las medias y desviaciones típicas de la longitud relativa, "arm ratio" e índice centromérico, así como la clasificación de los cromosomas. La longitud relativa está comprendida entre el 7,07% y el 3,59%, encontrándose pequeñas diferencias de tamaño entre pares consecutivos. Los 19 pares cromosómicos se clasifican en metacéntricos, pares 1, 2 y 6, submetacéntricos, pares 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11 y 18, y subtelocéntricos, pares 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 19, no observándose par telocéntrico alguno. El número fundamental que corresponde a esta clasificación es 60. Teniendo en cuenta el intervalo de confianza de los índices centroméricos o de los "arm ratios", los pares 3 y 10 pueden clasificarse en submetacéntricos-metacéntricos, los pares 11 y 18 en submetacéntricos-subtelocéntricos y los pares 12, 13 y 17 en subtelocéntricos-submetacéntricos. En este caso el número fundamental puede variar entre 56 y 66. La dotación haploide se representa por tipos morfológicos en la **figura 37** y el cariotipo, organizado por orden de tamaño decreciente, en la **figura 35 B**.

En algunas células de 9 individuos se detectó una constricción secundaria en uno o los dos cromosomas del par 6 (metacéntrico). En un total de 36 metafases, 26 muestran la constricción secundaria en un sólo cromosoma y las 10 restantes en los dos (**figura 35 B**).

3.4.1.3. REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Se tiñeron 30 preparaciones cromosómicas de diferentes individuos con nitrato de plata y, en todas ellas, los cromosomas muestran tinción homogénea sin diferenciarse las regiones organizadoras de los nucleolos. Por el contrario, los nucleolos en el núcleo interfásico se tiñen específicamente; se analizaron de 100 a 108 núcleos en 5 individuos, observándose uno o dos nucleolos. La frecuencia de nucleolos por núcleo y el número medio de nucleolos por individuo se detalla en la **tabla 25**; las proporciones más elevadas corresponden a uno o dos nucleolos y el número medio está comprendido entre 1,42 y 1,61.

3.4.1.4. HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

Se sometieron 84 preparaciones de diferentes individuos a la técnica de bandas C, de las cuales, 44 proceden de individuos tratados *in vivo* con BrdU. Independientemente de este tratamiento y del tiempo de incubación en hidróxido de bario (de 1 a 5 minutos), pocas metafases revelan tinción diferencial. En 26 metafases de 9 individuos se observaron bandas C centroméricas y/o terminales en un número variable de cromosomas; sin embargo, todas ellas muestran un bloque teñido de heterocromatina constitutiva intersticial, localizado en la constricción secundaria de un cromosoma del par 6 (véase una metafase en la **figura 38**), y en 2 de las metafases aparece banda C en los dos cromosomas del par.

3.4.2. VENERUPIS RHOMBOIDES

3.4.2.1. NUMERO DE CROMOSOMAS

Se contaron los cromosomas de 57 metafases de 15 individuos, observándose 38 cromosomas en 45 metafases, 37 en 11 y 36 en 1. La dotación diploide resultante es $2n = 38$ y la proporción de células aneuploides del 21,05 %.

3.4.2.2. MORFOLOGIA CROMOSOMICA Y CARIOTIPO

Se analizaron 17 cariotipos, de 6 individuos, y se midieron los cromosomas de 10 de ellos, siendo la longitud absoluta media del complemento diploide de 198,19 μm (DT = 35,31). En la **tabla 26** se especifican, para cada par cromosómico, los valores de las medias y

desviaciones típicas de la longitud relativa, "arm ratio" e índice centromérico, así como la clasificación de los cromosomas. La longitud relativa está comprendida entre el 7,26% y el 2,77%, la mayor diferencia de tamaño se encuentra entre los pares 18 y 19 y el último par representa menos de la mitad de la longitud del primero. Los 19 pares cromosómicos se clasifican en metacéntricos, pares 5, 7, 9 y 13, submetacéntricos, pares 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17 y 18, subtlocéntricos, pares 1, 3, 6 y 19, y telocéntricos, pares 2, 4 y 11. El número fundamental que corresponde a esta clasificación es 62. Teniendo en cuenta el intervalo de confianza de la media de los índices centroméricos o de los "arm ratios", el par 13 puede ser clasificado como metacéntrico-submetacéntrico, los pares 14 y 17 como submetacéntricos-metacéntricos y los pares 3 y 19 como subtlocéntricos-submetacéntricos. En este caso el número fundamental puede tomar valores entre 62 y 66. La dotación haploide se representa por tipos morfológicos en la **figura 39** y el cariotipo, organizado por orden de tamaño decreciente, en la **figura 35 C**.

En algunas células de 7 individuos se observaron telómeros Giemsa negativos en los cromosomas del par 16 (submetacéntrico). De un total de 14 metafases, 13 muestran este tipo de telómeros en uno de los cromosomas del par y 1 en los dos (**figura 35 C**).

3.4.3. RUDITAPES PHILIPPINARUM

La dotación cromosómica diploide de esta especie, $2n = 38$, fue determinada en individuos de distintas poblaciones en trabajos anteriores (Gerard, 1978; Ieyama, 1985; Borsa y Thiriot-Quévieux, 1990). De acuerdo con la descripción del cariotipo realizada por Borsa y Thiriot-Quévieux (1990), los 19 pares cromosómicos se clasifican en metacéntricos, pares 3, 4, 7, 8, 14, 16, 17, 18 y 19, y submetacéntricos, pares 1, 2, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13 y 15. Los cariotipos Ag-NOR se elaboraron siguiendo este modelo.

3.4.3.1. REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Se analizaron 32 metafases teñidas con plata de un total de 17 individuos, variando entre 1 y 5 las metafases de cada uno. Del total de individuos, 7 se trataron *in vivo* con BrdU, no detectándose diferencias de tinción cromosómica respecto a los no tratados. En 28 metafases se observaron dos Ag-NORs y en las 4 restantes un Ag-NOR. Estos se localizaron en los telómeros de uno de los brazos del par 18 (metacéntrico), asignándose arbitrariamente al brazo "largo". En la **figura 40** se muestra un cariotipo Ag-NOR con los dos cromosomas portadores

teñidos simultáneamente. El único par portador de organizadores nucleolares manifiesta una elevada proporción de Ag-NOR en homocigosis (87,5%) y baja en heterocigosis (12,5%).

La tinción de los nucleolos en el núcleo interfásico se analizó en 5 individuos, examinándose de 100 a 108 núcleos en cada uno. El número de nucleolos teñidos varía entre uno y dos. La frecuencia de nucleolos por núcleo y el número medio de nucleolos por individuo se detalla en la **tabla 27**; la proporción más elevada corresponde a uno o dos nucleolos y el número medio toma valores entre 1,35 y 1,52.

3.4.4. *VENERUPIS AUREA*

La dotación cromosómica diploide de los individuos de la población estudiada, $2n = 38$, fue determinada anteriormente por Borsa y Thiriot-Quévieux (1990), estableciendo también el cariotipo según las medidas de los cromosomas. De acuerdo con su descripción, los 19 pares cromosómicos se clasifican en metacéntricos, pares 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10 y 14, submetacéntricos, pares 4, 7, 9, 11, 12, 13, 15, 16 y 19, subteloecéntrico, par 17, y telocéntrico, par 18. Los cariotipos Ag-NOR se elaboraron siguiendo este modelo.

Entre los 89 individuos utilizados en este trabajo se encontró uno caracterizado por presentar un número de metafases muy superior al observado habitualmente y dotaciones cromosómicas anormales. Las preparaciones de este individuo se tiñeron con Giemsa y se contaron los cromosomas de 145 metafases al microscopio; de éstas, 134 muestran más de 38 cromosomas y las 11 restantes la dotación normal, $2n = 38$. En 19 fotografías, 5 de células con dotación normal y 14 con dotación anormal, se precisó el número de cromosomas, observándose en éstas últimas 86, 85, 83, 82, 81, 81, 80, 80, 79, 78, 77, 72, 71 y 41 cromosomas. Las células con dotación normal no muestran diferencias respecto al cariotipo establecido por Borsa y Thiriot-Quévieux (1990). Sin embargo, el cariotipo de las células anormales puede diferenciarse por presentar una disminución pronunciada del tamaño de los cromosomas, sobre todo en los cromosomas metacéntricos; por la presencia de un cromosoma subteloecéntrico o telocéntrico grande; y por mostrar un número variable de cromosomas de reducido tamaño con una morfología reconocible y no reconocible. En la **figura 41** se muestra un cariotipo de cada tipo celular; para facilitar la comparación de los cariotipos, los cromosomas se ordenaron por tamaño decreciente pero separando los metacéntricos del resto del complemento.

3.4.4.1. REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Se analizaron 29 metafases de un total de 4 individuos, sin separarse las metafases de cada uno. El número de Ag-NORs observados varía entre uno y dos, detectándose en una misma preparación cromosómica metafases con uno y dos Ag-NORs. Del total de metafases, 21 muestran dos Ag-NORs y las 8 restantes un Ag-NOR. Estos se localizaron intersticialmente en uno de los brazos del par 3 (metacéntrico), arbitrariamente asignado al brazo "corto". La proporción de Ag-NORs en homocigosis (72,41%) es más elevada que en heterocigosis (27,59%). En la **figura 42**, se muestra un cariotipo, organizado por orden de tamaño decreciente, con dos Ag-NORs teñidos simultáneamente.

Par cromos.	Long. relativa		Arm ratio		Indice centromérico		Clasificación
	M	DT	M	DT	M	DT	
1	7,17	0,45	0,53	0,09	34,42	3,63	sm
2	6,48	0,38	0,51	0,07	33,47	3,37	sm
3	6,33	0,36	0,46	0,09	31,15	4,20	sm
4	6,08	0,28	0,40	0,04	28,55	2,13	sm
5	5,85	0,28	0,29	0,04	22,03	2,20	st
6	5,54	0,44	0,46	0,08	30,99	3,69	sm
7	5,49	0,27	0,46	0,10	30,99	4,24	sm
8	5,40	0,31	0,36	0,06	26,09	3,35	sm-st
9	5,27	0,40	0,13	0,04	11,21	3,07	t-st
10	5,07	0,19	0,46	0,05	31,07	2,48	sm
11	4,91	0,26	0,38	0,07	27,47	3,75	sm
12	4,91	0,19	0,24	0,06	19,35	3,79	st
13	4,82	0,23	0,31	0,06	23,36	3,34	st
14	4,71	0,20	0,32	0,05	23,76	2,69	st
15	4,58	0,29	0,35	0,06	25,79	3,52	sm-st
16	4,56	0,23	0,60	0,08	37,20	3,35	sm-m
17	4,47	0,26	0,14	0,04	12,27	3,34	t-st
18	4,20	0,31	0,34	0,06	25,21	3,37	sm-st
19	4,15	0,54	0,16	0,12	12,37	5,42	t-st

Tabla 22.- Longitud relativa "arm ratio", índice centromérico y clasificación de cada par cromosómico de *C. edule*.

M: media; DT: desviación típica

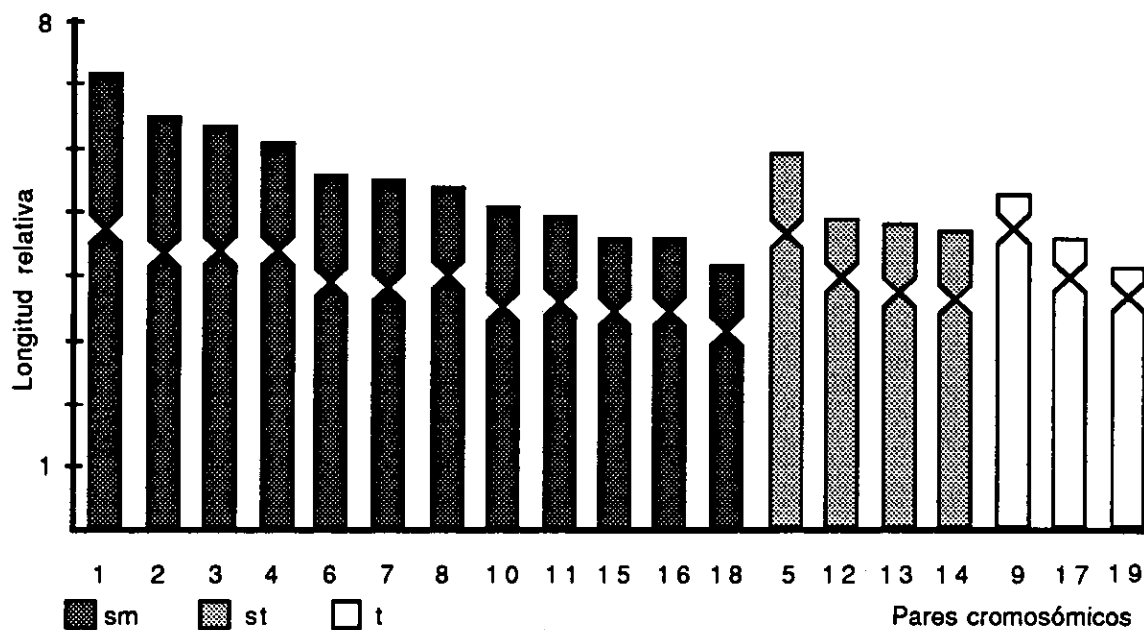
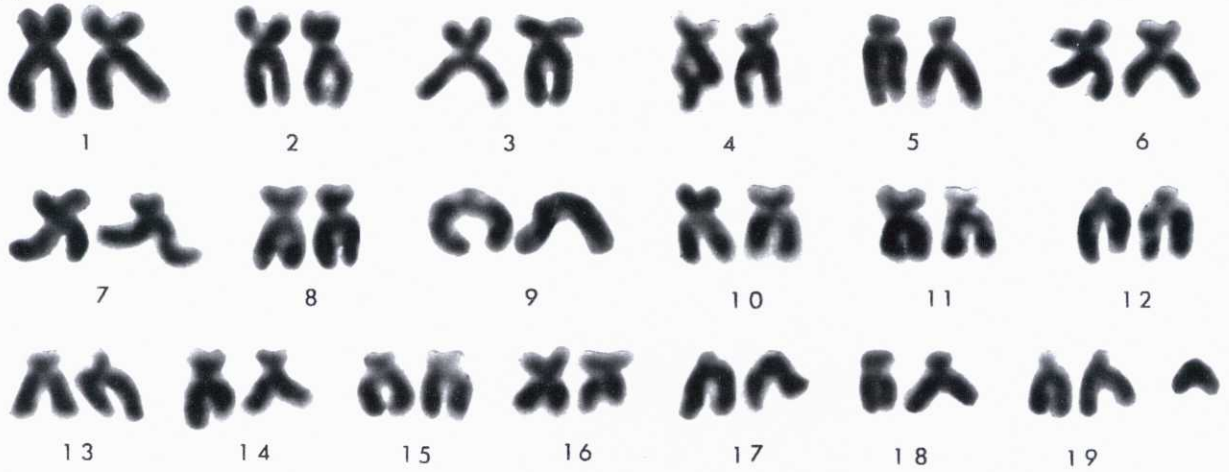


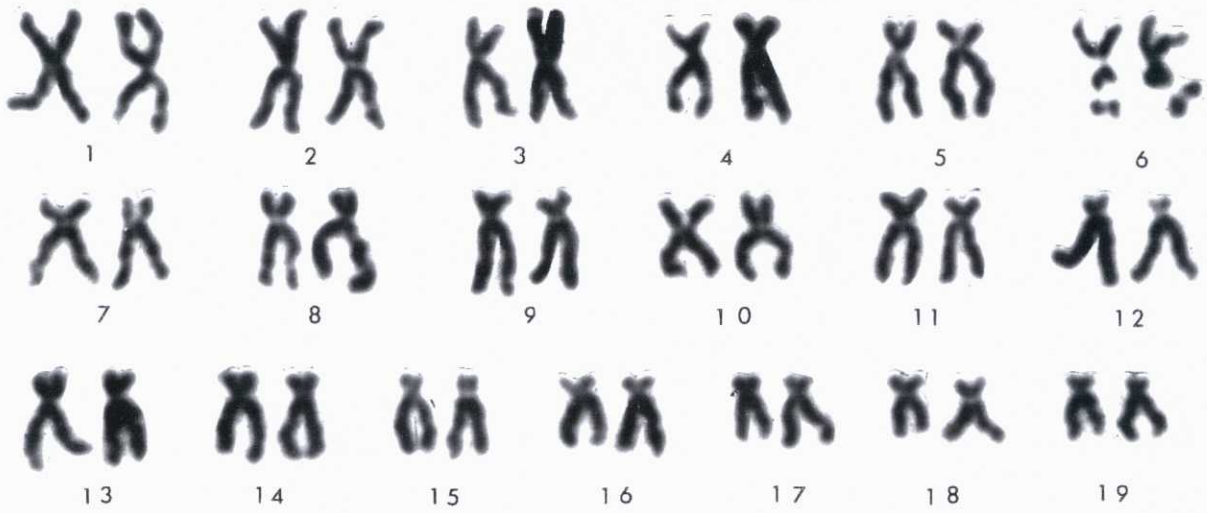
Figura 34.- Idiograma representativo del cariotipo de *C. edule*, elaborado a partir de los valores de la longitud relativa e índice centromérico de cada par cromosómico.

Figura 35.- Cariotipos estándar Giemsa. **A** *C. edule*, véase un cromosoma B situado al lado del par 19. **B** *V. pullastra*, véase una constricción secundaria en el par 6. **C** *V. rhomboides*, véase telómeros Giemsa negativos en el par 16. Barra = 5 μ m

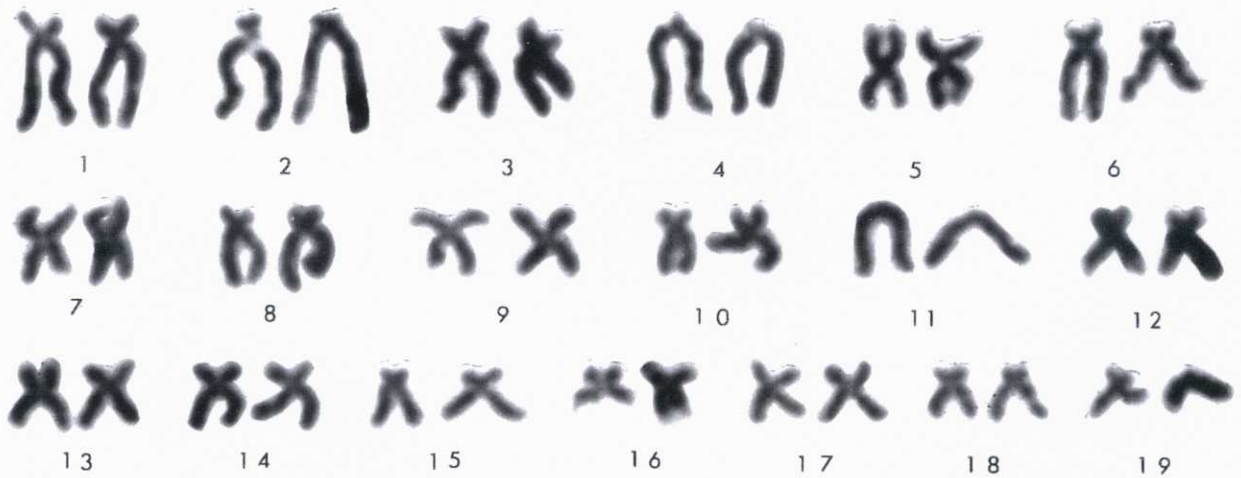
A



B



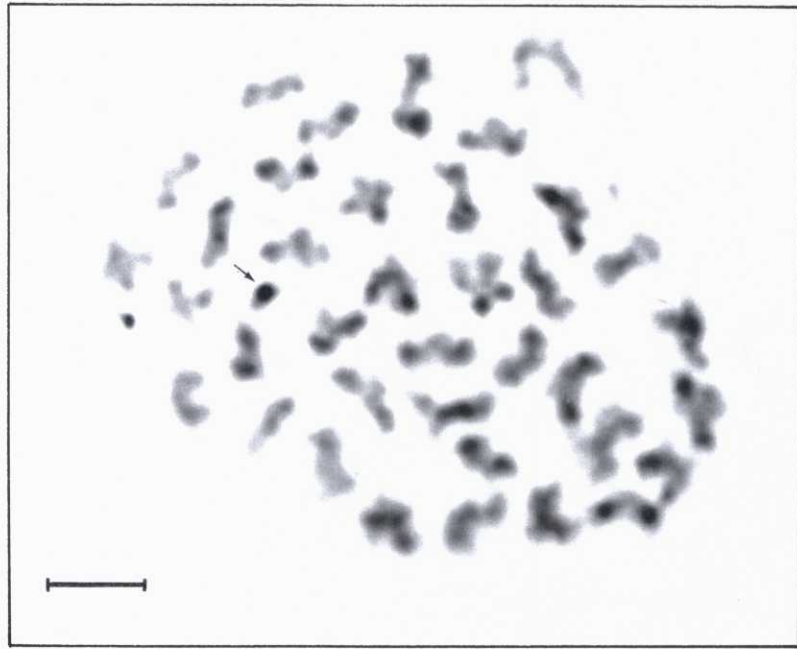
C



Individuos	Frecuencia (%) de nucleolos/núcleo		Total núcleos	M
	1	2		
1	78,85	21,15	104	1,21
2	59,05	40,95	105	1,40
3	54,81	45,19	104	1,45
4	53,92	46,08	102	1,46
5	54,46	45,54	101	1,45

Tabla 23.- Frecuencia de nucleolos por núcleo y número medio de nucleolos por individuo (M) en *C. edule*.

Figura 36.- Metafase mitótica de *C. edule* sometida al tratamiento de bandas C. La flecha indica la presencia de heterocromatina constitutiva en un cromosoma B. Barra = 5 μ m



Par cromos.	Long. relativa		Arm ratio		Índice centromérico		Clasificación
	M	DT	M	DT	M	DT	
1	7,07	0,24	0,84	0,06	45,57	1,72	m
2	6,59	0,31	0,77	0,06	43,36	1,91	m
3	6,15	0,35	0,60	0,07	37,33	2,80	sm-m
4	6,13	0,25	0,44	0,04	30,18	2,19	sm
5	5,88	0,27	0,44	0,04	30,29	1,73	sm
6	5,67	0,33	0,67	0,11	39,74	3,69	m
7	5,64	0,21	0,40	0,06	28,53	3,25	sm
8	5,48	0,26	0,40	0,10	28,03	5,16	sm
9	5,44	0,18	0,29	0,07	22,27	4,42	st
10	5,41	0,21	0,60	0,07	37,36	2,44	sm-m
11	5,22	0,18	0,36	0,08	26,32	4,11	sm-st
12	5,12	0,14	0,34	0,07	24,85	4,02	st-sm
13	5,06	0,16	0,33	0,05	24,85	2,47	st-sm
14	4,79	0,14	0,31	0,06	23,30	3,40	st
15	4,58	0,20	0,29	0,04	22,53	2,17	st
16	4,26	0,22	0,31	0,04	23,12	2,29	st
17	4,02	0,20	0,33	0,05	24,69	2,73	st-sm
18	3,90	0,24	0,35	0,06	25,72	3,36	sm-st
19	3,59	0,22	0,30	0,03	22,82	1,98	st

Tabla 24.- Longitud relativa "arm ratio", índice centromérico y clasificación de cada par cromosómico de *V. pullastra*.

M: media; DT: desviación típica

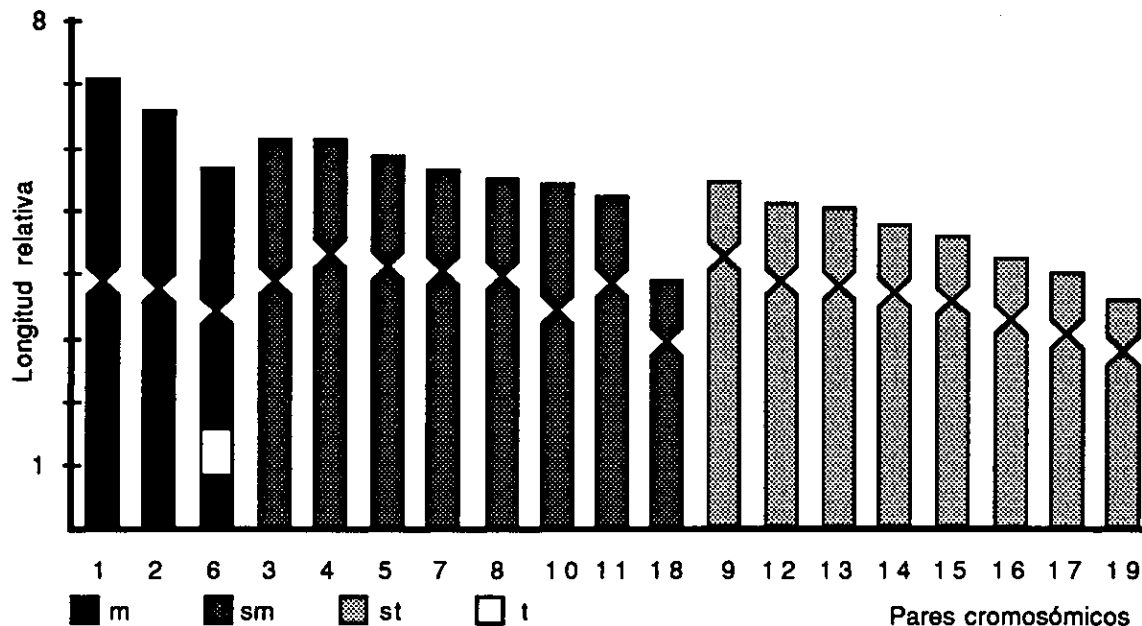
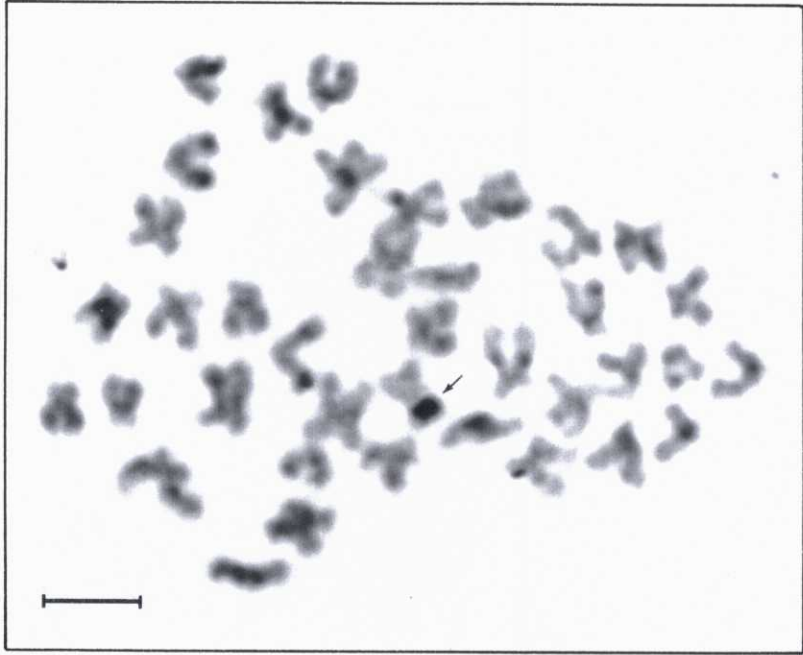


Figura 37.- Idiograma representativo del cariotipo de *V. pullastra*, elaborado a partir de los valores de la longitud relativa e índice centromérico de cada par cromosómico.

Individuos	Frecuencia (%) de nucleolos/núcleo		Total núcleos	M
	1	2		
1	46,00	54,00	100	1,54
2	48,54	51,45	103	1,51
3	57,41	42,59	108	1,42
4	38,83	61,17	103	1,61
5	52,34	47,66	107	1,47

Tabla 25.- Frecuencia de nucleolos por núcleo y número medio de nucleolos por individuo (M) en *V. pullastra*.

Figura 38.- Metafase mitótica de *V. pullastra* sometida al tratamiento de bandas C. La flecha indica la presencia de heterocromatina constitutiva en la constricción secundaria de un cromosoma del par 6. Barra = 5 μ m



Par cromos.	Long. relativa		Arm ratio		Índice centromérico		Clasificación
	M	DT	M	DT	M	DT	
1	7,26	0,39	0,27	0,06	20,97	3,89	st
2	7,01	0,48	0,08	0,02	7,31	1,56	t
3	6,21	0,26	0,34	0,07	24,93	3,83	st-sm
4	6,09	0,34	0,07	0,02	6,37	1,95	t
5	6,05	0,28	0,85	0,07	45,84	1,87	m
6	5,88	0,24	0,30	0,04	23,13	2,45	st
7	5,60	0,25	0,85	0,07	45,91	1,97	m
8	5,50	0,43	0,37	0,06	26,95	2,81	sm
9	5,26	0,21	0,83	0,05	45,04	1,46	m
10	5,20	0,23	0,39	0,06	27,60	3,25	sm
11	5,01	0,16	0,05	0,02	4,84	2,00	t
12	4,99	0,29	0,40	0,04	28,66	2,02	sm
13	4,90	0,29	0,63	0,05	38,47	1,94	m-sm
14	4,77	0,36	0,58	0,09	36,50	3,41	sm-m
15	4,70	0,28	0,40	0,05	28,34	2,62	sm
16	4,40	0,36	0,39	0,06	27,73	3,00	sm
17	4,40	0,51	0,58	0,07	36,50	2,78	sm-m
18	4,00	0,23	0,41	0,05	28,79	2,55	sm
19	2,77	0,20	0,31	0,08	23,25	4,70	st-sm

Tabla 26.- Longitud relativa "arm ratio", índice centromérico y clasificación de cada par cromosómico de *V. rhomboides*.

M: media; DT: desviación típica

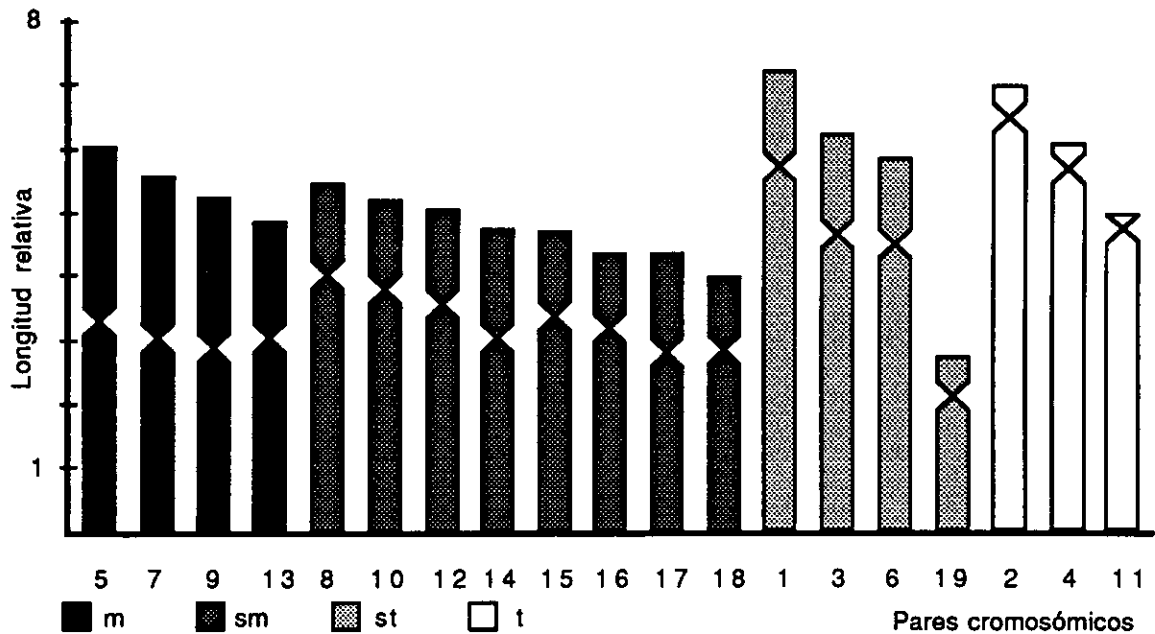


Figura 39.- Idiograma representativo del cariotipo de *V. rhomboides*, elaborado a partir de los valores de la longitud relativa e índice centromérico de cada par cromosómico.

Figura 40.- Cariotipo Ag-NOR de *R. philippinarum*, véase dos Ag-NORs en el par 18.
Barra = 5 μ m



Individuos	Frecuencia (%) de nucleolos/núcleo		Total núcleos	M
	1	2		
1	65,00	35,00	100	1,35
2	50,50	49,50	101	1,50
3	54,72	45,28	106	1,45
4	47,66	52,34	107	1,52
5	63,89	36,11	108	1,36

Tabla 27.- Frecuencia de nucleolos por núcleo y número medio de nucleolos por individuo (M) en *R. philipinarum*.

Figura 41.- Cromosomas de un individuo de *V. aurea* teñidos con Giemsa. **A** Cariotipo de una célula normal, $2n = 38$. **B** Cariotipo de una célula con 79 cromosomas. En ambos cariotipos, los cromosomas metacéntricos se encuentran en la primera línea y los no metacéntricos en las siguientes. Barra = 5 μm

A

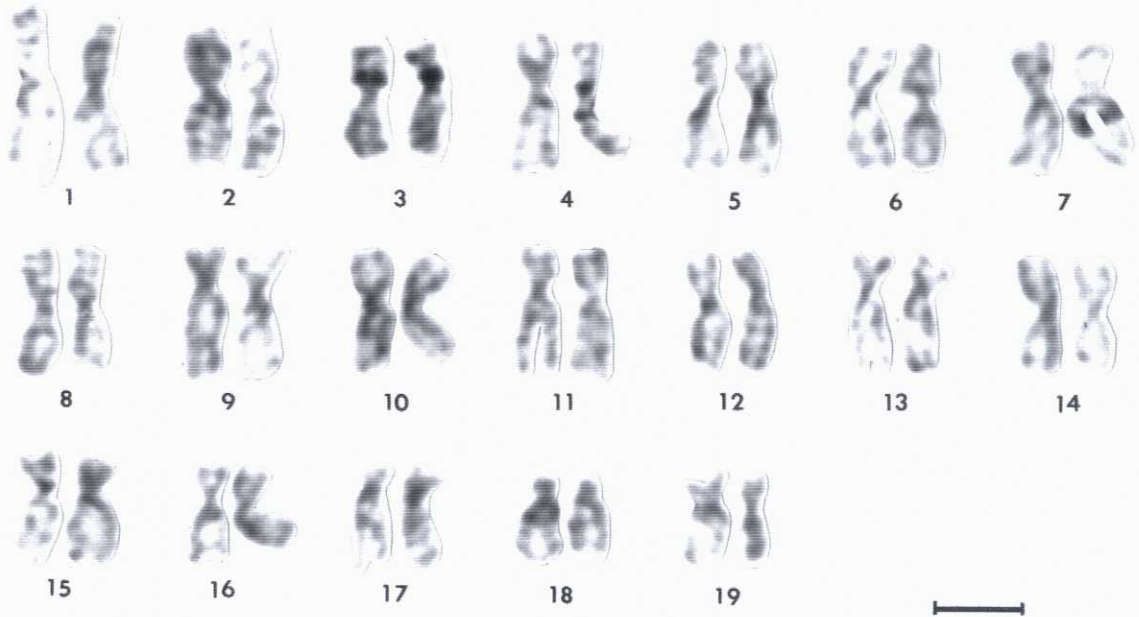
Handwritten text in a stylized font, consisting of two lines of characters.

B

I

Handwritten text in a stylized font, consisting of three lines of characters.

Figura 42.- Cariotipo Ag-NOR de *V. aurea*, véase dos Ag-NORs en el par 3. Barra = 5 μ m



4. DISCUSSION

Los datos cariológicos de las especies de bivalvos, referentes al número y a la morfología de los cromosomas, se presentan en una **tabla recopilativa** (véase **anexo**) en la que figuran las especies estudiadas, el método de obtención de los cromosomas, la dotación cromosómica, la constitución del cariotipo, el origen de los individuos y las referencias de los trabajos realizados.

4.1. NUMERO DE CROMOSOMAS

En la **familia Mytilidae** se conoce el número de cromosomas en un total de 25 especies; 10 de ellas presentan la dotación $2n = 28$ y en las restantes la dotación está comprendida entre $2n = 22$ y $2n = 32$. En el caso de los mejillones *M. galloprovincialis* y *M. edulis* varios autores coinciden en señalar $2n = 28$ y $n = 14$ (Lubet, 1959; Ahmed y Sparks, 1970; Ieyama e Inaba, 1974; Rasotto et al., 1981; Thiriote-Quévieux y Ayraud, 1982; Moynihan y Mahon, 1983; Dixon y Flavell, 1986; Pasantes et al., 1990), desestimándose la dotación $2n = 24$, $n = 12$ determinada por Menzel (1968a) en individuos de una población americana de *M. edulis*.

El número de cromosomas observados en este trabajo en *M. trossulus* corresponde a $2n = 28$, al igual que *M. galloprovincialis* y *M. edulis*. Los individuos de *P. perna* presentan la misma dotación, no observándose diferencias respecto a otras poblaciones de Venezuela y Brasil, analizadas anteriormente por Ahmed (1974) y Jacobi et al. (1990) respectivamente. Esta familia puede ser caracterizada por presentar un considerable rango de variación en el número de cromosomas entre las distintas especies.

En la **familia Ostreidae** se examinó el número de cromosomas en 22 especies y 21 de ellas presentan $2n = 20$, únicamente *Dendostrea folium* muestra un número diploide de $2n = 18$ (Ieyama, 1990). En los casos en los que el número de cromosomas se determinó en individuos de varias poblaciones: *C. angulata* (Menzel, 1968a; Thiriote-Quévieux, 1984c), *C. gigas* (Ahmed y Sparks, 1967; Longwell et al., 1967; Menzel, 1968a; Ahmed, 1973; Nadamitsu y Shinkawa, 1973; Ieyama e Inaba, 1974; Thiriote-Quévieux y Ayraud, 1982), *C. rhizophorae* (Longwell et al., 1967; Menzel, 1968a; Rodríguez-Romero et al., 1979c), *C. virginica* (Longwell et al., 1967; Menzel, 1968a; Ahmed, 1973; Rodríguez-Romero et al., 1978), *O. edulis* (Longwell et al., 1967; Ahmed, 1973; Thiriote-Quévieux y Ayraud, 1982; Thiriote-Quévieux, 1984c) y *O. lurida* (Ahmed y Sparks, 1967; Longwell et al., 1967; Ahmed, 1973) se señaló la misma dotación, no observándose tampoco diferencias en los individuos de *C. gigas* y *O. edulis* analizados en este trabajo.

El número de cromosomas de *O. puelchana* se determina aquí por primera vez, observándose $2n = 20$. En *O. denselamellosa* se determinó esta misma dotación, al igual que Ieyama e Inaba (1974) en individuos de una población japonesa. Estas dos especies presentan, por tanto, el mismo número de cromosomas que la mayoría de Ostreidae.

La familia **Cardiidae** cuenta únicamente con cuatro especies analizadas. Koulman y Wolff (1977) describen la dotación $2n = 38$ en individuos de *C. glaucum* y *C. edule* de varias poblaciones holandesas, pero en esta última especie Rasotto et al. (1981) observan 20 bivalentes en individuos de una población italiana. Estos mismos autores señalan también 20 bivalentes en *C. tuberculatum*, y Menzel (1968a) $2n = 24$ en la especie *Dinocardium robustum*.

Los resultados obtenidos en *C. edule* concuerdan con las observaciones de Koulman y Wolff (1977) respecto a la dotación $2n = 38$, pero en su trabajo no se hace referencia a la presencia de cromosomas supernumerarios, observados en las dos poblaciones analizadas en este trabajo.

En la familia **Veneridae** se determinó la dotación cromosómica de 12 especies, de las cuales 11 presentan $2n = 38$, pero en *Venus gallina* (= *Chamelea gallina*) Rasotto et al. (1981) distinguen 15 bivalentes en individuos de una población adriática, mientras que Corni y Trentini (1986) 19 bivalentes y 38 cromosomas mitóticos en individuos de otra población también del Adriático. En las especies en las que se analizaron distintas poblaciones: *Ruditapes decussatus* (Gerard, 1978; Rasotto et al., 1981; Borsa y Thiriót-Quévieux, 1990), *R. philippinarum* (Gerard, 1978; Ieyama, 1985; Borsa y Thiriót-Quévieux, 1990; Corni y Trentini, 1990) y *V. aurea* (Rasotto et al., 1981; Borsa y Thiriót-Quévieux, 1990; Corni y Trentini, 1990) no se observaron diferencias entre las poblaciones.

Las especies *V. pullastra* y *V. rhomboides* se analizan por primera vez en este trabajo y muestran igualmente un número diploide de $2n = 38$, confirmando por el momento la dotación característica de la familia.

A menudo se encuentran casos en los que el número de cromosomas descritos en una misma especie difiere según los autores. Aparte de los ya citados, se puede señalar la especie *Chlamys opercularis* (Pectinidae), en la cual Beaumont y Gruffydd (1974) determinan $2n = 26$ en individuos del Mar de Irlanda y Rasotto et al. (1988) $n = 14$ en individuos del Mar Adriático. También en *Mulina lateralis* (Mactridae), Menzel (1968a) señala $2n = 36$ y Wada et al. (1990) $2n = 38$ en individuos de varias poblaciones americanas. Estas diferencias deben ser

interpretadas con precaución puesto que pueden reflejar la existencia de un polimorfismo, pero también pueden estar provocadas por errores de la técnica utilizada.

En ninguna de las especies analizadas en este trabajo se detectaron variaciones en el número de cromosomas relacionadas con el determinismo del sexo. Esta apreciación concuerda con la ausencia de cromosomas sexuales en los bivalvos estudiados, señalada anteriormente por diferentes autores (Ahmed y Sparks 1973; Ahmed, 1974; Ieyama e Inaba, 1974; Wada, 1978; Thiriôt-Quévieux y Ayraud, 1982; Vitturi et al., 1983; Ieyama, 1985; Corni y Trentini, 1987).

Integrando los resultados obtenidos en este trabajo a la documentación general, el **número de cromosomas en bivalvos** se conoce en 170 especies pertenecientes a 33 familias. Si se expresan las dotaciones cromosómicas descritas como dotación haploide, el número de cromosomas está comprendido entre $n = 6$, observado en *Anomia ephippium* (Anomiidae) (Thiriôt-Quévieux, comunicación personal), y $n = 23$, observado en *Petricola pholadiformis* (Menzel, 1968a), sin tener en cuenta *Corbicula leana* (Nadamitsu y Kanai, 1978; Okamoto y Arimoto, 1986) y las especies de *Lasaea* con dotaciones cromosómicas particulares (Thiriôt-Quévieux et al., 1988a, 1989; O Foighil y Thiriôt-Quévieux, 1991; Thiriôt-Quévieux, 1992). La frecuencia del número de cromosomas en el total de especies analizadas se muestra en la **figura 43**; las dotaciones cromosómicas no se distribuyen uniformemente entre los valores extremos, distinguiéndose tres modas: $n = 10$, $n = 14$ y $n = 19$. Para precisar las características de estas modas, se detalla el número de especies analizadas por familia y su dotación en la **tabla 28**. La moda $n = 10$ agrupa la casi totalidad de las especies de Ostreidae y una especie de Gryphaeidae. Únicamente se encuentran dotaciones inferiores en dos especies de Anomiidae ($n = 6$ y $n = 7$), en una de Ostreidae ($n = 9$) y en otra de Gryphaeidae ($n = 9$). La segunda moda, $n = 14$, está constituida por 11 especies de Mytilidae, 7 de Pteriidae, 1 de Arcidae, 1 de Isognomonidae y 1 de Pectinidae. La tercera moda, $n = 19$, incluye 77 especies pertenecientes a 19 familias, encontrándose esta dotación en cuatro de las cinco subclases. La dotación $n = 20$ se señaló en una especie de Laternulidae (Thiriôt-Quévieux et al., 1991) y en una de Cardiidae (Menzel, 1968a), y $n = 23$ en una de Petricolidae (Menzel, 1968a). Las dotaciones situadas entre estas tres modas corresponden a especies de diferentes familias.

En varios grupos de moluscos se postuló una constancia en el número de cromosomas, de manera que pocas especies mostrarían una dotación cromosómica diferente a la observada en su grupo (Burch, 1965; Patterson, 1969). Respecto a los bivalvos, la uniformidad del número

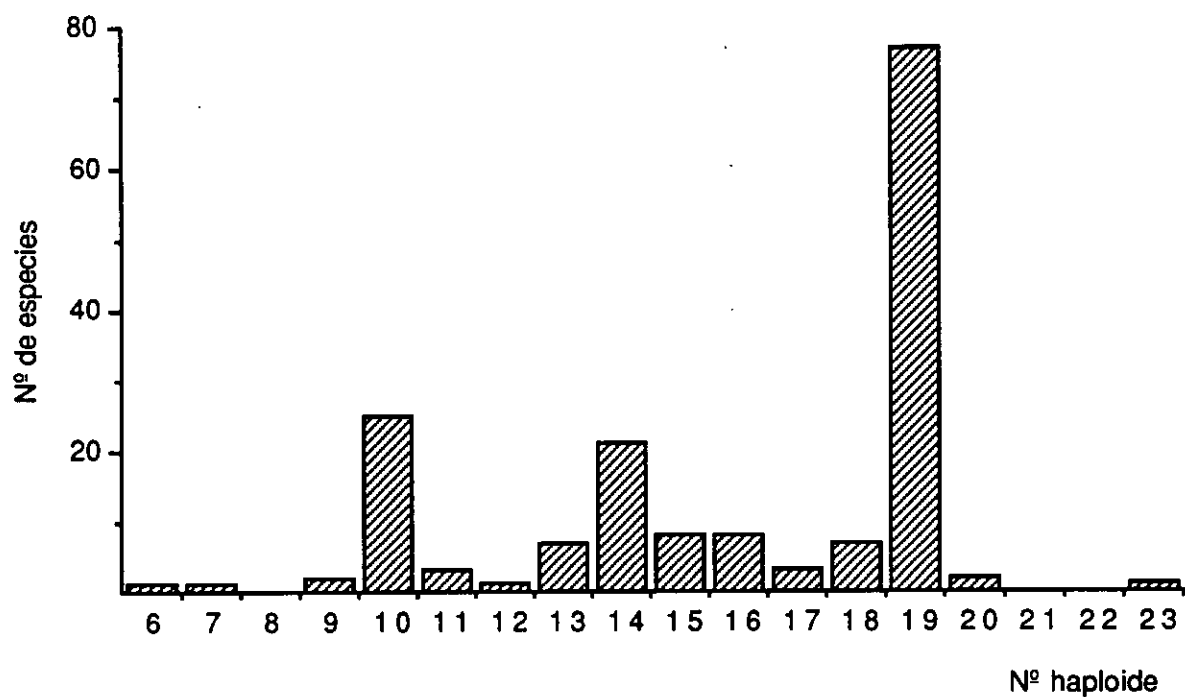


Figura 43.- Frecuencia del número de cromosomas en el total de especies analizadas de bivalvos.

Taxon	Total especies analizadas	Número haploide de cromosomas / Número de especies																						
		6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23					
Protobranchia																								
Malletiidae	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—
Yoldidae	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Solemyidae	2	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pteriomorpha																								
Mytilidae	26	—	—	—	—	—	1	—	3	11	7	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Arcidae	8	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	6	—	—	—	—	—	—	—
Pteridae	7	—	—	—	—	—	—	—	—	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Isognomonidae	3	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pinnidae	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Limidae	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Ostreidae	24	—	—	—	1	23	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gryphaeidae	2	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pectinidae	13	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	2	—	—	—	9	—	—	—	—	—	—	—
Anomiidae	3	1	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Palaeoheterodonta																								
Unionidae	21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Margaritiferae	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Heterodonta																								
Lasaeidae	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cyamiidae	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gaimardiidae	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Carditidae	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cardidae	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	—
Mactridae	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	5	—
Tellinidae	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—
Semelidae	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
Scrobiculariidae	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Donacidae	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
Corbiculidae	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 1
Pisidiidae	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Veneridae	14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	14
Petricolidae	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Myidae	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Pholadidae	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2 4
Teredinidae	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Anomalodesmata																								
Laternulidae	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	166	1	1	—	2	24	3	1	7	21	8	8	3	7	77	2	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabla 28.- Distribución del número de cromosomas por familia y número de especies analizadas (excluyéndose las especies poliploides).

de cromosomas se sugirió a nivel de familia o superfamilia (Menzel, 1968a; Patterson, 1969; Ieyama e Inaba, 1974; Ahmed, 1976). De acuerdo con los datos actuales, esta característica podría señalarse en las familias Ostreidae, Unionidae o Veneridae, pero en otras, como Mytilidae o Pectinidae, se observa una considerable variación. Teniendo en cuenta que el número de cromosomas se desconoce todavía en la mayoría de las especies, es prematuro considerar el monomorfismo cromosómico como una norma en las familias de bivalvos.

En base al número de cromosomas también se postularon varias generalidades respecto a las tendencias evolutivas en los moluscos. Algunos autores interpretan la evolución cromosómica como el resultado de un aumento del número cromosómico diploide, considerando las dotaciones diploides bajas como primitivas (Burch, 1965; Patterson, 1969). Esta misma hipótesis se propuso en otros grupos zoológicos como los mamíferos (Imai y Crozier, 1980). Para otros, al contrario, la evolución estaría acompañada por una disminución en el número de cromosomas (Butot y Kiauta, 1969; Ahmed, 1976; Viturri et al., 1982) y por una disminución de la cantidad de ADN nuclear (Hignegardner, 1974). Una tendencia similar se sugirió en equinodermos, copépodos y tunicados (Colombera y Lazzaretto-Colombera, 1978), anfibios (Morescalchi, 1971) o mamíferos (Freitas et al., 1983; Jotterand-Bellomo, 1984). En los bivalvos se propuso una tercera hipótesis, considerando un número base alrededor de $2n = 30$ (Ahmed, 1976), de forma que podrían darse las dos direcciones evolutivas, no solamente un aumento de cromosomas sino también una disminución (Nakamura, 1985).

Con el fin de probar estas hipótesis puede considerarse la subclase Pteriomorphia por presentar el mayor número de especies estudiadas. En esta subclase, la superfamilia Arcacea retiene la mayor parte de los caracteres primitivos, derivándose de ella las demás superfamilias: Mytilacea, Pteriacea, Pinnacea, Limacea, Ostreacea, Pectinacea y Anomiacea (Allen, 1985); por ello, su número de cromosomas podría aportar una idea sobre la evolución del número cromosómico. Sin embargo, las especies de Arcacea estudiadas no muestran el mismo número de cromosomas, observándose una especie con $2n = 28$, otra con $2n = 36$ y seis con $2n = 38$, planteando el problema de determinar el número ancestral. Si $2n = 38$ fuese el número ancestral, podría haber una tendencia a la disminución del número de cromosomas puesto que todas las especies analizadas de las superfamilias Mytilacea, Pteriacea, Pinnacea, Ostreacea y Anomiacea presentan una dotación inferior a $2n = 38$, pero, por otra parte, el valor del número de cromosomas como indicador del status evolutivo es cuestionado, ya que la dotación $2n = 38$ se encuentra también en especies de las superfamilias derivadas, Limacea y Pectinacea. Si se considera que el número ancestral es inferior a $2n = 38$, podría haber tanto un aumento como una disminución y, en este caso, la hipótesis de Nakamura (1985) parece presentar menos

dificultades para explicar el número de cromosomas en esta subclase; sin embargo, no existen evidencias de que el número base $2n = 30$, propuesto por Ahmed (1976), constituya el número ancestral.

El hecho de asumir la existencia de una única dirección en la evolución cromosómica, sea ésta de aumento o disminución del número de cromosomas, constituye una generalización descriptiva con escaso valor explicativo puesto que las dos tendencias no tienen por qué excluirse (Crisci y Stuessy, 1980; Qumsiyeh y Baker, 1988). Además, en las hipótesis propuestas se atribuye el número cromosómico primitivo a los taxones con caracteres morfológicos primitivos, pero se conoce, fundamentalmente en vertebrados, que la divergencia morfológica no siempre está correlacionada con la divergencia cromosómica (Baker y Bickham, 1980; Shields, 1982). Por otra parte, el número de cromosomas *per se* no representa la misma condición cariotípica, por lo que parece evidente que esta característica es insuficiente para establecer relaciones citotaxonómicas y filogenéticas, siendo necesario determinar el grado de relación de los cariotipos mediante el bandeo cromosómico.

4.2. ALTERACION DEL NUMERO DE CROMOSOMAS

Los **cromosomas supernumerarios o cromosomas B** son elementos adicionales a los miembros normales del complemento, no siendo homólogos de ninguno de ellos (White, 1973). Este tipo de cromosomas son muy frecuentes en plantas e insectos, pero también fueron descritos en platelmintos, crustáceos, anfibios, reptiles o mamíferos (véase revisión Jones y Rees, 1982). En moluscos únicamente fueron señalados en el gasterópodo *Helix pomatia* (Evans, 1960).

Los cromosomas B presentan características específicas, distintas a las del resto de cromosomas del complemento o cromosomas A, pudiendo variar su número entre células, tejidos, individuos o poblaciones. Durante la mitosis pueden presentar disyunción irregular de las cromátidas, provocando la aparición de células con distinto número de cromosomas B, y durante la meiosis no se aparean o muestran apareamiento inespecífico, produciéndose fenómenos de acumulación (Volobujev, 1980). Aunque el efecto de estos cromosomas no se analizó en todas las especies en las que fueron descritos, se sabe que no son indispensables para el crecimiento y desarrollo normal de los organismos. Pueden afectar al tamaño de las células, a la duración de la división celular, a la tasa de crecimiento, a la formación de quiasmas o al apareamiento de los cromosomas y, en general, en número elevado son perjudiciales, lo

cual contribuye a establecer el límite superior tolerado en los individuos de una especie (Jones y Rees, 1982).

C. edule es la única especie de los bivalvos analizados hasta ahora que presenta este tipo de cromosomas, pero es posible que no constituya un caso excepcional teniendo en cuenta el reducido número de especies estudiadas, sobre todo en la familia Cardiidae. El número de individuos examinados en este trabajo, así como el número de metafases en cada uno de ellos, no permiten determinar con exactitud la distribución de los cromosomas supernumerarios en las dos poblaciones analizadas. Sin embargo, el hecho de que los individuos de Baldayo muestren variabilidad inter e intraindividual respecto al número de cromosomas B, y los de la Ría del Pasaje únicamente variabilidad interindividual, sugiere la existencia de una cierta diferenciación entre ambas poblaciones.

Un caso de alteración del número de cromosomas, detectado con frecuencia en las especies de bivalvos, es la presencia de **células aneuploides**. Ahmed y Sparks (1970) señalan de 5 a 10% de metafases aneuploides en huevos y embriones de *M. edulis* y *M. californianus*; Dixon (1982) un 8% en embriones de una población no contaminada de *M. edulis* y un 26% en otra contaminada; Ahmed (1973) entre 5 y 10% en embriones de varias especies de *Crassostrea*; Longwell et al. (1967) de 1 a 47% en embriones de *C. virginica* y Wada et al. (1990) un 17 y 20% en huevos de dos poblaciones de *Mulina lateralis*. En el tejido branquial de individuos de cuatro poblaciones de *O. edulis* y cinco de *C. gigas*, Thiriot-Quévieux (1986) determina entre 9 y 34% de células aneuploides, señalándose también en otras especies de las familias Malletidae (Thiriot-Quévieux et al., 1987; 1991), Yoldiidae, Limidae (Thiriot-Quévieux et al., 1991), Cyamiidae, Gaimardiidae (Thiriot-Quévieux et al., 1988b), Carditidae (Thiriot-Quévieux et al., 1991), Tellinidae (Cornet y Soulard, 1990a), Semelidae (Cornet y Soulard, 1987), Scrobiculariidae (Cornet y Soulard, 1989), Donacidae (Cornet y Soulard, 1990b) y Laternulidae (Thiriot-Quévieux et al., 1991).

En este trabajo todas las especies en las que se contó el número de cromosomas muestran igualmente una cierta proporción de metafases caracterizadas por la ausencia de uno o varios cromosomas respecto a la dotación normal (*P. perna*, 11,29%; *O. denselamellosa*, 16,45%; *O. puelchana*, 10,65%; *C. edule*, 20%; *V. pullastra*, 27,95%; *V. rhomboides*, 21,05%). Aunque es posible que la pérdida de cromosomas sea provocada por efectos de la técnica, la relación positiva entre tasa de aneuploidía y contaminación puesta de manifiesto por Dixon (1982) en *M. edulis* y también la relación negativa entre tasa de aneuploidía y tasa de

crecimiento, detectada por Thiriot-Quévieux (1986) y Thiriot-Quévieux et al. (1988c; 1992) en *C. gigas*, sugieren la existencia de fenómenos reales de aneuploidía.

La presencia de un individuo triploide entre los ejemplares de *C. gigas* y *O. edulis* examinados aquí indica que también pueden ocurrir **fenómenos espontáneos de poliploidía**, derivados probablemente de la fecundación de un gameto no reducido ($2n$) y uno normal (n). Este tipo de fenómenos se señaló anteriormente en peces (Cuéllar y Uyeno, 1972; Ojima y Takai, 1979; Thorgaard y Gall, 1979) pero es la primera vez que se detecta en bivalvos. Teniendo en cuenta que los ejemplares analizados provienen de poblaciones cultivadas, queda por determinar si estos fenómenos ocurren también en la naturaleza.

La triploidía resulta ventajosa en el caso de las especies comerciales, realizándose numerosos trabajos para la obtención artificial de individuos triploides. Estos son generalmente estériles debido a los problemas asociados al apareamiento y distribución de los cromosomas durante la meiosis, por lo que la energía destinada a la reproducción podría ser utilizada para el crecimiento somático (Stanley et al., 1981). Además, la inducción de triploides en especies foráneas permite impedir la competencia con las especies nativas (Beaumont y Fairbrother, 1991).

En *C. virginica*, *C. gigas* y *M. edulis* se detectaron, en cortes histológicos de algunos individuos, **desórdenes en la proliferación de las células** sanguíneas, describiéndose una proporción anormalmente elevada de células en división y una gran cantidad de cromosomas (Farley, 1969a,b). Mediante citometría de flujo también se detectó, en el mismo tipo de células de algunos individuos de una población de *Mytilus*, un aumento progresivo de la cantidad de ADN, llegando a observarse una cantidad equivalente a $10n$ (Elston et al., 1990). Estos desórdenes son considerados de naturaleza neoplásica y son conocidos como neoplasia sanguínea o sarcomas diseminados. El incremento del número de cromosomas e incluso la poliploidización de las células neoplásicas es un fenómeno que puede ocurrir igualmente en tumores sólidos o leucemias agudas en humanos (Grouchy y Turleau, 1974).

En este trabajo se encontraron dos poblaciones celulares en el tejido branquial de un individuo de *V. aurea*, una constituida por células normales ($2n = 38$) y otra por células de dotación muy superior y un cariotipo particular (figura 41). Las metafases en las que se precisó el número de cromosomas presentan alrededor de 76, equivalente a la dotación $4n$, por lo que es posible que el incremento observado sea debido a la duplicación total del complemento, aunque no puede excluirse una replicación selectiva de algunos cromosomas. En cualquier

caso, parece evidente que la alteración del número fue acompañada por reorganizaciones cromosómicas puesto que aparecen nuevos tipos morfológicos y cromosomas de reducido tamaño, no identificados en el cariotipo de las células normales. Además, la existencia de variantes comunes en la población de células anormales, como es la presencia de un cromosoma subteloecéntrico o telocéntrico, sugiere que esta población pudo originarse a partir de una única célula aberrante. Estas alteraciones podrían ser también de naturaleza cancerosa y estar provocadas por una infección viral, radiaciones ionizantes o productos químicos.

4.3. MORFOLOGIA CROMOSOMICA Y CARIOTIPO

La morfología de los cromosomas, además de su número, puede ser utilizada como criterio preliminar para comparar especies y determinar el grado de divergencia en la composición de los cariotipos.

Los cariotipos establecidos en la familia **Mytilidae** de acuerdo con las medidas de los cromosomas figuran en la **tabla 29**. Las especies *Aulacomya ater regia*, *Brachidontes recurvus*, *Limnoperna fortunei kikuchii*, *Lithophaga curta*, *Modiolus auriculatus*, *Modiolus modiolus difficilis*, *Musculus cupreus* y *Vignadula atrata* presentan cariotipos característicos, diferenciables del resto de las especies por los tipos de cromosomas y/o la proporción de cada tipo. Lo mismo ocurre con las especies del género *Septifer*, pero los cariotipos de *S. bilocularis* y *S. excisus*, por una parte, y los de *S. keenae* y *S. virgatus*, por otra, muestran una gran similitud entre sí (Ieyama, 1983b). Las especies *Crenomytilus grayanus* y *Musculus laevigatus* difieren únicamente por la posición del centrómero de un par no metacéntrico y ambas presentan el mismo número de cromosomas y tipos morfológicos que *Mytilus*, aunque con una proporción inferior de metacéntricos. Según las medidas publicadas de los cromosomas, *M. coruscus*, *M. desolationis*, *M. edulis* y *M. galloprovincialis* muestran una proporción de metacéntricos entre 5 y 6 y un número variable de submetacéntricos y subteloecéntricos. Los individuos de varias poblaciones de *M. edulis* tienen el mismo número de metacéntricos pero difieren en cuanto a las proporciones descritas de submetacéntricos y subteloecéntricos, exceptuando la población irlandesa donde los subteloecéntricos están ausentes. Las poblaciones de *M. galloprovincialis* manifiestan el mismo tipo de variabilidad, pero en este caso una de las poblaciones, Villefranche-sur-Mer, también difiere por la proporción de cromosomas metacéntricos. Los mejillones de Seto (Japón) aunque fueron citados bajo el nombre específico de *M. edulis* (Ieyama, 1983a) corresponden a *M. galloprovincialis* por las características alozóimicas (Wilkins

Taxón	2n	Cariotipo	Localidad	Autor
<i>Aulacomya ater regia</i>	26	13 st	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux com. pers.
<i>Brachidontes recurvus</i>	30	15 sm	Tabasco, México	Diupotex-Chong et al. (1978)
<i>Crenomytilus grayanus</i>	28	4 m, 5 sm, 5 st	Hokkaido, Japón	leyama (1984b)
<i>Limnoperna fortunei kikuchii</i>	30	5 m, 8 sm, 2 st	Hyogo, Japón	leyama (1984b)
<i>Lithophaga curta</i>	32	10 m, 4 sm, 1 st, 1 t	Eime, Japón	leyama (1984b)
<i>Modiolus auriculatus</i>	32	6 m, 6 sm, 3 st, 1 t	Eime, Japón	leyama (1984b)
<i>Modiolus modiolus difcilis</i>	32	10 m, 5 sm, 1st	Hokkaido, Japón	leyama (1984b)
<i>Musculus cupreus</i>	30	8 m, 2 sm, 2 st, 3 t	Hiroshima, Japón	leyama (1984b)
<i>Musculus laevigatus</i>	28	4 m, 6 sm, 4 st	Hokkaido, Japón	leyama (1984b)
<i>Mytilus coruscus</i>	28	5 m, 3 sm, 6 st	Eime, Japón	leyama (1984b)
<i>Mytilus desolationis</i>	28	6 m, 3 sm, 5 st	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux (1984d)
<i>Mytilus edulis</i> *	28	5 m, 7 sm, 2 st	Seto, Japon	leyama (1983a)
<i>Mytilus edulis</i>	28	6 m, 8 sm	Galway, Irlanda	Moynihan y Mahon (1983)
<i>Mytilus edulis</i>	28	6 m, 4 sm, 4 st	Cultivados en Brest y Charrons, Francia	Thiriot-Quévieux (1984d)
<i>Mytilus edulis</i>	28	6 m, 5 sm, 3 st	Bahía Whitsand, Inglaterra	Dixon y Flavell (1986)
<i>Mytilus edulis</i>	28	6 m, 3 sm, 5 st	Bahía Robin Hood, Inglaterra	Dixon y Flavell (1986)
<i>Mytilus edulis</i>	28	6 m, 1 sm, 7 st	Wimereux, Francia	Presente estudio
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	28	5 m, 2 sm, 7st	Villefranche-sur-Mer, Francia	Thiriot-Quévieux (1984d)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	28	6 m, 7 sm, 1st	Venecia, Italia	Dixon y Flavell (1986)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	28	6 m, 5 sm, 3 st	Mera, Galicia	Pasantes et al. (1990)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	28	5 m, 3 sm, 6 st	Niza, Francia	Presente estudio
<i>Mytilus trossulus</i>	28	6 m, 2 sm, 6 st	Trosa, Suecia	Presente estudio
<i>Perna perna</i>	28	4 m, 2 sm, 4 st, 4 t	Sidi Fredj, Argelia	Presente estudio
<i>Septifer bilocularis</i>	26	4 m, 1 sm, 7 st, 1 t	Eime, Japón	leyama (1983b)
<i>Septifer excisus</i>	26	2 m, 3 sm, 7 st, 1 t	Eime, Japón	leyama (1983b)
<i>Septifer keenae</i>	28	5 m, 2 sm, 4 st, 3 t	Eime, Japón	leyama (1983b)
<i>Septifer virgatus</i>	28	4 m, 3 sm, 4 st, 3 t	Eime, Japón	leyama (1983b)
<i>Vignadula atrata</i>	22	5 m, 2 sm, 4 st	Seto, Japón	leyama (1977)

* *M. galloprovincialis*

Tabla 29.- Composición de los cariotipos descritos según las medidas de los cromosomas en la familia Mytilidae.

et al., 1983) y presentan la misma proporción de metacéntricos que la población de Villefranche-sur-Mer.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el cariotipo de los individuos de *M. galloprovincialis* no muestran diferencias importantes respecto al descrito por Thiriot-Quévieux (1984d), confirmándose la presencia de 5 pares metacéntricos y las diferencias respecto a las poblaciones de Venecia (Dixon y Flavell, 1986) y Galicia (Pasantes et al., 1990). El cariotipo de *M. edulis* presenta 6 pares metacéntricos, al igual que las demás poblaciones examinadas (Moynihan y Mahon, 1983; Thiriot-Quévieux, 1984d; Dixon y Flavell, 1986), pero difiere de todas ellas por la proporción de submetacéntricos y subtlocéntricos, y lo mismo ocurre con el de *M. trossulus*. Sin embargo, los cariotipos determinados aquí en estos dos *Mytilus* muestran proporciones similares de los tres tipos morfológicos. Si se compara gráficamente, por un lado, el intervalo de confianza de las medias de los índices centroméricos y, por otro, el de las medias de las longitudes relativas de cada par cromosómico (figura 44) se constata que en todos ellos los intervalos se solapan, a excepción del intervalo de confianza de las medias de las longitudes relativas del par más pequeño. Esto significa que los cariotipos no pueden ser asignados con exactitud a una u otra forma de mejillón. Con el fin de determinar más exactamente el grado de similitud entre estos dos *Mytilus*, se aplicó un test t a las medias de los índices centroméricos y a las de las longitudes relativas de cada par cromosómico (tabla 30), detectándose diferencias significativas (nivel de significación: 5%) entre las medias de uno o los dos parámetros en varios pares cromosómicos. El precisar la naturaleza de estas diferencias detectadas estadísticamente requiere un análisis más fino mediante otras técnicas citogenéticas que permitan la diferenciación longitudinal de los cromosomas.

En base a los tipos morfológicos descritos en los cariotipos, *M. desolationis* y la población de *M. edulis* de la Bahía de Robin Hood presentan la misma composición. También *M. galloprovincialis* de Galicia y la población de *M. edulis* de la Bahía de Whitsand muestran entre sí las mismas categorías cromosómicas, y ocurre lo mismo entre *M. coruscus* y la población de *M. galloprovincialis* examinada en este trabajo (tabla 29). En estos tres casos, las diferencias cariotípicas existentes radican únicamente en la posición relativa que ocupa cada tipo de cromosomas en el cariotipo. Sin embargo, en todos ellos la diferencia de tamaño entre pares consecutivos es pequeña, dificultando la distinción precisa de los cariotipos. Esto hace que si se tiene en cuenta la variabilidad interpoblacional descrita, en este género las diferencias entre poblaciones podrían ser del mismo orden que la detectada entre distintos taxones.

Los cromosomas de *P. perna* fueron examinados anteriormente en individuos de una población cultivada en Venezuela por Ahmed (1974) y en otra de Brasil por Jacobi et al. (1991),

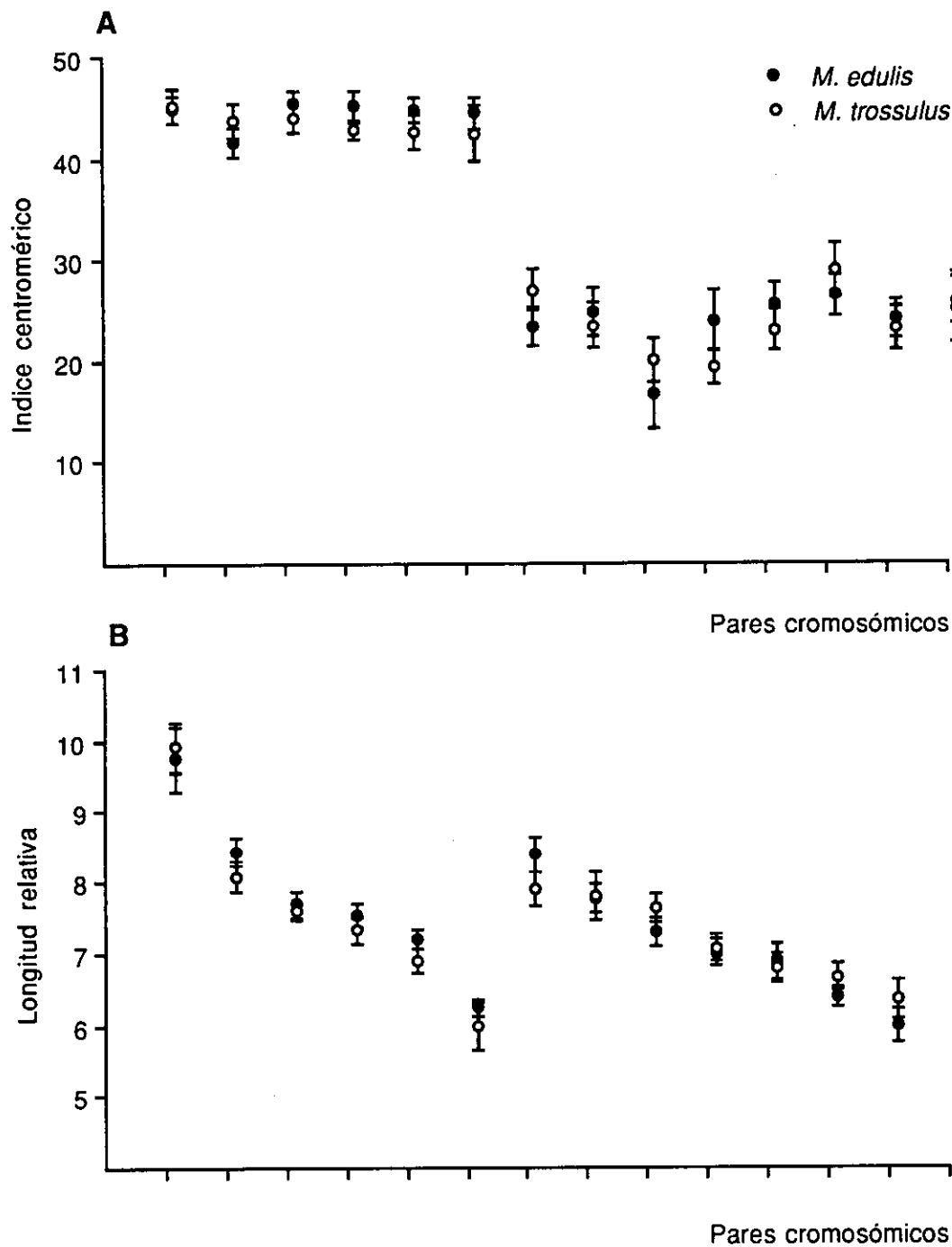


Figura 44.- Representación del intervalo de confianza de las medias de los Índices centroméricos (A) y de las longitudes relativas (B) de cada par cromosómico de *M. edulis* y *M. trossulus*. Los pares comparados se establecieron de acuerdo al criterio de tamaño decreciente, separándose los cromosomas metacéntricos y los no metacéntricos.

Par cromosómico		Índice Centromérico		Longitud Relativa	
<i>M. edulis</i>	<i>M. trossulus</i>	grad. libertad	ts	grad. libertad	ts
1	1	18	-0,35 n.s.	18	-0,65 n.s.
2	2	18	-2,12*	18	2,82*
5	6	18	1,71 n.s.	18	1,04 n.s.
6	7	18	3,05*	18	1,97 n.s.
8	9	18	2,43*	18	3,13*
12	13	18	1,47 n.s.	18	1,61 n.s.
3	3	18	-2,98*	18	3,23*
4	4	18	0,88 n.s.	18	-0,14 n.s.
7	5	18	-1,87 n.s.	18	-2,82*
9	8	18	3,00*	18	-0,60 n.s.
10	10	18	1,85 n.s.	18	-0,62 n.s.
11	11	18	-1,69 n.s.	18	-2,79*
13	12	18	0,81 n.s.	18	-2,25*
14	14	18	0,40 n.s.	18	-3,93*

n.s.: no significativo

* significativo, $P < 0,05$

Tabla 30.- Test t aplicado a las medias de los Índices centroméricos y de las longitudes relativas de cada par cromosómico de *M. edulis* y *M. trossulus*. Los pares comparados se establecieron de acuerdo al criterio de tamaño decreciente, separándose los cromosomas metacéntricos y los no metacéntricos.

pero estos autores describen de forma aproximada la composición del cariotipo. En este trabajo se identifican las categorías morfológicas de acuerdo con las medidas de los cromosomas, estableciéndose de una manera precisa la composición del cariotipo. Esta especie muestra la mayor proporción de cromosomas telocéntricos de la familia, lo que permite diferenciarla de las demás especies estudiadas.

En base a los datos existentes, la familia Mytilidae puede caracterizarse por una gran heterogeneidad; además de la variabilidad en el número de cromosomas, presenta desde cariotipos monomórficos hasta cariotipos en los que están representados las cuatro categorías morfológicas, observándose distintos grados de divergencia entre ellos. En lo que concierne al género *Mytilus*, las diferencias cariotípicas detectadas serán discutidas en un apartado posterior en relación a su taxonomía (página 126).

La familia **Ostreidae** se cita en la bibliografía como un ejemplo de familia conservativa debido a la uniformidad en el número de cromosomas y a la homogeneidad de los cariotipos, constituidos por metacéntricos y submetacéntricos (Ahmed, 1973; 1976). El análisis morfométrico de los cromosomas se efectuó en 7 especies (**tabla 31**) y, según los tipos morfológicos descritos, se pueden distinguir tres grupos de especies: *C. gigas* y *C. angulata*, cuyos cariotipos comprenden únicamente cromosomas metacéntricos; *C. corteziensis*, *C. rhizophorae*, *C. virginica* y *O. edulis*, en las cuales el cariotipo consta de metacéntricos y submetacéntricos; y, finalmente, *Dendostrea folium* que se diferencia de todas las demás por la ausencia de submetacéntricos y por presentar cromosomas telocéntricos, además de tener un número inferior de cromosomas. Las dos poblaciones estudiadas de *C. virginica* muestran el mismo cariotipo y las cuatro de *O. edulis* conservan una gran homogeneidad, a pesar de que en dos de ellas un par cromosómico tiene el centrómero en la región subterminal.

También se señalaron cariotipos con metacéntricos y submetacéntricos, sin precisión morfométrica, en *C. ariakensis* (Ieyama, 1975), *O. lurida* (Ahmed y Sparks, 1967), *C. glomerata*, *C. griphoides*, *C. tuberculata*, *C. rivularis* y *O. folium* (Ahmed, 1973).

En *O. denselamellosa*, Ieyama e Inaba (1974) diferencian metacéntricos y submetacéntricos en individuos de una población japonesa, pero sin precisar su número ni su posición en el cariotipo. Los resultados del presente estudio corroboran estas observaciones y concretan la proporción de 7 pares metacéntricos y 3 submetacéntricos. Esta especie muestra, por tanto, el modelo cariotípico de la mayor parte de los Ostreidae y las mismas proporciones de tipos morfológicos que las descritas en *C. corteziensis* (Rodríguez-Romero et al., 1979b) y en una especie de Gryphaeidae, *Hyotissa imbricata*, (Ieyama, 1990) perteneciente a la misma

Taxón	2n	Cariotipo	Localidad	Autor
<i>Crassostrea angulata</i>	20	10 m	Cultivada en Barfleur, Francia	Thiriote-Quiévreux (1984c)
<i>Crassostrea gigas</i>	20	10 m	Cultivada en Barfleur	Thiriote-Quiévreux (1984c)
<i>Crassostrea corteziensis</i>	20	7 m, 3 sm	Nayarit, México	Rodríguez-Romero et al. (1979b)
<i>Crassostrea rizophorae</i>	20	5 m, 5 sm	Varias localidades México	Rodríguez Romero et al. (1979c)
<i>Crassostrea virginica</i>	20	6 m, 4 sm	Conneticut, EE. UU.	Longwell et al. (1967)
<i>Crassostrea virginica</i>	20	6 m, 4 sm	Tabasco, México	Rodríguez-Romero et al. (1978)
<i>Dendostrea folium</i>	18	5 m, 2 st, 2 t	Bungo Chanel, Japón	Ieyama (1990)
<i>Ostrea denselamellosa</i>	20	7 m, 3 sm	Cultivada en La Tremblade Francia	Presente estudio
<i>Ostrea edulis</i>	20	5 m, 4 sm, 1 st	Cultivada en Barfleur, Francia	Thiriote-Quiévreux (1984c)
<i>Ostrea edulis</i>	20	5 m, 5 sm,	Saint-Vaast-la Hogue, Francia	Thiriote-Quiévreux (1984c)
<i>Ostrea edulis</i>	20	5 m, 4 sm, 1st	Quiberon, Francia	Thiriote-Quiévreux (1984c)
<i>Ostrea edulis</i>	20	5 m, 5 sm	Loumergat, Francia	Thiriote-Quiévreux (1984c)
<i>Ostrea puelchana</i>	20	4 m, 5 sm, 1 t	Cultivada en Ronce les Bains, Francia	Presente estudio

Tabla 31.- Composición de los cariotipos descritos según las medidas de los cromosomas en la familia Ostreidae.

superfamilia. El cariotipo de *O. puelchana* se analiza aquí por primera vez y consta de metacéntricos y submetacéntricos pero también de un par telocéntrico, por lo que resulta claramente diferenciable del resto de las especies estudiadas.

En el grupo de especies que presentan las mismas categorías morfológicas, la diferenciación cariotípica únicamente puede realizarse por la proporción de cromosomas de cada clase o por la posición que ocupa cada una en el cariotipo, teniendo este último criterio un débil poder diferenciador. Así, en *O. denselamellosa*, *C. corteziensis* e *H. imbricata*, los pares submetacéntricos representan (de acuerdo al criterio de tamaño decreciente) los pares 4, 6 y 9 en *O. denselamellosa* (tabla 16), los pares 2, 4 y 7 en *C. corteziensis* (Rodríguez-Romero et al., 1979b) y los pares 1, 7 y 8 en *H. imbricata* (Ieyama, 1990). En el caso de *C. gigas* y *C. angulata*, la similitud de los cariotipos apoya la hipótesis de Menzel (1974) que, basándose en criterios morfológicos, en la facilidad de hibridación y en la existencia de meiosis normales en los híbridos, sugiere que estas dos ostras son la misma especie, siendo *C. angulata* una subespecie de *C. gigas*.

A pesar de que existen algunas diferencias entre los cariotipos, se obtuvieron embriones híbridos en los cruzamientos *C. virginica* x *C. gigas*, *C. virginica* x *C. angulata*, *C. virginica* x *C. rhizophorae* (Menzel, 1968b) y *C. rivularis* x *C. virginica* (Ahmed, 1973), lo que demuestra la ausencia de incompatibilidad gamética entre estas especies. La proximidad cariotípica de varios Ostreidae, en cuanto al número de cromosomas y tipos morfológicos, podría indicar una mayor susceptibilidad para hibridar entre ellos.

La homogeneidad atribuida a esta familia (Ahmed 1973; 1976) conoce al menos dos excepciones: *Dendostrea folium* (Ieyama, 1990) y *O. puelchana*. Además, hay que tener en cuenta que los datos existentes están referidos sólo a algunas especies de tres géneros, de los 17 descritos en la revisión realizada por Harry (1985), siendo necesario el estudio de un mayor número de especies para caracterizar la familia.

En la familia **Cardiidae** no se había establecido el cariotipo de ninguna especie en base a las medidas de los cromosomas y, únicamente, Koulman y Wolff (1977) describen de manera aproximada la composición del cariotipo de *C. edule* de la costa holandesa (7 submetacéntricos, 7 subtlocéntricos y 5 telocéntricos).

El cariotipo establecido en este trabajo (12 submetacéntricos, 4 subtlocéntricos y 3 telocéntricos) corrobora la ausencia de cromosomas metacéntricos, pero difiere de la descripción de Koulman y Wolff (1977) en la proporción de los tipos morfológicos identificados.

Respecto a los cromosomas supernumerarios o B, una de las características morfológicas más comunes es su tamaño, inferior al del cromosoma más pequeño del complemento; aunque existen excepciones en las que son más grandes que muchos de los cromosomas A, como en algunas especies de insectos (Hewit, 1973). La posición del centrómero, sin embargo, varía de unas especies a otras (Jones y Rees, 1982). En el caso de *C. edule*, también muestran un tamaño inferior al de los cromosomas del complemento y el tipo morfológico podría corresponder a subtelocéntrico o telocéntrico (**figura 35 A**).

En la familia **Veneridae**, el análisis morfométrico de los cromosomas se realizó en 4 especies (**tabla 32**) y todas ellas pueden ser identificadas desde el punto de vista cariotípico por la composición específica de los tipos morfológicos. En la especie *R. philippinarum*, el análisis de dos poblaciones revela ligeras diferencias en la proporción de cromosomas metacéntricos y la presencia de un par subtelocéntrico en una de ellas. Los datos cariotípicos (sin precisión morfométrica) disponibles en otras tres especies, *Paphia varnicosa* y *Circe scripta* (Ieyama, 1980) y *Chamelea gallina* (Corni y Trentini, 1986), indican un predominio de cromosomas metacéntricos o submetacéntricos en sus complementos.

El cariotipo de *V. pullastra* se analiza por primera vez en este trabajo. Esta especie presenta la menor proporción de metacéntricos de todos los Veneridae estudiados y uno de los pares metacéntricos (par 6) se caracteriza por presentar una constricción secundaria. Este tipo de estructura también fue detectada en un par metacéntrico (par 3) de *V. aurea* (Borsa y Thiriot-Quévieux, 1990). Aunque los cariotipos de estas dos especies son claramente diferenciables, la similitud de estos dos pares cromosómicos, en cuanto al tamaño y a la morfología, sugiere que podría tratarse de un par común a ambas. El cariotipo de *V. rhomboides* también se describe aquí por primera vez. Al igual que *V. pullastra*, muestra una minoría de cromosomas metacéntricos, pero la característica más particular es la proporción de telocéntricos. El estudio de estas dos nuevas especies no modifica el criterio para diferenciar los miembros de la familia, puesto que todos los cariotipos pueden ser distinguidos por la proporción de cada categoría cromosómica, sobre todo por el número de metacéntricos y/o telocéntricos.

Las características cariotípicas de las especies *V. aurea*, *V. pullastra*, *V. rhomboides*, *R. decussatus* y *R. philippinarum*, pertenecientes a la subfamilia Tapetinae, pueden aportar un criterio adicional para clarificar las relaciones taxonómicas entre ellas. La taxonomía de esta subfamilia, basada exclusivamente en los caracteres morfológicos, varía según los autores y estas especies son citadas frecuentemente con distintos nombres específicos, incluyéndose en los géneros *Venerupis*, *Tapes* o *Ruditapes* (véanse sinónimos en Fischer-Piette y Métivier,

Taxón	2n	Cariotipo	Localidad	Autor
<i>Irus mitis</i>	38	14 m, 5 sm	Seto, Japón	Ieyama (1980)
<i>Ruditapes decussatus</i>	38	6 m, 3 sm, 10 st	Sète, Francia	Borsa y Thiriot-Quiévreux (1990)
<i>Ruditapes philippinarum</i>	38	10 m, 8 sm, 1 st	Hiroshima, Japón	Ieyama (1985)
<i>Ruditapes philippinarum</i>	38	9 m, 10 sm	Sète, Francia	Borsa y Thiriot-Quiévreux (1990)
<i>Venerupis aurea</i>	38	8 m, 9 sm, 1 st, 1 t	Sète, Francia	Borsa y Thiriot-Quiévreux (1990)
<i>Venerupis pullastra</i>	38	3 m, 8 sm, 8 st	Baldayo, Galicia	Presente estudio
<i>Venerupis rhomboides</i>	38	4 m, 8 sm, 4 st, 3 t	Ría de Arosa, Galicia	Presente estudio

Tabla 32.- Composición de los cariotipos descritos según las medidas de los cromosomas en la familia Veneridae.

1971; Partridge, 1977). De acuerdo con la última revisión de la subfamilia, realizada por Fischer-Piette y Métivier (1971), las especies *aurea* y *pullastra* pertenecen al género *Venerupis*, las especies *philippinarum* y *decussatus* al género *Ruditapes* y la especie *rhomboides* al género *Tapes*.

Para evaluar el grado de relación cariotípica de las cinco especies, se realizaron dos análisis a partir de los parámetros morfométricos, longitud relativa e Índice centromérico de los cromosomas (tablas 24, 25 y tablas 2, 3 y 4 de Borsa y Thiriou-Quévieux, 1990). En primer lugar se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) para retener la información más significativa, siendo los porcentajes de varianza explicada por los dos primeros componentes del 43,7 y 28,9%, respectivamente. Posteriormente se realizó una clasificación ascendente jerárquica a partir de las coordenadas de las especies en los ejes I y II del ACP. El dendrograma derivado de la clasificación jerárquica (figura 45) muestra que *V. pullastra* y *R. decussatus* son las especies más próximas, seguidas de *V. aurea*, mientras que *R. philippinarum* y *V. rhomboides* se separan de este grupo, y también entre ellas, considerablemente. En base a esta distribución, las especies podrían separarse en tres grupos: (i) *V. rhomboides*, (ii) *R. philippinarum* y (iii) *V. pullastra*, *R. decussatus* y *V. aurea*.

Respecto a la revisión taxonómica de Fischer-Piette y Métivier (1971) las relaciones cariotípicas, inferidas de los análisis realizados, confirman la separación de *R. philippinarum* y *V. rhomboides*, así como la inclusión de *V. aurea* y *V. pullastra* en el mismo género, pero en lo que se refiere a *R. decussatus*, los datos cariológicos muestran una mayor similitud con *V. aurea* y *V. pullastra*.

Por otro lado, *V. aurea*, *R. decussatus* y *V. pullastra*, teniendo características cromosómicas más próximas, podrían considerarse más idóneas para experiencias de hibridación interespecífica que *R. philippinarum* y *V. rhomboides* cuyos cariotipos son más diferentes.

Con el fin de dar una visión general sobre las **características de los cariotipos establecidos en bivalvos**, puede utilizarse el número fundamental para representar el cariotipo de una especie. Sin embargo, no puede efectuarse una comparación de cariotipos, representados por su número fundamental, sin tener en cuenta el número de cromosomas. Por ello, se construyó un gráfico en el que figura la dotación haploide de las especies en el eje de abscisas y el número fundamental en el eje de ordenadas (figura 46); de esta manera, el cariotipo de la especie "i" se representa por un punto que corresponde al par de coordenadas (x_i, y_i) . Siguiendo el criterio de Nakamura (1985), a los cromosomas metacéntricos/

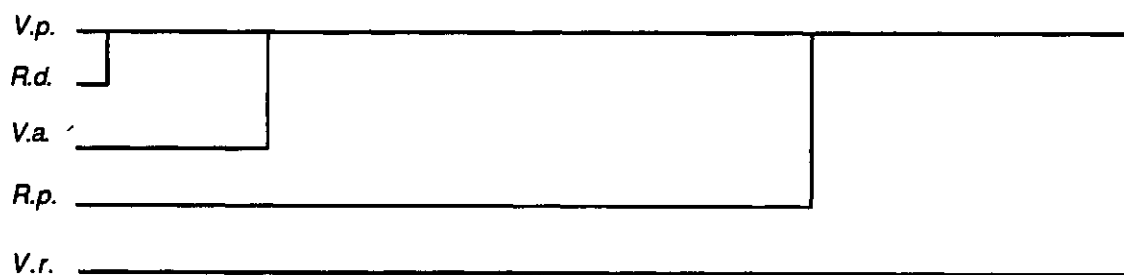


Figura 45.- Dendrograma derivado de la clasificación ascendente jerárquica. *V.p.*: *V. pullastra*; *R.d.*: *R. decussatus*; *V.a.*: *V. aurea*; *R.p.*: *R. philippinarum*; *V.r.*: *V. rhomboides*.

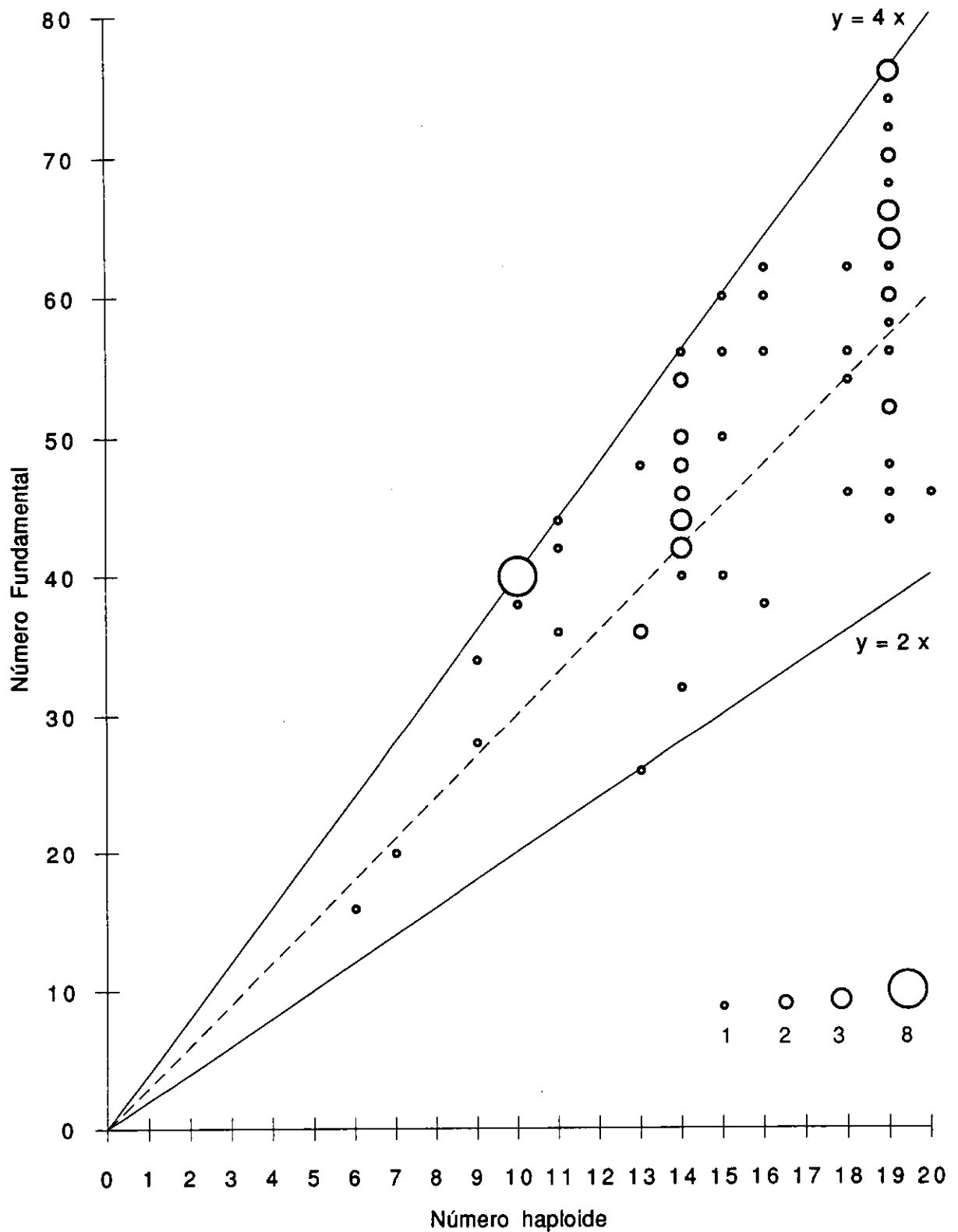


Figura 46.- Distribución del total de cariotipos de bivalvos descritos (morfométricamente) en base al número haploide de cromosomas y al número fundamental. El tamaño de los círculos representa al número de especies.

submetacéntricos se les asignó un valor de 4 y a los cromosomas subtelo-céntricos/telo-céntricos de 2; así, si todos los cromosomas de un cariotipo son metacéntricos o submetacéntricos $y = 4x$, mientras que si todos son subtelo-céntricos o telo-céntricos $y = 2x$. Estas dos fórmulas constituyen al mismo tiempo la ecuación de dos rectas tipo que determinan el límite superior e inferior del gráfico, delimitando el área en la que pueden localizarse los puntos de todos los cariotipos posibles; la recta intermedia, definida por la ecuación $y = 3x$, representa los cariotipos con igual número metacéntricos/submetacéntricos y subtelo-céntricos/telo-céntricos. De este modo, los puntos situados entre la recta superior y la recta intermedia corresponden a cariotipos en los que predominan los cromosomas metacéntricos/submetacéntricos y los puntos localizados entre la recta intermedia y la inferior en los que predominan los subtelo-céntricos y telo-céntricos. La totalidad de los puntos representados corresponde a las 74 especies, pertenecientes a 25 familias, en las que se realizaron las medidas de los cromosomas. En la figura puede observarse una distribución desigual en las dos regiones; encontrándose 14 especies en la recta superior, 39 en la región superior, 4 en la recta intermedia, 16 en la región inferior y 1 en la recta inferior. Teniendo en cuenta que algunas familias están representadas por una o muy pocas especies, la descripción de la figura se hace por superfamilia; los puntos situados en la recta $y = 4x$ pertenecen a las superfamilias Solemyacea, Mytilacea, Arcacea, Pteriacea, Ostreacea y Veneracea; los de la región superior a las superfamilias Nuculacea, Solemyacea, Mytilacea, Pteriacea, Limacea, Ostreacea, Pectinacea, Leptonacea, Cyamiacea, Cardiacaea, Tellinacea, Veneracea y Pholadacea; los situados en la línea intermedia a las superfamilias Mytilacea, Arcacea; los de la región inferior a las familias Mytilacea, Pteriacea, Pectinacea, Anomiacea, Cyamiacea, Carditacea, Tellinacea, Veneracea, Pholadacea y Pandoracea; y la especie situada en la recta $y = 2x$ a la superfamilia Mytilacea.

Tomando la precaución de considerar que no todas las superfamilias están representadas por el mismo número de especies, de acuerdo con la información actual se constata que en varias superfamilias (Mytilacea, Pteriacea, Pectinacea, Cyamiacea, Tellinacea y Veneracea) las especies muestran cariotipos con predominio de uno u otro tipo de cromosomas (metacéntricos/submetacéntricos o subtelo-céntricos/telo-céntricos). Sin embargo, esta visión general pone de manifiesto que, independientemente del número de cromosomas, los cariotipos de los bivalvos estudiados constan de una mayoría de cromosomas metacéntricos o submetacéntricos.

4.4. BANDEO CROMOSOMICO

4.4.1. REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

La detección de los NORs mediante la técnica de impregnación argéntica depende principalmente de dos factores: de la actividad transcripcional durante la interfase precedente, de manera que sólo se tiñen los NORs activos (Miller et al., 1976a,b; Howell, 1977); y del tamaño, si los genes ribosómicos están dispersos en copias simples o en pequeños grupos la intensidad de tinción puede resultar insuficiente para ser visualizados citológicamente (Goodpasture y Bloom, 1975). En el presente trabajo, esta técnica permitió la detección efectiva de los NORs en los cromosomas metafásicos y de los nucleolos en el núcleo interfásico de *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus*, *P. perna*, *C. gigas*, *O. edulis*, *O. denselamellosa*, *O. puelchana*, *R. philippinarum* y *V. aurea*, mientras que en las especies *C. edule* y *V. pullastra* sólo permitió la detección de los nucleolos.

El número y distribución de los Ag-NORs en las especies analizadas en este trabajo se muestra en la **tabla 33**. Los mejillones *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus*, y las ostras *O. edulis*, *O. denselamellosa* y *O. puelchana* muestran más de un par de cromosomas portadores de organizadores nucleolares (NORs múltiples), mientras que *P. perna*, *C. gigas*, *R. philippinarum* y *V. aurea* revelan un único par (NOR simple).

En *M. galloprovincialis* los Ag-NORs se identificaron en los pares 6 y 10, en *M. edulis* en los pares 4 y 10 y en *M. trossulus* en los pares 4, 10 y 7, todos ellos subtelocéntricos exceptuando el par 7 de *M. trossulus* que es metacéntrico. En ambos tipos de cromosomas, los Ag-NORs se encuentran en los telómeros, localizándose en el brazo largo de los cromosomas subtelocéntricos y en uno de los brazos del par metacéntrico. *M. galloprovincialis* podría diferenciarse, por tanto, de *M. edulis* y *M. trossulus* por la posición relativa que ocupa uno de los pares Ag-NOR (par 6) en el cariotipo. Sin embargo, en los tres mejillones el tamaño cromosómico disminuye progresivamente, existiendo pequeñas diferencias de tamaño entre los pares próximos. Por ello, se realizó un análisis de varianza para determinar si los cromosomas Ag-NORs subtelocéntricos de los tres *Mytilus* se diferencian morfológicamente. Este análisis se aplicó a los valores de la longitud relativa e índice centromérico de los cromosomas Ag-NORs subtelocéntricos de las células analizadas morfométricamente, efectuándose dos análisis para cada par portador; por una parte, con los valores de la longitud relativa y, por otra, con los

Taxón	Nº individuos	Nº metafases examinadas	Nº Ag-NORs observados	Posición Ag-NORs
<i>M. galloprovincialis</i> (2n = 28)	42	71	4 (pares 6, 10)	Terminal brazo largo, subtelocéntrico
<i>M. edulis</i> (2n = 28)	20	73	4 (pares 4, 10)	Terminal brazo largo, subtelocéntrico
<i>M. trossulus</i> (2n = 28)	16	84	5 (pares 4, 7, 10)	Terminal brazo largo, subtelo- céntrico y metacéntrico
<i>P. pema</i> (2n = 28)	4	25	2 (par 4)	Terminal brazo corto telocéntrico
<i>C. gigas</i> (2n = 20)	18	91	2 (par 10)	Terminal, metacéntrico
<i>O. edulis</i> (2n = 20)	22	79	4 (pares 9, 10)	Terminal brazo largo, subme- tacéntrico
<i>O. denselamellosa</i> (2n = 20)	53	152	3 (pares 3, 8)	Terminal, metacéntrico
<i>O. puelchana</i> (2n = 20)	14	106	3 (pares 2, 4)	Terminal brazo corto, submetacéntrico
<i>R. philippinarum</i> (2n = 38)	17	32	2 (par, 18)	Terminal, metacéntrico
<i>V. aurea</i> (2n = 38)	4	29	2 (par 3)	Interstitial, metacéntrico

Tabla 33.- Sumario de los resultados Ag-NOR en las especies de bivalvos estudiados.

valores del índice centromérico (tabla 34). Los cuatro análisis de varianza no revelan diferencias significativas entre las medias de las longitudes relativas ni de los índices centroméricos en ninguno de los dos pares cromosómicos portadores de organizadores nucleolares. Por tanto, puede considerarse que los tres *Mytilus* presentan genes ribosómicos en los mismos cromosomas, diferenciándose únicamente *M. trossulus* por mostrar Ag-NORs en otro par (par 7).

En individuos de *M. edulis* de una población inglesa, Dixon et al. (1986) identificaron, aparentemente, cuatro pares portadores de organizadores nucleolares. De acuerdo con estos autores, los NORs se localizan en los telómeros de un brazo de un par metacéntrico (par 1), en los del brazo largo de dos pares subtelocéntricos (pares 4 y 10) y en los de un par submetacéntrico (par 14), ordenándose los cromosomas por tamaño decreciente. En su trabajo, sin embargo, se presenta una composición fotográfica en la que los autores diferencian un cromosoma NOR en los pares 1, 4 y 10. La confirmación de estos resultados pondría en evidencia variaciones interpopulacionales en relación al número y distribución de los NORs en *M. edulis*.

La especie *P. perna* muestra un único par de Ag-NORs, localizados en el par 4 (telocéntrico-subtelocéntrico), por lo que las diferencias observadas con los mejillones en la composición del cariotipo son reforzadas por la distribución de los genes ribosómicos.

Los cuatro Ostreidae presentan Ag-NORs en posición telomérica pero manifiestan diferencias en cuanto al número y tipo de cromosomas portadores. En *C. gigas* y *O. edulis* los Ag-NORs se encuentran en los cromosomas más pequeños del complemento, pero en la primera especie el único par portador (par 10) es metacéntrico, mientras que en la segunda los dos pares portadores (pares 9 y 10) son submetacéntricos. Los Ag-NORs de *O. denselamellosa* se localizan en los pares metacéntricos 3 y 8, y en *O. puelchana* en los pares submetacéntricos 2 y 4; aunque el par 3 de *O. denselamellosa* y los dos pares de *O. puelchana* muestran un tamaño similar, pueden ser diferenciados por la posición del centrómero. En estas especies, los NORs ocupan posiciones específicas en los cariotipos, permitiendo considerar los cromosomas portadores como marcadores para su diferenciación.

En la familia Veneridae, *R. philippinarum* muestra un par de Ag-NORs al igual que *V. aurea*, pero las dos especies se distinguen por la localización de los Ag-NORs y por la posición relativa de los cromosomas portadores en el cariotipo; en *R. philippinarum* el Ag-NOR es terminal en un brazo de un par metacéntrico de menor tamaño (par 18), mientras que en

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Par subtelocéntrico 1				
Longitud relativa				
Entre grupos	2	0.150	0.08	1,30 n.s.
Dentro grupos	28	1.619	0.06	
Total	30	1.770		
Índice centromérico				
Entre grupos	2	47.225	23.61	1,55 n.s.
Dentro grupos	28	425.595	15.20	
Total	30	472.820		
Par subtelocéntrico 2				
Longitud relativa				
Entre grupos	2	0.023	0.01	0,32 n.s.
Dentro grupos	41	1.429	0.03	
Total	43	1.452		
Índice centromérico				
Entre grupos	2	27.393	13.70	1,38 n.s.
Dentro grupos	41	407.577	9.94	
Total	43	434.970		

n.s.: no significativo

Tabla 34.- Análisis de varianza aplicado a los valores de la longitud relativa e índice centromérico de los cromosomas Ag-NORs subtelocéntricos de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus*. El par subtelocéntrico 1 representa los cromosomas pertenecientes al par 6 en *M. galloprovincialis* y al par 4 en *M. edulis* y *M. trossulus*. El par subtelocéntrico 2 representa los cromosomas del par 10 en los tres mejillones.

V. aurea se localiza intersticialmente en un par metacéntrico de mayor tamaño (par 3). Al igual que ocurre en las ostras, la distribución de los Ag-NORs en estas dos almejas es característica para cada especie.

En el caso de *C. edule* y *V. pullastra*, la tinción con nitrato de plata revela sólo los nucleolos en el núcleo interfásico. Considerando el número de nucleolos observados (tablas 23 y 25) podría esperarse un par de cromosomas NOR en estas especies. Por otro lado, la presencia de una constricción secundaria en el par 6 de *V. pullastra* sugiere igualmente que los NORs podrían localizarse en esta región, pero teniendo en cuenta que la asociación NORs-constricciones secundarias no siempre es observada (Hsu et al., 1975; King, 1980), la distribución de los NORs deberá ser determinada por otras técnicas.

La variabilidad interespecífica observada en este trabajo concuerda con la descrita en otros organismos (Gold, 1984) y afecta al número de NORs por genoma, a la posición de éstos en los cromosomas y al tipo de cromosomas portadores.

La distribución de los NORs puede presentar desde un patrón conservativo como el descrito en varias de especies de anfibios (Schmid, 1980b: *Rana*; Mahony y Robinson, 1986: Myobatrachidae), reptiles (King y King, 1975: *Varanus*) o peces (Oberdorff, 1990: *Synodontis*) hasta un patrón variable, llegando a detectarse diferencias entre subespecies como en el caso del mamífero *Mus musculus* (Winking et al., 1980) o entre razas como en el insecto *Steropleurus martorelli* (Fernández-Piqueras et al., 1983). Así, el análisis de este tipo de variabilidad puede aportar información sobre las reorganizaciones cromosómicas y clarificar las relaciones entre las especies (Mahony y Robinson, 1986, Philipps et al., 1986, Gold y Amemiya, 1986, Amemiya y Gold, 1990).

Cuando el número de NORs es considerado desde un punto de vista evolutivo, en la mayor parte de los vertebrados, un cariotipo con un único par de cromosomas NOR podría representar un carácter más primitivo que el que posee NORs múltiples (Hsu et al., 1975; Schmid, 1978a,b). Además, en peces de la familia Cyprinidae, Gold y Amemiya (1986) y Amemiya y Gold (1990) proponen la hipótesis de que un NOR simple, localizado terminalmente en el brazo corto de un cromosoma "acrocéntrico" de pequeño tamaño, representa un carácter pleisiomórfico, mientras que todos los demás casos (NORs múltiples, NORs intersticiales, NORs en cromosomas metacéntricos o submetacéntricos y NORs en cromosomas grandes) son apomórficos. En el caso de los bivalvos la interpretación evolutiva resulta por el momento

aventurada, por lo que es necesario conocer la distribución de los NORs en un mayor número de especies para determinar la validez de estas hipótesis en estos organismos.

Además de las diferencias interespecíficas, la tinción de los NORs con nitrato de plata revela a menudo diferencias intraespecíficas que afectan al número de Ag-NORs por célula y al tamaño de los Ag-NORs de cromosomas homólogos (Gold, 1984).

La variabilidad intercelular en el número de Ag-NORs fue señalada en los moluscos gasterópodos *Tricolia speciosa* y *Buccinum corneum* (Vitturi y Catalano, 1989, 1990) y *Helicella virgata* (Vitturi et al., 1991), así como en diferentes especies de insectos (Czaker, 1978; Mansueto y Vitturi, 1989), peces (Thode et al., 1983, Gold, 1984; Phillips e Ihssen, 1985; Sola et al., 1988) o mamíferos (Goodpasture y Bloom, 1975; Di Bernardino et al., 1981; Mayr et al., 1987; Kopp et al., 1988). En las especies con NORs múltiples el número de Ag-NORs varía de una célula a otra alrededor de un número modal que generalmente es inferior al número absoluto de NORs (Howell et al., 1975; Di Bernardino et al., 1981) y cada individuo muestra una distribución característica (Goodpasture y Bloom, 1975; Varley, 1977; Volleth, 1987).

Las especies con NORs múltiples, analizadas en este trabajo, muestran con frecuencia un número variable de Ag-NORs entre las células de un mismo individuo, variando al mismo tiempo su distribución en los cromosomas portadores. En las especies con NORs simples también se detecta variabilidad intercelular aunque en menor grado. Este tipo de variabilidad se manifiesta igualmente en el núcleo interfásico, de manera que ninguno de los individuos analizados presenta el mismo número de nucleolos en todas las células, variando entre el mínimo y el máximo número de Ag-NORs observados en los cromosomas metafásicos de cada especie. El número más frecuente, incluso en las especies con NORs múltiples, corresponde a 1 ó 2 nucleolos por núcleo. Sin embargo, la variabilidad del número de nucleolos y la baja frecuencia del número máximo de nucleolos podría deberse, en parte, a la fusión de dos o más NORs en un único nucleolo, sugerida por varios autores (Schmid, 1982; Goldman et al., 1983; Thode et al., 1983).

En todas las especies con NORs múltiples más del 50% de las células muestran un número de Ag-NORs inferior al número máximo de Ag-NORs detectados (**tablas 4, 7, 10, 14, 17 y 20**). Considerando que la tinción con nitrato de plata tiñe únicamente los NORs activos transcripcionalmente en la interfase precedente (Miller et al., 1976a,b; Howell, 1977), no es posible determinar si este tipo de heteromorfismo representa una variabilidad en la expresión de los NORs o una variabilidad en su número. Sin embargo, al ser observado entre las células de un individuo, parece más probable que sea provocado por una actividad transcripcional

diferencial más que a diferencias en el número de organizadores nucleolares entre las células somáticas de un individuo.

Si se compara la frecuencia de Ag-NORs (Ag-NORs en homocigosis + Ag-NORs en heterocigosis) en los dos pares portadores de cada especie, uno de los pares presenta Ag-NORs con mayor frecuencia que el otro. Así, en *M. galloprovincialis* la diferencia entre los dos pares es del 21,13%, en *M. edulis* del 16,44% y en *M. trossulus* la diferencia entre los pares subtelocéntricos es del 22,62% mientras que la diferencia entre éstos y el par metacéntrico es todavía mayor (figuras 5, 9 y 14). De la misma manera, la diferencia entre los dos pares en *O. edulis* es del 41,78%, en *O. denselamellosa* del 30,92% y en *O. puelchana* del 13,16% (figuras 24, 29 y 33). Esto sugiere la posible existencia de un mecanismo de control celular responsable de la activación de los NORs, puesto que si la activación de éstos fuese al azar se esperaría una proporción similar en los pares portadores. La activación no aleatoria de los organizadores nucleolares es un fenómeno señalado en otros organismos (Díez y Puertas, 1986; Sentís et al., 1988; Sánchez et al., 1989; Monteagudo y Arruga, 1991), detectándose por otro lado la existencia de dominancia nucleolar en híbridos interespecíficos (Cassidy y Blackler, 1974; Durica y Krider, 1977; Cermeño et al., 1984; Lacadena et al., 1984), e incluso en híbridos interraciales (Santos et al., 1990). Sin embargo, la determinación de las relaciones de actividad entre los cromosomas NOR requiere el análisis de un gran número de células por individuo, raramente obtenidas en las especies de bivalvos.

La variabilidad respecto al tamaño de los Ag-NORs de cromosomas homólogos constituye un heteromorfismo descrito a menudo en vertebrados, detectándose en anfibios (Schmid, 1978a,b; 1982), reptiles (Bickham y Rogers, 1985), peces (Howell y Black, 1979; Foresti et al., 1981; Moreira Filho et al., 1984; Phillips et al., 1986; Sánchez et al., 1990; Martínez et al., 1991) o mamíferos (Markovic et al., 1978). Este tipo de heteromorfismo comprende desde simples diferencias de tamaño entre los depósitos de nitrato de plata, que pueden oscilar del doble a seis veces el tamaño del otro (Foresti et al., 1981), hasta duplicaciones o triplicaciones en tándem, distinguiéndose en este caso regiones Ag-negativas entre los Ag-NORs, y aunque más raramente puede llegar a detectarse una delección completa del NOR (Schmid, 1982).

En general este heteromorfismo es atribuido a una diferencia en el número de genes ribosómicos entre los dos cromosomas homólogos y, de hecho, las técnicas de hibridación *in situ*, aplicadas sobre todo en anfibios, revelaron diferente cantidad de genes ARNr entre homólogos (Macgregor et al., 1977; Nardi et al., 1978). Aunque no existen evidencias

experimentales, la variación del tamaño de los NORs podría deberse a intercambios no recíprocos de segmentos entre las cromátidas durante la meiosis (Foresti et al., 1981; Schmid et al., 1982) e incluso a duplicaciones accidentales o alteraciones en la replicación del ADN (Gold, 1979). Sin embargo, Schmid (1980c) sugiere que la diferencia de tamaño podría depender del número de genes, pero también del número de genes activos en cada cromosoma. Además, en casos de amplificación del ADNr se demostró que no todos los genes ribosómicos del segmento amplificado son activos (Miller et al., 1979; Tantravahi et al., 1981; Velázquez et al., 1991), aportando evidencias de que la variación del tamaño puede estar provocada por diferencias en el número de genes activos transcripcionalmente.

Entre los bivalvos estudiados en este trabajo, varios individuos de *C. gigas* muestran en algunas células Ag-NORs de distinto tamaño entre los cromosomas homólogos. Estas diferencias no parecen duplicaciones en tándem puesto que no se observaron bloques Ag-negativos y, contrariamente a la mayor parte de las especies que presentan este heteromorfismo, la variación del tamaño no se observa en todas las células de un individuo. Esta variabilidad intercelular sugiere que este heteromorfismo podría estar provocado por variaciones en el número de genes activos entre los dos homólogos, aunque esto no excluye que puedan existir diferencias en el número de cistrones ribosómicos. Únicamente las técnicas de hibridación *in situ* o la utilización de compuestos que reaccionen de forma directa con el ADN podrán determinar la naturaleza de la variabilidad detectada.

Aparte de los heteromorfismos citados, puede señalarse otro tipo de variación consistente en la presencia de Ag-NORs adicionales. Un individuo de *M. trossulus* y otro de *O. edulis* muestran un Ag-NOR no identificado en ningún otro individuo, localizándose en los telómeros del brazo corto del par 10 (subtelocéntrico) y en los telómeros del brazo corto del par 6 (submetacéntrico), respectivamente. La presencia de Ag-NORs adicionales fue detectada ocasionalmente en algún individuo de otros grupos, como en el insecto *Pycnogaster cucullata* (Sentis et al., 1988) o en el anfibio *Pyxicephalus adspersus* (Schmid, 1980c). En el primer caso se relacionó con la existencia de NORs latentes, raramente activos; mientras que en el segundo se relacionó con una translocación ocurrida en uno de los progenitores. Sin embargo, tampoco pueden excluirse posibles variaciones interindividuales en el número y localización de los loci ribosómicos, demostrándose mediante hibridación *in situ* en el anfibio *Triturus vulgaris meridionalis*, que los genes ARNr pueden localizarse no sólo en los NORs detectados en todos los individuos, sino también en lugares adicionales cuya distribución es característica de cada individuo (Nardi et al., 1977).

4.4.2. HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

La distribución de las bandas C en dos especies relacionadas de moluscos gasterópodos, *Ashmunella proxima* y *A. lenticulata*, puso de manifiesto diferencias interespecíficas, permitiendo su identificación y reconocer parte de los complementos parentales en sus híbridos (Babrakzai y Miller, 1984). En otros dos gasterópodos en los que se realizó la tinción de la heterocromatina constitutiva, *Planorbarius corneus* (Bottke, 1982) y *Helicella virgata* (Vitturi et al., 1991), se detectaron bandas C en varios cromosomas del complemento.

El método de bandas C utilizado en este trabajo permitió, en la especie *O. denselamellosa*, la detección efectiva de bloques de heterocromatina centromérica en los pares cromosómicos 6, 8, 9 y 10 de todas las células analizadas. La presencia de otros bloques centroméricos y/o terminales, en varios cromosomas de algunas células, sugiere que la heterocromatina constitutiva de estos cromosomas podría reaccionar de forma diferente al tratamiento. Las bandas C de los cuatro pares cromosómicos aportan un criterio suplementario para diferenciar los cromosomas del complemento; así, los pares 7 y 8 muestran valores de longitud relativa e Índice centromérico similares, pero la presencia de heterocromatina constitutiva en el par 8, y su ausencia en el par 7, permite una clara distinción. Por otra parte, los pares cromosómicos C-positivos pueden constituir marcadores específicos, sin embargo, la confirmación de este carácter requiere un análisis comparativo con la distribución de las bandas C en otras especies relacionadas.

En las otras especies estudiadas el método utilizado no muestra resultados repetitivos, únicamente en *M. edulis*, *M. trossulus* y *C. gigas* se observan con cierta frecuencia bandas C teloméricas, localizadas en la misma posición que los Ag-NORs en algunos de los cromosomas portadores. La asociación entre NORs y bandas C fue igualmente señalada en otros grupos como insectos (Palomeque et al., 1990b), anfibios (Schmid 1978a) o peces (García et al., 1987; Sola et al., 1988; Deiana et al., 1990). En el caso de *C. edule*, los cromosomas B de las células examinadas muestran una banda C centromérica, sugiriendo que una parte de estos cromosomas es de naturaleza heterocromática, como en la mayor parte de los animales en los que fueron descritos (Jones y Rees, 1982).

La técnica de bandas C descrita por Sumner (1972) fue puesta a punto en cromosomas de mamíferos pero también fue aplicada en otros grupos, incluso de invertebrados como platelmintos (Short y Grossman, 1981; Galleni et al., 1986; 1989), crustáceos (Standiford, 1989) o insectos (Juan y Petitpierre, 1989; Mansuetto y Vitturi, 1989; Palomeque et al., 1990b). En

algunos casos, al igual que ocurre con las especies estudiadas en este trabajo, la técnica no muestra la misma eficacia en todas las especies. Schmid (1978a,b), por ejemplo, aplicó esta técnica a una treintena de especies de anfibios, obteniendo resultados positivos en la mayor parte de ellas, pero en algunas señala que la heterocromatina no es detectable. Este autor atribuye la ausencia de respuesta a una fuerte sensibilidad del material cromosómico al tratamiento alcalino. De acuerdo con Popescu y Dipaolo (1979), las regiones heterocromáticas pueden mostrar diferente susceptibilidad al álcali o al tratamiento salino, así como distinta afinidad a la coloración, según el grado de repetición de las secuencias de ADN. Es posible que la dificultad para tefir específicamente la heterocromatina constitutiva sea debida a la propia heterocromatina de estas especies, o bien a que el método, o algunas de sus etapas, resulte inapropiado. Sumner (1972) indica que la etapa más crítica de la técnica es el tratamiento con el hidróxido de bario, de manera que la respuesta puede variar entre las preparaciones cromosómicas de distintos cultivos, siendo necesario realizar en ciertos casos modificaciones considerables del protocolo habitual.

En las especies de bivalvos, la dificultad de obtener abundantes metafases constituye el principal factor limitante para la aplicación de esta técnica de bandeo; la obtención de metafases es aleatoria y a menudo su número es insuficiente para efectuar todas las pruebas necesarias. Además, los cromosomas están frecuentemente muy condensados, haciendo todavía más difícil la obtención de un bandeo efectivo.

4.5. LAS RELACIONES TAXONOMICAS EN EL GENERO *MYTILUS*

Los estudios realizados sobre la taxonomía del género *Mytilus* se centraron fundamentalmente en las relaciones entre *M. edulis* y *M. galloprovincialis* y más recientemente en las relaciones de estos dos *Mytilus* con *M. trossulus*.

Los criterios morfológicos utilizados para separar *M. galloprovincialis* y *M. edulis* se refieren al contorno externo de la concha, a las características de las valvas y al color del borde del manto (Lewis y Seed, 1969; Seed, 1972; 1974), teniendo algunos caracteres, como la longitud de la impresión del músculo aductor anterior y la longitud de la charnela, mayor valor diagnóstico (Seed, 1978). Sin embargo, ningún carácter tomado aisladamente permite una identificación precisa de las dos formas (Gosling, 1984; Beaumont et al., 1989; Koehn, 1991; McDonald et al., 1991), utilizándose en muchos trabajos la combinación de dos o más caracteres (Seed, 1974; Skibinski et al., 1978; Verduin, 1979; Sanjuan et al., 1990). En base a 18 caracteres morfométricos, McDonald et al. (1991) diferencian en ejemplares del hemisferio

norte, mediante un análisis multivariante, tres conjuntos que corresponden a *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*.

Las técnicas de electroforesis revelaron diferencias en las frecuencias alélicas de algunos loci alozímicos entre las tres formas de mejillón, siendo los más discriminantes glucosa-6-fosfato isomerasa (*Gpi*), manosa-6-fosfato isomerasa (*Mpi*), peptidasa-II (*Aap*), octopín deshidrogenasa (*Odh*), esterasa-D (*Est-D*) y fosfoglucomutasa (*Pgm*). Los tres primeros loci permiten diferenciar las tres formas, mientras que los otros tres discriminan dos a dos: *Est-D* y *Pgm* discriminan entre *M. edulis* y *M. trossulus*, *Odh* y *Est-D* entre *M. edulis* y *M. galloprovincialis* y finalmente *Odh* y *Pgm* entre *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* (Gosling, 1992b), aunque ninguno de estos loci es completamente diagnóstico (Skibinski et al., 1978; Gosling, 1984; Beaumont et al., 1989; Gosling, 1992b). Los valores de las distancias genéticas entre poblaciones alopátricas de *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, calculadas en base a las frecuencias alélicas de varios loci, muestran valores similares (Skibinski et al., 1980; Grant y Cherry, 1985; Väinölä y Hvilson, 1991) y se encuentran en el rango esperado en comparaciones entre subespecies de otros taxones de invertebrados (Gosling, 1992b). Los mismos resultados fueron obtenidos tras el análisis de las frecuencias de los genotipos del ADN mitocondrial en *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (Skibinski, 1985; Edwards y Skibinski, 1987). Por otra parte, en los estudios inmunológicos realizados en *Mytilus*, incluyendo *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* no se detectaron reacciones específicas (Brock, 1985).

En algunas regiones donde *M. edulis* y *M. galloprovincialis* habitan simpátricamente, se puso de manifiesto la existencia de hibridación e intergradación (Skibinski y Beardmore, 1979; Gosling y Wilkins, 1981; Skibinski, 1985; Edwards y Skibinski, 1987; Coustau et al., 1991b), detectándose en análisis morfológicos, de variabilidad alozímica y del ADN mitocondrial, lo que demuestra la ausencia de una estricta barrera reproductiva. Además, la obtención de híbridos artificiales fértiles (Lubet et al., 1984) refuerza esta conclusión, aunque se hayan señalado diferencias en la morfología de los espermatozoides (Hodgson y Bernard, 1986; Crespo et al., 1990). La hibridación entre *M. edulis* y *M. trossulus*, por una parte, y *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, por otra, también fue detectada mediante electroforesis (McDonald y Koehn, 1988; Koehn, 1991; Väinölä y Hviisom, 1991).

Los cariotipos establecidos en el género *Mytilus* presentan las mismas categorías cromosómicas, observándose sólo ligeras diferencias en la proporción de cromosomas metacéntricos, submetacéntricos y subtlococéntricos. Los análisis cromosómicos comparativos se centraron fundamentalmente en los *Mytilus* de las costas europeas, y los resultados obtenidos varían según los autores. Thiriot-Quévieux (1984d) señala que la mayor diferencia

entre ejemplares de *M. galloprovincialis* de Villefranche-sur-Mer (costa mediterránea francesa), *M. edulis* de Charrons y Brest (costa atlántica francesa) y *M. desolationis* (Islas Kerguelen) se encuentra en los pares cromosómicos 2 (metacéntrico en *M. edulis* y *M. desolationis*, subtelocéntrico en *M. galloprovincialis*) y 3 (subtelocéntrico en *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, metacéntrico en *M. desolationis*). Dixon y Flavell (1986) al comparar los cromosomas de *M. edulis* de las Bahías de Whitsand y Robin Hood (costa inglesa) y de *M. galloprovincialis* de Venecia, no detectan estas diferencias y señalan únicamente ligeras variaciones entre los ejemplares de *M. edulis* de la Bahía de Robin Hood y *M. galloprovincialis* en el índice centromérico del "par 8" (por orden de tamaño decreciente: par 5, para los ejemplares de la Bahía Robin Hood; par 4, para los de Venecia).

Los *Mytilus* examinados en este trabajo muestran una gran similitud; el cariotipo de los individuos de *M. edulis* y los de *M. trossulus* constan de proporciones similares de los tres tipos cromosómicos y no pueden ser diferenciados con certeza por la forma de los cromosomas. La mayor diferencia con el cariotipo de *M. galloprovincialis* se encuentra en la proporción de cromosomas metacéntricos. Respecto a los NOR, por el contrario, los cromosomas portadores subtelocéntricos no muestran diferencias morfométricas entre las tres formas, sin embargo, *M. trossulus* difiere de *M. galloprovincialis* y *M. edulis* por la presencia de Ag-NORs en un par metacéntrico.

Si se interpreta la variabilidad interpoblacional de *M. galloprovincialis* y de *M. edulis*, descrita por distintos autores, en términos de polimorfismo cromosómico es necesario suponer que, en la mayoría de las poblaciones, tuvieron lugar reorganizaciones cromosómicas. Independientemente del tipo de reorganización (inversión pericéntrica o translocación no recíproca), la existencia del polimorfismo sería el resultado de tres etapas evolutivas: origen de la modificación cromosómica, aumento de la frecuencia y mantenimiento por la selección natural. Teniendo en cuenta que el medio marino constituye, en general, un vigoroso elemento estabilizador para las especies con fecundación externa, como es el caso de *Mytilus*, esta hipótesis parece poco probable. Es posible que gran parte de esta variabilidad esté provocada por el hecho de que las medidas fueron realizadas por distintos autores, utilizando métodos diferentes, y también por el grado de condensación de los cromosomas medidos. La condensación cromosómica constituye un proceso dinámico que puede desarrollarse a diferente ritmo a lo largo de los cromosomas (Van Dyke et al., 1986), de manera que la morfología de los cromosomas puede ser modificada a lo largo de la mitosis; así, los cromosomas más grandes, proporcionalmente, representan menos en las metafases más condensadas (Neurath et al.,

1972) y el índice centromérico tiende a aumentar a medida que los cromosomas se condensan (Drouin et al., 1991).

La especiación se acompaña evidentemente de cambios en el material genético pero éstos no siempre son visibles en el cariotipo; en ciertos casos dos especies vecinas pueden presentar cariotipos con diferencias más o menos importantes, que permiten su distinción cuando los criterios morfológicos son dudosos, pero en otros los cariotipos pueden ser prácticamente indiferenciables (Dreux, 1977). Los datos actuales de *Mytilus* no permiten utilizar el criterio cariológico para la distinción de taxones; las diferencias observadas en este trabajo entre *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* en la constitución del cariotipo o en la localización de los NORs, pueden representar variaciones interespecíficas pero también intraespecíficas, resultando imprescindible clarificar la variabilidad descrita mediante otras técnicas citogenéticas.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se analizaron los cromosomas de 13 bivalvos explotados comercialmente, con el fin de caracterizar sus cariotipos e identificar los criterios susceptibles de diferenciar las especies de una misma familia, prestando especial atención a las especies cuya taxonomía es objeto de controversia.

Los resultados aportados comprenden los siguientes aspectos:

- el número de cromosomas en *Mytilus trossulus*, *Ostrea puelchana*, *Cerastoderma edule*, *Venerupis pullastra* y *Venerupis rhomboides*;

- la composición del cariotipo en *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus edulis*, *Mytilus trossulus*, *Perna perna*, *Ostrea denselamellosa*, *Ostrea puelchana*, *Cerastoderma edule*, *Venerupis pullastra* y *Venerupis rhomboides*;

- la localización de las regiones organizadoras del nucleolo en *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus edulis*, *Mytilus trossulus*, *Perna perna*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Ostrea denselamellosa*, *Ostrea puelchana*, *Ruditapes philippinarum* y *Venerupis aurea*;

- la identificación de regiones de heterocromatina constitutiva en *Mytilus edulis*, *Mytilus trossulus*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Ostrea denselamellosa*, *Cerastoderma edule* y *Venerupis pullastra*.

De los resultados obtenidos se deducen las siguientes conclusiones:

Las medidas de los cromosomas realizadas en tres formas de mejillón de las costas europeas ponen de manifiesto que el cariotipo de *M. galloprovincialis* de Niza difiere del de *M. edulis* de Wimereux y del de *M. trossulus* de Trosa, fundamentalmente, por la proporción de cromosomas metacéntricos. Sin embargo, los cariotipos de *M. edulis* y *M. trossulus* no son diferenciables por la forma de los cromosomas.

La tinción con nitrato de plata de los cromosomas de estos *Mytilus* revela dos pares de Ag-NORs, localizados terminalmente en el brazo largo de los pares subtelocéntricos 6 y 10 de *M. galloprovincialis* y de los pares 4 y 10 de *M. edulis*. *M. trossulus* muestra igualmente Ag-NORs en dos pares subtelocéntricos, pares 4 y 10, pero también en un par metacéntrico, par 7. Los cromosomas Ag-NORs subtelocéntricos no muestrann diferencias significativas entre las tres formas de mejillón, respecto a los valores de las longitudes relativas ni de los índices centroméricos, permitiendo considerar estos cromosomas comunes a los tres *Mytilus*.

Las diferencias observadas en este trabajo entre *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus*, en la constitución del cariotipo o la localización de los Ag-NORs, no permiten por el momento discernir si representan variaciones interespecíficas o una variabilidad intraespecífica.

P. perna muestra un cariotipo claramente diferenciable de las demás especies de Mytilidae, sobre todo por la proporción de cromosomas telocéntricos. La tinción de los NORs refuerza esta diferenciación, al menos de los *Mytilus* analizados en este trabajo, puesto que esta especie presenta un único par de Ag-NORs, localizados terminalmente en el brazo corto de un par telocéntrico.

La ostra *O. denselamellosa* exhibe una gran similitud cariotípica con la mayor parte de las especies de Ostreidae, en cuanto al número y morfología de los cromosomas. *O. puelchana* tiene el mismo número de cromosomas pero se diferencia de las demás especies por presentar un par telocéntrico; esta característica constituye un criterio que permite distinguirla de los otros Ostreidae estudiados.

Las cuatro especies de Ostreidae analizadas, tras la tinción argéntica, presentan Ag-NORs en posición terminal, pero el número y la distribución en el cariotipo difiere entre las especies. En *C. gigas* los Ag-NORs se localizan en el par 10, metacéntrico; en *O. edulis* en el brazo largo de los pares 9 y 10, submetacéntricos; en *O. denselamellosa* en los pares 3 y 8, metacéntricos; y en *O. puelchana* en el brazo corto de los pares 2 y 4, submetacéntricos. Esta distribución característica permite utilizar los cromosomas portadores como marcadores en la formulación de hipótesis filogenéticas o en experiencias de hibridación interespecífica.

La tinción de la heterocromatina constitutiva en *O. denselamellosa* revela bandas C centroméricas en los pares 6, 8, 9 y 10 en todas las células examinadas. En esta especie, el análisis morfométrico de los cromosomas, la distribución de los Ag-NORs y de las bandas C permiten la caracterización precisa del cariotipo, siendo posible identificar cada par cromosómico del complemento.

El cariotipo de *C. edule* consta de cromosomas con el centrómero localizado entre la región submedia y terminal, siendo una de las pocas especies de bivalvos sin cromosomas metacéntricos. Además de esta particularidad, también se caracteriza por presentar cromosomas supernumerarios, constituyendo el primer caso entre los bivalvos. Las observaciones realizadas en dos poblaciones permiten constatar una cierta diferenciación entre ellas respecto a la distribución de los cromosomas supernumerarios.

Las almejas *V. pullastra* y *V. rhomboides* tienen cariotipos claramente diferenciables entre sí, y también de los de otros Veneridae estudiados, por la proporción de los distintos tipos cromosómicos. Estos dos nuevos cariotipos junto con los de otras tres especies de la subfamilia

Tapetinae aportan un elemento adicional para clarificar las relaciones taxonómicas entre las especies. Así, las relaciones cariotípicas inferidas mediante una clasificación ascendente jerárquica sugieren la separación de las cinco especies analizadas morfológicamente en tres grupos: (i) *V. rhomboides*, (ii) *R. philippinarum* y (iii) *V. pullastra*, *R. decussatus* y *V. aurea*.

La posición de los Ag-NORs en *R. philippinarum* y *V. aurea* muestra, como en el caso de las ostras, diferencias interespecíficas; en *R. philippinarum*, los Ag-NORs se localizan terminalmente en un par metacéntrico de menor tamaño, par 18, mientras que en *V. aurea* se localizan intersticialmente en un par metacéntrico de mayor tamaño, par 3.

La tinción argéntica de los NORs evidencia la existencia de tres tipos de variabilidad intraespecífica o heteromorfismos en las especies estudiadas. Por una parte, variabilidad intercelular respecto al número de Ag-NORs, detectada particularmente en las especies con NORs múltiples. Por otro lado, un heteromorfismo respecto al tamaño de los Ag-NORs entre cromosomas homólogos, detectado en la especie *C. gigas*. Finalmente, otro tipo de variabilidad que comprende la presencia de Ag-NORs adicionales, observado en un individuo de *M. trossulus* y en otro de *O. edulis*.

Los criterios cromosómicos para diferenciar las especies varían según las familias. En la familia Mytilidae, caracterizada por una gran heterogeneidad, la composición del cariotipo y la localización de los Ag-NORs no tienen el mismo valor de diferenciación en todos los casos. En la familia Ostreidae, cuyos cariotipos constan fundamentalmente de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, la presencia de cromosomas telocéntricos, así como la localización de los NORs, permiten la distinción de las especies analizadas. Por el contrario, en la familia Veneridae la composición del cariotipo es suficiente para garantizar la separación de las especies estudiadas.

La detección de células aneuploides, de individuos poliploides y de un individuo afectado probablemente por una enfermedad de naturaleza cancerosa, entre las especies estudiadas, sugiere que estas anomalías deben ser consideradas, sobre todo a la hora de seleccionar stocks para su posterior cultivo.

6. BIBLIOGRAFIA

- AHMAD, M. y J.A. BEARDMORE, 1976. Genetic evidence that the "Padstow Mussel" is *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.*, 35: 139-147.
- AHMED, M., 1973. Cytogenetics in oysters. *Cytologia*, 38: 337-346.
- AHMED, M., 1974. Chromosomes of two species of marine mussel *Perna* (Mytilidae: Pelecypoda). *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente*, 13: 17-22.
- AHMED, M., 1976. Chromosome cytology of marine pelecypod molluscs. *J. Sci. Karachi*, 4: 77-94.
- AHMED, M. y A.K. SPARKS, 1967. A preliminary study of chromosomes of two species of oysters (*Ostrea lurida* and *Crassostrea gigas*). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 24: 2155-2169.
- 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.
- ALLEN, J.A., 1985. Recent Bivalvia: their form and evolution. En: *The Mollusca*. Vol 10. K.M. Wilbur (ed.). Academic Press Inc., London, pp: 337-403.
- ALLEN, S.K., Jr., P.S. GAGNON y H. HIDU, 1982. Induced triploidy in the soft-shell clam: cytogenetics and allozymic confirmation. *J. Hered.*, 73: 421-428.
- AMEMIYA, C.T. y J.R. GOLD, 1990. Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). XVII. Chromosomal NOR phenotypes of 12 species, with comments on cytosystematic relationships among 50 species. *Hereditas*, 112: 231-247.
- ARRIGHI, F.E. y T.C. HSU, 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, 10: 81-86.
- BABRAKZAI, N. y W.B. MILLER, 1984. Cytogenetic study of interspecific hybrids of *Ashmunella* (Mollusca: Pulmonata: Polygyridae), I. *A. proxima* x *A. lenticula* F1 hybrids. *Malacologia*, 25: 413-426.
- BAKER, R.J. y J.W. BICKHAM, 1980. Karyotypic evolution in bats: evidence of extensive and conservative chromosomal evolution in closely related taxa. *Syst. Zool.*, 29: 239-253.
- BAMAI, V., 1977. Chromosome polymorphisms of constitutive heterochromatin and inversion in *Drosophila*. *Genetics*, 85: 85-93.
- BARNES, R.D., 1985. *Zoología de los invertebrados*. Interamericana, México, 1157 pp.
- BARON, J., A. DITER y A. BODOY, 1989. Triploidy induction in the black scallop (*Chlamys varia* L.) and its effect on larval growth and survival. *Aquaculture*, 77: 103-111.
- BARSIENE, J. y R. PETKEVICIUTE, 1988. Cytogenetic studies of Unionidae molluscs from the cooling water reservoir of the Lithuanian regional electric power plant. *Acta Hydrobiological Lituanica*, 7: 11-24.

- BEAUMONT, A.R., 1986. Genetic aspects of hatchery rearing of the scallop, *Pecten maximus* (L.). *Aquaculture*, 57: 99-110.
- BEAUMONT, A.R. y M.H. CONTARIS, 1988. Production of triploid embryos of *Tapes semidecussatus* by the use of cytochalasin B. *Aquaculture*, 73: 37-42.
- BEAUMONT, A.R. y J.E. FAIRBROTHER, 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *J. Shellfish Res.*, 10: 1-18.
- BEAUMONT, A.R. y LL.D. GRUFFYDD, 1974. Studies on the chromosomes of the scallop *Pecten maximus* (L.) and related species. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 54: 713-718.
- BEAUMONT, A.R. y K.S. KELLY, 1989. Production and growth of triploid *Mytilus edulis* larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 132: 69-84.
- BEAUMONT, A.R., R. SEED y P. GARCIA MARTINEZ, 1989. Electrophoretic and morphometric criteria for the identification of the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. En: *Reproduction, genetics and distribution of marine organisms*. J. Ryland y P.A. Tyler (eds). Olsen and Olsen, Fredensborg, Denmark, pp: 251-258.
- BICKHAM, J.W. y D.S. ROGERS, 1985. Structure and variation of the nucleolus organizer regions in turtles. *Genetica*, 67: 171-184.
- BISIGNANO, G., A. DI PIETRO, O.C. GRILLO e I. PICERNO, 1980. Serological studies on the genus *Mytilus*. Comparison of proteinic antigens extracted from *M. edulis* and *M. galloprovincialis*. *Rev. Int. Oceanogr. Med.*, 59: 31-39.
- BLAXHALL, P.C., 1983. Chromosome karyotyping of fish using conventional and G-banding methods. *J. Fish Biol.*, 22: 417-424.
- BORSA, P. y C. THIRIOT-QUIEVREUX, 1990. Karyological and allozymic characterization of *Ruditapes philippinarum*, *R. aureus* and *R. decussatus* (Bivalvia, Veneridae). *Aquaculture*, 90: 209-227.
- BOSS, K.J., 1982. Mollusca. En: *Synopsis and classification of living organisms*. S.Q. Parker (ed.) McGraw-Hill, New York, pp: 945-1166.
- BOTTKE, W., 1982. Heterochromatin in a pulmonate snail, *Planorbarius corneus* L.. *Caryologia*, 35: 443-448.
- BREWSTER, F. y B.L. NICHOLSON, 1979. In vitro maintenance of amoebocytes from the American oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 36: 461-467.
- BROCK, V. 1985. Immuno-electrophoretic studies of genetic relations between populations of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* from the Mediterranean, Baltic, East and West Atlantic and East Pacific. *Proc. 19th Eur. Mar. Biol. Symp.*, 1984, pp: 515-520.

- BRUNETTI, R., I. GOLA y F. MAJONE, 1986. Sister-chromatid exchange in developing eggs of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Bivalvia). *Mutation Res.*, 174: 207-211.
- BRUSCA, R.C. y G.J. BRUSCA, 1990. *Invertebrates*. Sinaner Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 922 pp.
- BULNHEIM, H.P. y E. GOSLING, 1988. Population genetic structure of mussels from the Baltic Sea. *Helgoländer Meeresunters*, 42: 113-129.
- BURCH, J.B., 1965. Chromosome numbers and systematics in euthyneuran snails. *Proc. 1st. Europ. Malacol. Congr.*, 1962, pp: 215-241.
- BUTOT, L.J.M. y B. KIAUTA, 1969. Cytotaxonomic observations in the stylommatophoran family Helicidae, with considerations on the affinities within the family. *Malacologia*, 9: 261-262.
- CAMACHO, J.P.M., J. CABRERO y E. VISERAS, 1981. C-heterochromatin variation in the genus *Eumigus* (Orthoptera: Pamphagoidea). *Genetica*, 56: 185-188.
- CASPERSSON, T., S. FARBER, G.E. FOLEY, J. KUDYNOWSKI, E.J. MODEST, E. SIMONSSON, U. WAGH y L. ZECH, 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 49: 219-222.
- CASSIDY, D.M. y A.W. BLACKLER, 1974. Repression of nucleolar organizer activity in an interspecific hybrid of the genus *Xenopus*. *Dev. Biol.*, 41: 84-96.
- CERMEÑO, M.C., J. ORELLANA, J.L. SANTOS y J.R. LACADENA, 1984. Nucleolar activity and competition (amphiplasty) in the genus *Aegilops*. *Heredity*, 53: 603-611.
- CHAITON, J.A. y S.K. ALLEN Jr., 1985. Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, by flow cytometry. *Aquaculture*, 48: 35-43.
- COLOMBERA, D. e I. LAZARETTO-COLOMBERA, 1978. Chromosome evolution in some marine invertebrates. En: *Marine organisms. Genetics, ecology and evolution*. B. Battaglia y J.A. Beardmore (eds). Plenum Press, New York, pp: 487-525.
- COMINGS, D.E. y E. MATTOCIA, 1972. DNA of mammalian and avian heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 71: 113-131.
- CORNET, M., 1992. Description d'une technique de culture de tissus de moule (*Mytilus edulis*) destinée à la préparation de chromosomes. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 315: 7-12.
- CORNET, M. y C. SOULARD, 1987. Premières données sur les chromosomes en métaphase mitotique chez *Abra ovata* (Philippi, 1836) (Mollusca, Bivalvia, Tellinacea). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 305: 7-10.
- CORNET, M. y C. SOULARD, 1989. Number and morphologie of the metaphase mitotic chromosomes in *Scrobicularia plana* (Da Costa, 1778) (Mollusca, Bivalvia, Tellinacea). *Caryologia*, 42: 11-18.

- CORNET, M. y C. SOULARD, 1990a. Karyometric analysis of two species of the family Tellinidae: *Macoma baltica* (L.) and *Tellina tenuis* Da Costa (Mollusca, Bivalvia, Tellinacea). *Cytobios*, 64: 93-101.
- CORNET, M. y C. SOULARD, 1990b. Chromosome number and karyotype of *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia, Tellinacea). *Genetica*, 82: 93-97.
- CORNI, M.G. y M. TRENTINI, 1986. A chromosomic study of *Chamelea gallina* (L.) (Bivalvia, Veneridae). *Boll. Zool.*, 53: 23-24.
- CORNI, M.G. y M. TRENTINI, 1987. A chromosomic study of *Mactra stultorum* (L.) and *Spisula subtruncata* (Da Costa) (Bivalvia, Mactridae). *Biol. Zent.bl.*, 106: 461-464.
- CORNI, M.G. y M. TRENTINI, 1990. The chromosomes of *Venerupis aurea* and *Ruditapes philippinarum* of the Northern Adriatic Sea (Bivalvia, Heterodonta, Veneridae). *Venus*, 49: 258-261.
- COUSTAU, C., F. RENAUD, C. MAILLARD, N. PASTEUR y B. DELAY, 1991a. Differential susceptibility to a trematode parasite among genotypes of the *Mytilus edulis*/*galloprovincialis* complex. *Genet. Res.*, 57: 207-212.
- COUSTAU, C., F. RENAUD y B. DELAY, 1991b. Genetic characterization of the hybridization between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on the Atlantique coast of France. *Mar. Biol.*, 111: 87-93.
- CRESPO, C. A., T. GARCIA-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.
- CRISCI, J.V. y T.F. STUESSY, 1980. Determining primitive characters states for phylogenetic reconstruction. *Syst. Bot.*, 5: 112-135.
- CUELLAR, O. y T. UYENO, 1972. Triploidy in rainbow trout. *Cytogenetics*, 11: 508-515.
- CZAKER, R., 1978. Silver staining in transcriptionally active NORs of meiotic and mitotic cells in *Acheta domesticus* L. (Orthoptera). *Chromosoma*, 68: 187-193.
- DEIANA, A.M., S. SALVADORI y A. CAU, 1990. The characterization of somatic chromosomes of *Gymnothorax unicolor* (Delaroche, 1809) by C-banding and NOR staining (Osteichthyes, Anguilliformes). *Genetica*, 81: 17-20.
- DI BERNARDINO, D., L. IANNUZZI, T.M. BETTINI y D. MATASSINO, 1981. Ag-NORs variation and banding homologies in two species of Bovidae: *Bubalus bubalis* and *Bos taurus*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 23: 89-99.
- DIEZ, M. y M.J. PUERTAS, 1986. Quantitative analysis of the formation of nucleoli in *Locusta migratoria*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28: 207-218.

- DITER, A. y C. DUFY, 1990. Polyploidy in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. II. Chemical induction of tetraploid embryos. *Aquat. Living Resour.*, 3: 107-112.
- DIUPOTEX-CHONG, M.E., F. RODRIGUEZ-ROMERO, M. URIBE-ALCOCER y LAGUARDA-FIGUERAS, 1978. Karyotypic characters of *Brachidontes recurvus* Rafinesque 1820. (Pelecypoda: Mytilidae). *An. Centro Cienc.del Mar y Limnol. Univ. Nal. Auton. México*, 5: 55-58.
- DIXON, D.R., 1982. Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis*) originating from a polluted dock. *Mar. Biol. Lett.*, 3: 155-161.
- DIXON, D.R. y K.R. CLARKE, 1982. Sister chromatid exchange: a sensitive method for detecting damage caused by exposure to environmental mutagens in the chromosomes of adult *Mytilus edulis*. *Mar. Biol. Lett.*, 3: 163-172.
- 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., 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.
- DOWNING, S. L. y S.K. ALLEN, Jr., 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 61: 1-15.
- DREUX, P., 1977. L'espèce chez les Orthoptères. En: *Les problèmes de l'espèce dans le règne animal*. Tomo II. Société Zoologique de France, Paris, pp: 95-136.
- DROUIN, R., N. LEMIEUX y C.L. RICHER, 1991. Chromosome condensation from prophase to late metaphase: relationship to chromosome bands and their replication time. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 57: 91-99.
- DUFY, C. y A. DITER, 1990. Polyploidy in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. I. Chemical induction and larval performances of triploids. *Aquat. Living Resour.*, 3: 55-60.
- DURAN-GONZALEZ, A., F. RODRIGUEZ-ROMERO y A. LAGUARDA-FIGUERAS, 1984. Polymorphisme chromosomique et nombre diploïde dans une population d'*Isognomon alatus* (Bivalvia: Isognomonidae). *Malacol. Rev.*, 17: 85-92.
- DURICA, D.S. y H.M. KRIDER, 1977. Studies on the ribosomal RNA cistrons in interspecific *Drosophila* hybrids. *Dev. Biol.*, 59: 62-74.
- DUTRILLAUX, B. y J. COUTURIER, 1981. *La pratique de l'analyse chromosomique*. Masson, Paris. 86 pp.

- DUTRILLAUX, B. y J. COUTURIER, 1983. Paléocytogénétique des Mammifères. En: *Modalités, rythmes et mécanismes de l'évolution biologique*. Coll. Internat. CNRS n° 330, CNRS, Paris, pp: 259-265.
- DUTRILLAUX, B. y J. LEJEUNE, 1971. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 272: 2638.
- EDWARDS, C.A. y D.O.F. SKIBINSKI, 1987. Genetic variation of mitochondrial DNA in mussel (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) populations from South West England and South Wales. *Mar. Biol.*, 94: 547-556.
- ELSTON, R.A., A.S. DRUM y S.K. ALLEN, Jr., 1990. Progressive development of circulating polyploid cells in *Mytilus* with hemic neoplasia. *Dis. Aquat. Org.*, 8: 51-59.
- ENGEL, W., M.T. ZENZES y M. SCHMID, 1977. Activation of mouse ribosomal RNA genes at the 2-cell stage. *Hum. Genet.*, 38: 57-63.
- EVANS, H.J., 1960. Supernumerary chromosomes in wild populations of the snail *Helix pomatia* L. *Heredity*, 15: 129-138.
- FARLEY, C.A., 1969a. Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussels (*Mytilus edulis*). *J. Nat. Cancer Inst.*, 43: 509-516.
- FARLEY, C.A., 1969b. Probable neoplastic disease of the hematopoietic system in oysters, *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. *National Cancer Institute Monograph* 31: 541-555.
- FERNANDEZ-PIQUERAS, J., A. RODRIGUEZ CAMPOS, C. SENTIS CASTAÑO y E. ROJO GARCIA, 1983. Chromosomal location of the active NORs in the *Steropleurus martorelli* complex. *Genetica*, 61: 9-12.
- FISCHER, W., M.L. BAUCHOT y M. SCHNEIDER, 1987. *Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche*. (Révision 1) Méditerranée et Mer Noire. Zone de Pêche 37. Vol. 1. CEE, FAO, 760 pp.
- FISCHER-PIETTE, E. y B. METIVIER, 1971. Révision des Tapetinae (Mollusques Bivalves). *Mém. Mus. Natl. Hist. Nat. Paris*, 71: 1-106.
- FLEMING, C.A., 1959. Notes on New Zealand recent and tertiary mussels (Mytilidae). *Trans. R. Soc. N. Z.*, 87: 165-178.
- FORESTI, F., L.F. ALMEIDA TOLEDO y S.A. TOLEDO F°, 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 31: 137-144.
- FREITAS, T.R.O., M.S. MATTEVI, L.F.B. OLIVIERA, Y. YONENAGA-YASSUDA y F.M. SALZANO, 1983. Chromosome relationships in three representatives of the genus *Holochilus* (Rodentia, Cricetidae) from Brazil. *Genetica*, 61: 13-20.

- FUNAKI, K., S. MATSUI y M. SASAKI, 1975. Location of nucleolus organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. *Chromosoma*, 49: 357-370.
- GALLEN, L., R. CANOVAI, M. GUALANDI, C. PELLICCIARI, S. GARAGNA y R. STANYON, 1986. Fine characterization of turbellarian chromosomes I. Giemsa and quinacrine banding in *Dugesia polychroa* (O. Schmidt). *Genetica*, 71: 47-50.
- GALLEN, L., R. CANOVAI, A. ESPOSITO y R. STANYON, 1989. Characterization of turbellarian chromosomes. II. C-banding in *Dugesia lugubris* (Tricladida: Paludicola). *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 108: 304-308.
- GARCIA, E., M.C. ALVAREZ y G. THODE, 1987. Chromosome relationships in the genus *Blennius* (Blenniidae Perciformes) C-banding patterns suggest two karyoevolutional pathways. *Genetica*, 72: 27-36.
- GARDNER, J.P.A., 1992. *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) (Bivalvia, Mollusca): the taxonomic status of the mediterranean mussel. *Ophelia*, 35: 219-243.
- GARTNER-KEPKAY, K.E., L.M. DICKIE y K.R. FREEMAN, 1980. Genetic differences and environments of mussels populations in Maritimes Provinces. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 775-782.
- GERARD, A., 1978. Etude des garnitures chromosomiques de deux Veneridae: *Ruditapes decussatus* (L.) et *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Haliotis*, 9: 69-71.
- GOLD, J.R., 1979. Cytogenetics. En: *Fish physiology*: Vol. 8. Academic Press., London/New York, pp: 353-405.
- GOLD, J.R., 1984. Silver-staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions in North American cyprinid fishes. *Copeia*, 23: 133-139.
- GOLD, J.R. y C.T. AMEMIYA, 1986. Cytogenetics studies in North American minnows (Cyprinidae). XII. Patterns of chromosomal nucleolus organizer region variation among 14 species. *Can. J. Zool.*, 64: 1869-1877.
- GOLD, J.R., J.R. ELLISON, 1982. Silver staining for nucleolar organizing regions of vertebrate chromosomes. *Stn. Technol.*, 58: 51-55.
- GOLDMAN, M.A., P.T. LO VERDE, C.L. CHRISMAN, D.A. FRANKLIN, F. MATTHEWS, R.J. PITCHFORD y C.S. RICHARDS, 1983. Nucleolar organizer regions in *Biomphalaria* and *Bulinus* snails. *Experientia*, 39: 911-913.
- GOODPASTURE, C. y S. BLOOM, 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, 53: 37-50.

- 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*. En: *The Mussel Mytilus*. E.M. Gosling (ed.). Elsevier Press, Amsterdam, pp: 1-20.
- GOSLING, E.M., 1992b. Genetics of *Mytilus*. En: *The Mussel Mytilus*. E.M. Gosling (ed.). Elsevier Press, Amsterdam, pp: 309-382.
- GOSLING, E.M. y A. NOLAN, 1989. Triploidy induction by thermal shock in the Manila clam *Tapes semidecussatus*. *Aquaculture*, 78: 223-228.
- 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.
- GRANT, W.S. y M.I. CHERRY, 1985. *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in Southern Africa. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 90: 179-191.
- GROUCHY, J. DE y C. TURLEAU, 1974. Clonal evolution in the myeloid leukemias. En: *Chromosomes and cancer*. J. German (ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York, pp: 287-311.
- HARRISON, F.L. e I.M. JONES, 1982. An in vivo sister-chromatid exchange assay in the larvae of the mussel *Mytilus edulis*: response to 3 mutagens. *Mutation Res.*, 105: 235-242.
- HARRY, H.W., 1985. Synopsis of the supraspecific classification of living oysters (Bivalvia: Gryphaeidae and Ostreidae). *Veliger*, 28: 121-158.
- HEWIT, G.M., 1973. The integration of supernumerary chromosomes in the Orthopteran genome. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 38: 183-194.
- HILLIKER, A.J. y C.B. SHARP, 1988. New perspectives on the genetics and molecular biology of constitutive heterochromatin. En: *Chromosome structure and function: impact of new concepts*. J. Perry Gustafson y R. Appels (eds). Plenum Press, New York, pp: 91-115.
- HINEGARDNER, R., 1974. Cellular DNA content of the Mollusca. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47: 447-460.
- HODGSON, A.N. y R.T.F. BERNARD, 1986. Observations on the ultrastructure of the spermatozoon of two mytilids from the south-west coast of England. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 66: 385-390.
- HOFGARTNER, F.J., M. SCHMID, W. KRONE, M.T. ZENZES y W. ENGEL, 1979a. Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis as analyzed by silver-staining. *Chromosoma*, 71: 197-216.
- HOFGARTNER, F.J., W. KRONE y K. JAIN, 1979b. Correlated inhibition of ribosomal RNA synthesis and silver staining by actinomycin D. *Hum. Genet*, 47: 329-333.

- 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*. Vol. 11. Academic Press, New York, pp: 89-142
- HOWELL, W.M. y D.A. BLACK, 1979. Location of the nucleolus organizer regions on the sex chromosomes of the banded killifish *Fundulus diaphanus*. *Copeia*, 3: 544-546.
- 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.
- HOWELL, W.M., T.E. DENTON y J.R. DIAMOND, 1975. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia*, 31: 260-262.
- HSU, T.C., S.E. SPIRITO y M.L. PARDUE, 1975. Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma*, 53: 25-36.
- HUBBELL, H.R., L.I. ROTHBLUM y T.C. HSU, 1979. Identification of a silver banding protein associated with the cytological silver staining of actively transcribing nucleolar region. *Cell. Biol. Int. Rep.*, 3: 615-622.
- HUBBELL, H.R, Y.F. LAN, R.L. BROWN y T.C. HSU, 1980. Cell cycle analysis and drug inhibition studies of silver in synchronous HeLa cells. *Exp. Cell. Res.*, 129: 139-147.
- IEYAMA, H., 1975. Chromosome number of three species in three families of Pteriomorphia (Bivalvia). *Venus*, 34: 26-32.
- IEYAMA, H., 1977. Studies on the chromosomes of two species in Mytilidae (Pteriomorphia, Bivalvia). *Venus*, 36: 25-28.
- IEYAMA, H., 1980. Studies on the chromosomes in three species of the Veneridae (Bivalvia, Heterodonta). *Venus*, 39: 49-55.
- IEYAMA, H., 1982a. Karyotypes in two species of the Solemyidae (Bivalvia, Cryptodonta). *Venus*, 40: 232-236.
- IEYAMA, H., 1982b. Chromosome number in two species of Mactridae (Bivalvia, Heterodonta), *Chromosome Inf. Serv.*, 33:3.
- IEYAMA, H., 1983a. Karyotype in *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mytilidae). *Mem. Facul. Edu. Ehime Univ.*, 3: 23-26.
- IEYAMA, H., 1983b. Studies on the chromosomes of four species in the genus *Septifer* (Bivalvia, Mytilidae). *Venus*, 42: 193-202.
- IEYAMA, H., 1983c. Somatic chromosomes of the arcid, *Arca boucardi* (Bivalvia: Pteriomorphia). *Chromosome Inf. Serv.*, 35: 3-4.

- IEYAMA, H., 1983d. Chromosome number in four species of Pholadidae (Bivalvia, Heterodonta). *Mem. Facul. Edu. Ehime Univ.*, 3: 17-21.
- IEYAMA, H., 1984a. Chromosomes of six species in three families of Pteriomorpha (Bivalvia). *Venus*, 43: 106-110.
- IEYAMA, H., 1984b. Karyotypes in eight species of the Mytilidae (Bivalvia: Pteriomorpha). *Venus*, 43: 240-254.
- IEYAMA, H., 1984c. Chromosome numbers in three species of bivalves (Pteriomorpha: Mollusca). *Chromosome Inf. Serv.*, 36: 15-16.
- IEYAMA, H., 1985. Karyotype in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Special Publication of the Mukaishima Marine Biological Station*, pp. 83-85.
- IEYAMA, H., 1990. Chromosomes of the oysters, *Hyotissa imbricata* and *Dendostrea folium* (Bivalvia: Pteriomorpha). *Venus*, 49: 63-68.
- IEYAMA, H. y A. INABA, 1974. Chromosome numbers of ten species in four families of Pteriomorpha (Bivalvia). *Venus*, 33: 129-137.
- IMAI, H.T. y R.H. CROZIER, 1980. Quantitative analysis of directionality in mammalian karyotype evolution. *Amer. Nat.*, 116: 537-569.
- JACOBI, C.M., C. ROSENBERG y A.M. VIANNA-MORGANTE, 1990. The karyotype of the brown mussel *Perna perna* (L.) (Bivalvia: Mytilidae). *Rev. Brasil. Genet.*, 13: 669-673.
- JENKINSON, J.J., 1976. Chromosome numbers of some North American naiads (Bivalvia: Unionacea). *Bull. Amer. Mal. Union*, :16-17.
- JOHANNESON, K., N. KAUTSKY y M. TENDENGREN, 1990. Genotypic and phenotypic differences between Baltic and North Sea population of *Mytilus edulis* evaluated through reciprocal transplantations. II. Genetic variation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 59: 211-219.
- JOHN, B., 1981. Heterochromatin variation in natural populations. *Chromosome Today*, 7: 128-137.
- JOHN, B., 1988. The biology of heterochromatin. En: *Heterochromatin: molecular and structural aspects*. R.S. Verma (ed.). Cambridge University Press, Cambridge, pp: 1-147.
- JONES, R.N. y H. REES, 1982. *B Chromosomes*. Academic Press Inc., London, 266 pp.
- JORDAN, H.E., 1910. A cytological study of the eggs of *Cumingia* with special reference to the history of the chromosomes and the centrosome. *Arch. Zellforschg. Leipzig*, 4: 243-253.
- JOTTERAND-BELLOMO, M., 1984. L'analyse cytogénétique de deux espèces de Muridae Africains, *Mus oubanquii* et *Mus minutoides/musculoides*: polymorphism chromosomique et esbois d'une phylogenie. *Cytogenet. Cell Genet.*, 38: 182-188.

- JUAN, C. y E. PETITPIERRE, 1989. C-banding and DNA content in seven species of Tenebrionidae (Coleoptera). *Genome*, 32: 834-839.
- KAWANO, T., L.C. GOMES SIMOES y L. FORESTI DE ALMEIDA TOLEDO, 1987. Nucleolar organizer region in three species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca, Gastropoda). *Rev. Brasil Genet.*, 10: 695-707.
- KEYL, H.G., 1956. Beobachtungen über die meiose der Muschel *Sphaerium comeum*. *Chromosoma*, 8: 12-17.
- KING, M., 1980. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma*, 80: 191-217.
- KING, M. y D. KING, 1975. Chromosomal evolution in the lizard genus *Varanus* (Reptilia). *Aust. J. Biol. Sci.*, 28: 89-108.
- KOEHN, R.K., 1991. The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*. *Aquaculture*, 9: 125-145.
- KOEHN, R.K., J.G. HALL, D.J. INNES y A.J. ZERA, 1984. Genetic differentiation of *Mytilus edulis* in eastern North America. *Mar. Biol.*, 79: 117-126.
- KOMARU, A. y K. WADA, 1985a. Karyotype of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* observed in the trochophore larvae. *Bull. Natl. Inst. Aquaculture*, 7: 105-107.
- KOMARU, A. y K. WADA, 1985b. Karyotypes in four species in the Pectinidae (Bivalvia: Pteriomorpha). *Venus*, 44: 249-259.
- KOMARU, A., Y. UCHIMURA, H. IEYAMA y K.T. WADA, 1988. Detection of induced triploid scallop *Chlamys nobilis* by DNA microfluorometry with DAPI staining. *Aquaculture*, 69: 201-209.
- KOPP, E., B. MAYR, M. KALAT y W. SCHLEGER, 1988. Polymorphisms of NORs and heterochromatin in the horse and donkey. *J. Hered.*, 79: 332-337.
- KOULMAN, J.G. y W.S. WOLFF, 1977. The mollusca of the estuarine region of the rivers Rhine, Meuse and Scheldt in relation to the hydrography of the area. V. The Cardiidae. *Basteria*, 41: 21-32.
- LACADENA, J.R., M.C. CERMEÑO, J. ORELLANA y J.L. SANTOS, 1984. Evidence for wheat-rye nucleolar competition (amphiplasty) in triticale by silver-staining procedure. *Theor. Appl. Genet.*, 67: 207-213.
- LAMY, E., 1936. Révision des Mytilidae vivants du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. *J. Conchy.*, 80: 66-363.

- LATT, S.A. 1974. Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection of fluorescence and induction of mitomycin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 3162-3166.
- LATT, S.A., J. ALLEN, S.E. BLOOM, A. CARRANO, E. FALKE, D. KRAM, E. SCHNEIDER, R. SCHRECK, R. TICE, B. WHITFIELD y S. WOLFF, 1981. Sister-chromatid exchanges, report of the Gene-Tox workshop. *Mutation Res.*, 87: 17-62.
- 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.
- LI, M.F. y J.E. STEWART, 1966. In vitro cultivation of cells of the oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 23: 595-599.
- LIN, M.S., O.S. ALFI, 1976. Detection of sister chromatid exchanges by 4'-6-diamidino-2-phenylindole fluorescence. *Chromosoma*, 57: 219-225.
- LISCHWE, M.A., K. SMETENA, M.O.J. OLSON y H. BUSCH, 1979. Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. *Life Sci.*, 25: 701-708.
- LONGWELL, A. C., S.S. STILES y D.G. SMITH, 1967. Chromosome complement of the American oyster *Crassostrea virginica*, as seen in meiotic and cleaving eggs. *Can. J. Genet. Cytol.* 9: 845-856.
- 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: 389-548.
- LUBET, P., G. PRUNUS, M. MASSON y D. BUCAILLE, 1984. Recherches experimentales sur l'hybridisation de *Mytilus edulis* L. et *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Bull. Soc. Zool. France*, 109: 87-98.
- MACGREGOR, H.C., M. VLAD y L. BERNETT, 1977. An investigation of some problems concerning nucleolus organizers in salamanders. *Chromosoma*, 59: 283-299.
- MAHONY, M.J. y E.S. ROBINSON, 1986. Nucleolar organiser region (NOR) location in karyotypes of Australian ground frogs (Family Myobatrachidae). *Genetica*, 68: 119-127.
- MANSUETO, C. y R. VITTURI, 1989. NORs location and C-banding pattern in spermatogenesis of *Pamphagus ortolanii* (Orthoptera, Acrididae). *Caryologia*, 42: 303-311.
- MARKOVIC, V.D., R.G. WORTON y J.M. BERG, 1978. Evidence for the inheritance of silver-stained nucleolus organizer regions. *Hum. Genet.*, 41: 181-187.

- MARTINEZ, P., A. VIÑAS, C. BOUZA, J. ARIAS, R. AMARO y L. SANCHEZ, 1991. Cytogenetical characterization of hatchery stocks and natural populations of sea and brown trout from northwestern Spain. *Heredity*, 66: 9-17.
- MASON, K.M., S.E. SHUMWAY, S.K. ALLEN, Jr. y H. HIDU, 1988. Induced triploidy in the soft-shelled clam *Mya arenaria*: energetic implications. *Mar. Biol.*, 98: 519-528.
- MASUBUCHI, M., 1976. Differential replication of the chromosomes of *Pellavicinia longispina*, liverwort. *Cytologia*, 41: 523-541.
- MATSUI, S. y M. SASAKI, 1973. Differential staining of nucleolus organizer in mammalian chromosomes. *Nature*, 246: 148-150.
- MATTHEY, R., 1945. L'évolution de la formule chromosomiale chez les Vertébrés. *Experientia*, 1: 50-86.
- MAYR, B. W. SCHLEGER y H. AUER, 1987. Frequency of Ag-stained nucleolus organizer regions in the chromosomes of cattle. *J. Hered.*, 78: 206-207.
- McDONALD, J.H. y R.K. KOEHN, 1988. The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America. *Mar. Biol.*, 99: 111-118.
- 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.
- MENDEZ, J., J.J. PASANTES y M.J. MARTINEZ-EXPOSITO, 1990. Banding pattern of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) chromosomes induced by 2 x SSC/Giemsa-stain treatment. *Mar. Biol.*, 106: 375-377.
- MENZEL, R. W., 1968a. Chromosome number in nine families of marine pelecypod molluscs. *Nautilus* 82: 45-58.
- MENZEL, R. W., 1968b. Cytotaxonomy of species of clams (*Mercenaria*) and oysters (*Crassostrea*). *Proc. Symp. on Mollusca*, pp: 75-84.
- MENZEL, R.W., 1974. Portuguese and Japanese oysters are the same species. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 31: 453-456.
- MENZEL, R.W. y M.Y. MENZEL, 1965. Chromosomes of two species of quahog clams and their hybrids. *Biol. Bull.*, 129: 181-188.
- MILLER, O.L., Jr, 1981. The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity. *J. Cell Biol.*, 15s-27s.
- MILLER, D.A., V.G. DEV, R. TANTRAVAHU 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., D. A. MILLER, V.G. DEV, R. TANTRAVAHU 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.
- MILLER, O.J., R. TANTRAVAHU, D.A. MILLER, L.C. YU, P. SZABO, W. PRENSKY, 1979. Marked increase in ribosomal RNA gene multiplicity in a rat hepatoma cell line. *Chromosoma*, 71: 183-195.
- MONTEAGUDO, L.V. y M.V. ARRUGA, 1991. NOR activity interaction among the chromosomes of common rabbit: a statistical analysis. *Caryologia*, 44, 85-91.
- MOREIRA-FILHO, O., L.A.C. BERTOLLO y P.M. GALETTI, Jr., 1984. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *Can. J. Genet. Cytol.*, 26: 564-568.
- MORESCALCHI, A., 1971. Comparative karyology of the Amphibia. *Boll. Zool.*, 38: 317-320.
- MORRIS, M.M., 1917. A cytological study of artificial parthenogenesis in *Cumingia*. *J. Exp. Zool.*, 21: 1-51.
- MOYNIHAN, E.P. y G.A.T. MAHON, 1983. Quantitative karyotype analysis in the mussel *Mytilus edulis* L.. *Aquaculture*, 33: 301-309.
- NADAMITSU, S. y T. KANAI, 1975. Chromosome of the freshwater pearl-mussel *Margaritifera laevis* (Haas). *Bull. Hiroshima Woman's Univ.*, 10: 1-3.
- NADAMITSU, S. y T. KANAI, 1978. On the chromosomes of three species in two families of freshwater Bivalvia. *Bull. Hiroshima Woman's Univ.*, 10: 4-5.
- NADAMITSU, S. y H. SHINKAWA, 1973. On the chromosomes of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Chromosome Inf. Serv.*, 15: 29-30.
- NAKAMURA, H.K., 1985. A review of molluscan cytogenetic information based on the CISMOCH-computerized index system for molluscan chromosomes. Bivalvia, Polyplacophora and Cephalopoda. *Venus*, 44: 193-225.
- NARDI, I., G. BARSACCHI-PILONE, R. BATISTONI, F. ANDRONICO, 1977. Chromosome location of the ribosomal RNA genes in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela). II. Intraspecific variability in number and position of the chromosome loci for 18S + 28S ribosomal RNA. *Chromosoma*, 64: 67-84.
- NARDI, I., S. DE LUCCHINI, G. BARSACCHI-PILONE, F. ANDRONICO, 1978. Chromosome location of the ribosomal RNA genes in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela). IV. Comparison between in situ hybridization with 3H 18S + 28S rRNA and AS-SAT staining. *Chromosoma*, 70: 91-99.
- NEURATH, P.W., B. KESS y D.A. LOW, 1972. Individualized human karyotyping through quantitative analysis. *Comput. Biol. Med.*, 2: 181-193.

- OBERDORFF, T., C. OZOUF-COSTAZ y J.F. AGNESE, 1990. Chromosome banding in African catfishes: nucleolar organizer regions in five species of the genus *Synodontis* and one of the genus *Hemisynodontis* (Pisces, Mochokidae). *Caryologia*, 43: 9-16.
- O FOIGHIL y C. THIRIOT-QUIEVREUX, 1991. Ploidy and pronuclear interaction in Northeastern Pacific *Lasaea* clones (Mollusca: Bivalvia). *Biol. Bull.*, 181: 222-231.
- OJIMA, Y. y A. TAKAI, 1979. The occurrence of spontaneous polyploid in the Japanese common loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Proc. Jpn. Acad.*, 55: 487.
- OKAMOTO, A. y B. ARIMOTO, 1986. Chromosomes of *Corbicula japonica*, *C. sandai* and *C. (Corbiculina) leana* (Bivalvia: Corbiculidae). *Venus*, 45: 194-202.
- PALMA-ROJAS, C., D. BROWN y R. GUERRA, 1980. El cariotipo de *Choromytilus chorus* (Molina, 1872). *Arch. Biol. Med. Exp.*, 13:142
- PALOMEQUE, T., E. CHICA, M.A. CANO y DIAZ DE LA GUARDIA, 1990a. Development of silver stained structures during spermatogenesis in different genera of Formicidae. *Genetica*, 81: 51-58.
- PALOMEQUE, T., E. CHICA, M.A. CANO y DIAZ DE LA GUARDIA, 1990b. Karyotype, C-banding, chromosomal location of active nucleolar organizing regions, and B-chromosomes in *Lasius niger* (Hymenoptera, Formicidae). *Genome*, 33: 267-272.
- PARIS CONFERENCE, 1971. Standardization in human cytogenetics. *Cytogenetics* (1972), 11: 313-362.
- PARTRIDGE, J.K., 1977. Littoral and benthic investigations on the west coast of Ireland. VI. Annotated bibliographies of the genus *Tapes* (Bivalvia; Veneridae). Part I. *Tapes decussatus* (L.). Part II. *Tapes semidecussatus* Reeve. *Proc. R. Irish Acad. Sect. B: Biol. Geol. Chem. Sci.*, 77: 1-64.
- PASANTES, J., M.J. MARTINEZ-EXPOSITO, A. MARTINEZ-LAGE y J. MENDEZ, 1990. Chromosomes of Galician mussels. *J. Moll. Stud.*, 56: 123-126.
- PATTERSON, C.M., 1969. Chromosomes of molluscs. *Proc. Symp. Moll. Mar. Biol. Ass. India*, 2: 635-689.
- PEREZ-CAMACHO, A. y G. ROMAN, 1987. La reproducción en moluscos bivalvos. En: *Reproducción en Acuicultura*. J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (eds). CAYCIT, 321 pp.
- PERRY, P. y S. WOLFF, 1974. New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature*, 261: 156-158.
- PHILLIPS, R. y P.E. IHSEN, 1985. Chromosome banding in salmonid fish: nucleolar organizer regions in *Salmo* and *Salvelinus*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 27: 433-440.

- PHILLIPS, R.B., K.D. ZAJICEK y F.M. UTTER, 1986. Chromosome banding in salmonid fishes: nucleolar organizer regions in *Oncorhynchus*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28: 502-510.
- PIMENTEL, R.A., 1979. *Morphometrics. The multivariate analysis of biological data*. Kendal/Hunt, Dubuke, Iowa, 276 pp.
- POJETA, J. y B. RUNNEGAR, 1985. The early evolution of diasome molluscs. En: *The Mollusca*. Vol 10. K.M. Wilbur (ed.). Academic Press Inc., London, pp. 295-336.
- POPESCU, N.C. y J.A. DIPAOLO, 1979. Heterogeneity of constitutive heterochromatin in somatic Syrian hamster chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 24: 53-60.
- POWELL, A.W.B., 1958. New Zealand molluscan systematics with descriptions of new species. *Rec. Auckland Inst. Mus.*, 5: 87-91.
- QUILLET, E. y P.J. PANELAY, 1986. Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 57: 271-279.
- QUMSIYEH, M.B. y R.J. BAKER, 1988. Comparative cytogenetics and the determination of primitive karyotypes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 47: 100-103
- RASOTTO, M., D. ALTIERI y D. COLOMBERA, 1981. I cromosomi spermatocitari di 16 specie appartenenti alla classe Pelecypoda. *Atti Congr. Soc. Malac. Ital.*, pp. 113-127.
- RITOSSA, F.M. y S. SPIEGELMAN, 1965. Location of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 53: 737-745.
- RODRIGUEZ-ROMERO, F., M. URIBE-ALCOCER y A. LAGUARDA-FIGUERAS, 1978. Cytogenetic study of an oyster population of *Crassostrea virginica* Gmelin from the coasts of Tabasco, Mexico. *Venus*, 37: 83-86.
- RODRIGUEZ-ROMERO, F., A. LAGUARDA-FIGUERAS, M. URIBE-ALCOCER y M.L. ROJAS-LARA, 1979a. Distribution of "G" bands in the karyotype of *Crassostrea virginica*. *Venus*, 38: 180-184.
- RODRIGUEZ-ROMERO, F., M. URIBE-ALCOCER y A. LAGUARDA-FIGUERAS, 1979b. The karyotype of *Crassostrea corteziensis* Hertlein (Mollusca: Ostreidae). *An. Centro. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México.*, 6:15-18.
- RODRIGUEZ-ROMERO, F., M. URIBE-ALCOCER, A. LAGUARDA-FIGUERAS y M.E. DIUPOTEX-CHONG, 1979c. The karyotype of *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). *Venus*, 38: 135-140.
- RODRIGUEZ, F., A. LAGUARDA-FIGUERAS y A. GARCIA-CUBAS, 1983. The karyotype of *Isognomon alatus*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 25: 85-87.

- ROPES, J.W., 1972. Chromosome number of the surf clam, *Spisula solidissima*. *Nautilus*, 85: 93-95.
- RUFAS, JS., P. ESPONDA y J. GOSALVEZ, 1985. NOR and nucleolus in the spermatogenesis of acridoid grasshoppers. *Genetica*, 66: 139-144.
- SANCHEZ, A., M. BURGOS, R. JIMENEZ y R. DIAZ DE LA GUARDIA, 1989. Quantitative analysis of silver staining of the nucleolar organizing region in *Eliomys quercinus*. *Genome*, 32: 978-982.
- SANCHEZ, L., P. MARTINEZ, A. VIÑAS y C. BOUZA, 1990. Analysis of the structure and variability of nucleolar organizer regions of *Salmo trutta* by C-, Ag-, and restriction endonuclease banding. *Cytogenet. Cell Genet.*, 54: 6-9.
- SANJUAN, A., H. QUESADA, C. ZAPATA y G. ALVAREZ, 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.
- SANTOS, J.L., P. ARANA y R. GIRALDEZ, 1983. Chromosome C-banding patterns in Spanish Acridoidea. *Genetica*, 61: 65-74.
- SANTOS, J., C. SENTIS, M. ROBLEDO y J. FERNANDEZ-PIQUERAS, 1990. Nucleolar dominance in interracial hybrids of the *Steropleurus martorelli* complex. *Genome*, 33: 153-155.
- SCARLATO, O.A. y Y.I. STAROBOGATOV, 1979. The systematic position and distribution of mussels. En: *Commercial bivalve molluscan mussels and their role in the ecosystem*. O. Scarlato (ed.). Zoological Institute of the Soviet Academy of Sciences, pp: 106-111.
- SCHMID, M., 1978a. Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. *Chromosoma*, 68: 131-148.
- SCHMID, M., 1978b. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361-388.
- SCHMID, M., 1980a. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC and AT rich chromosome regions in *Anura*. *Chromosoma*, 77: 83-103.
- SCHMID, M., 1980b. Chromosome banding in Amphibia. En: *Cytogenetics of Vertebrates*. A. Muller (ed.). Birkhauser, Basel, pp: 44-47.
- SCHMID, M., 1980c. Chromosome banding in Amphibia. V. Highly differentiated ZW/ZZ sex chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). *Chromosoma*, 80: 69-96.

- SCHMID, M., 1982. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma*, 87: 327-344.
- SCHMID, M., F.J. HOFGARTNER, M.T. ZENZES y W. ENGEL, 1977. Evidence for postmeiotic expression of ribosomal RNA genes during male gametogenesis. *Hum. Genet.*, 38: 279-284.
- SEABRIGHT, M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, ii: 971-972.
- SEED, R., 1968. Factors influencing shell shape in the mussel *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 48: 561-584.
- 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.
- 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., 1978. The systematics and evolution of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.). En: *Marine Organisms: Genetics, Ecology and Evolution*. B. Battaglia y J.A. Beardmore (eds). Plenum Press, London, pp: 447-468.
- SENTIS, C., J. SANTOS y J. FERNANDEZ-PIQUERAS, 1988. Primary and secondary nucleolar organiser regions during spermatogenesis in the genus *Pycnogaster*. *Heredity*, 60: 197-204.
- SHIELDS, M.F., 1982. Comparative avian cytogenetics, a review. *Condor*, 84: 45-58.
- SHORT, R.B. y A.I. GROSSMAN, 1981. Conventional Giemsa and C-banded karyotypes of *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini*. *J. Parasitol.*, 67: 661-671.
- SKIBINSKI, D.O.F., 1985. Mitochondrial DNA variation in *Mytilus edulis* L. and the Padstow mussel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 92: 251-258.
- SKIBINSKI, D.O.F. y J.A. BEARDMORE, 1979. A genetic study of intergradation between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Experientia*, 35: 1442-1444.
- 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., 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.

- 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.
- STANDIFORD, D.M., 1989. The effects of chromatin diminution on the pattern of C-banding in the chromosomes of *Acanthocyclops vernalis* Fischer (Copepoda: Crustacea). *Genetica*, 79: 207-214.
- STANLEY, J.G., S.K. ALLEN Jr. y H. HIDU, 1981. Polyploidy induced in the American oyster *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, 12: 1-10.
- STANLEY, J.G., H. HIDU y S.K. ALLEN Jr., 1984. Growth of American oysters increased by polyploidy induced blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture*, 37: 147-155.
- SUMNER, A.T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 72: 304-306.
- TABARINI, C.L., 1984. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. *Aquaculture*, 42: 151-160.
- TANTRAVAHU, R., D.A. MILLER, V.G. DEV y O.J. MILLER, 1976. Detection of nucleolus organizer regions in chromosomes of human, chimpanzee, gorilla, orangutan and gibbon. *Chromosoma*, 56: 15-27.
- 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.
- THEISEN, B.F., 1978. Allozyme cline and evidence of strong selection in three loci in *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) from Danish waters. *Ophelia*, 17: 135-142.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., 1984a. Les caryotypes de quelques Ostreidae et Mytilidae. *Malacologia*, 25: 465-476.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., 1984b. Le caryotype d'*Aulacomya ater regia* (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae) des Iles Kerguelen. *Mar. Biol.*, 79: 89-91.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., 1984c. Analyse comparée des caryotypes d'Ostreidae (Bivalvia). *Cah. Biol. Mar.*, 25: 407-418.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., 1984d. Chromosome analysis of three species of *Mytilus* (Bivalvia: Mytilidae). *Mar. Biol. Lett.*, 5: 265-273.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., 1986. Etude de l'aneuploïdie dans différents naissans d'Ostreidae (Bivalvia). *Genetica*, 70: 225-231.

- THIRIOT-QUIEVREUX, C., 1988. Chromosome studies in pelagic opisthobranch molluscs. *Can. J. Zool.*, 66: 1460-1473.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., 1990. Karyotype analysis in several pelagic gastropods. *Amer. Malac. Bull.*, 8: 37-44.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., 1992. Karyotype of *Lasaea australis*, a brooding bivalve species. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 43: 403-408.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., y N. AYRAUD, 1982. Les caryotypes de quelques espèces de Bivalves et de Gastéropodes marins. *Mar. Biol.*, 70: 165-172.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., J. SOYER y M. BOUVY, 1987. Etude des chromosomes du Bivalve Protobranch *Malletia sabrina* Hedley, 1916. *Vie Milieu*, 37: 175-180.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., J. SOYER, F. DE BOVEE y P. ALBERT. 1988a. Unusual chromosome complement in the brooding bivalve *Lasaea consanguinea*. *Genetica*, 76: 143-151.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., J. SOYER, M. BOUVY y J.A. ALLEN, 1988b. Chromosomes of some subantarctic brooding bivalve species. *Veliger*, 30: 248-256.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., T. NOEL, S. BOUGRIER y S. DALLOT, 1988c. Relationships between aneuploidy and growth rate in pair matings of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 75: 89-96.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., A.M. INSUA POMBO y P. ALBERT, 1989. Polyploidie chez un Bivalve incubant, *Lasaea rubra* (Montagu). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 308: 115-120.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., P. ALBERT y J. SOYER, 1991. Karyotype of five subantarctic species. *J. Moll. Stud.*, 57: 59-70.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., G.H. POGSON y E. ZOUROS, 1992. Genetics of growth rate variation in bivalves: aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea* family. *Genome*, 35: 39-45
- THODE, G., J. CANO y M.C. ALVAREZ, 1983. Association of nucleolus organizer chromosomes shown by silver staining in *Gobius fallax*. *J. Hered.*, 74: 480-482.
- THORGAARD, G.H. y G.A.E. GALL, 1979. Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics*, 93: 961-973.
- TYLER-WALTERS, H. y D.J. CRISP, 1988. The modes of reproduction in *Lasaea rubra* (Montagu) and *L. australis* (Lamarck) (Erycinidae; Bivalvia). En: *Reproduction, genetics and distribution of marine organisms*. J.S. Ryland y P.A. Tyler (eds.). Olsen & Olsen, Denmark, pp: 299-308.

- UCHIMURA, Y. , KOMARU, A., K.T. WADA, H. IEYAMA, M. YAMAKI y H. FURUTA, 1989. Detection of induced triploidy at different ages for larvae of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, by microfluorometry with DAPI staining. *Aquaculture*, 76: 1-9.
- VAINOLA, 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.
- VAN DYKE, D.L., M.J. WORSHAM, L.J. FISHER y L. WEISS, 1986. The centromere index and relative length of human high-resolution G-banded chromosomes. *Hum. Genet.*, 73: 130-132.
- VAN GRIETHUYSEN, G.A., B. KIAUTA y L.J.M. BUTOT, 1969. The chromosomes of *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758) and *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) (Mollusca, Bivalvia: Unionidae). *Basteria*, 33: 51-56.
- VARLEY, J.M., 1977. Patterns of silver staining of human chromosomes. *Chromosoma*, 61: 207-214.
- VARVIO, S.L., R.K. KOEHN y R. VAINOLA, 1988. Evolutionary genetics of the *Mytilus edulis* complex in the North Atlantic region. *Mar. Biol.*, 98: 51-60.
- VELAZQUEZ, M., G. VISEDÓ, P. LUDEÑA, S.F. DE CANO, C. SENTIS y J. FERNANDEZ-PIQUERAS, 1991. Cytogenetic analysis of a human familial 15p+ marker chromosome. *Genome*, 34: 827-829.
- VERDUIN, A., 1979. Conchological evidence for the separate specific identity of *Mytilus edulis* L. and *M. galloprovincialis* Lamarck. *Basteria*, 43: 61-80.
- VITTURI, R. y E. CATALANO, 1989. Spermatocyte chromosomes and nucleolus organizer regions (NORs) in *Tricolia speciosa* (Mühlfeld, 1824) (Prosobranchia, Archaeogastropoda). *Malacologia*, 31: 211-216.
- VITTURI, R. y E. CATALANO, 1990. Spermatocyte chromosome banding studies in *Buccinulum comeum* (Prosobranchia: Neogastropoda): variation in silver-NOR banding pattern. *Mar. Biol.*, 104: 259-263.
- VITTURI, R., M.B. RASOTTO y N. FARINELLA-FERRUZZA, 1982. The chromosomes of 16 molluscan species. *Boll. Zool.*, 49: 61-71.
- VITTURI, R., A. MAIORCA y E. CATALANO, 1983. The karyotype of *Teredo utriculus* (Gmelin) (Mollusca, Pelecypoda). *Biol. Bull.*, 165: 450-457.
- VITTURI, R., P. CARBONE y E. CATALANO, 1985. The chromosomes of *Pycnodonta cochlear* (Poli) (Mollusca, Pelecypoda). *Biol. Zent.bl.*, 104: 177-182.

- VITTURI, R., D. COLOMBERA, E. CATALANO y F.P. AMICO, 1991. Spermatocyte chromosome analysis of *Helicella virgata* (Pulmonata: Helicidae): silver staining and C-banded chromosomes. *J. Hered.* 339-343.
- VOLOBUJEV, V.T., 1980. The B-chromosomes system of mammals. *Genetica*, 52/53: 333-337.
- VOLLETH, M., 1987. Differences in the location of nucleolus organizer regions in European vespertilionid bats. *Cytogenet. Cell Genet.*, 44: 186-197.
- WADA, K., 1976. Number and gross morphology of chromosomes in the pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould), collected from two regions of Japan. *Venus*, 35: 9-14.
- WADA, K., 1978. Chromosome karyotypes of three bivalves: the oysters, *Isognomon alatus* and *Pinctada imbricata*, and the bay scallop, *Argopecten irradians irradians*. *Biol. Bull.*, 155: 235-245.
- WADA, K. y A. KOMARU, 1985a. The karyotype of the ark shell, *Scapharca subcrenata* (Lischke, 1869). *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. Japan*, 8: 1-4.
- WADA, K. y A. KOMARU, 1985b. Karyotypes in five species of the Pteriidae (Bivalvia: Pteriomorpha). *Venus*, 44: 183-192.
- WADA, K.T., A. KOMARU e Y. UCHIMURA, 1989. Triploid production in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture*, 76: 11-19.
- WADA, K.T., J. SCARPA y S.K. ALLEN, Jr., 1990. Karyotype of the dwarf surfclam *Mulinia lateralis* (Say, 1822) (Mactridae, Bivalvia). *J. Shellfish Res.*, 9: 279-281.
- WALLACE, H. y M.L. BIRNSTIEL, 1969. Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer. *Biochim. Biophys. Acta*, 114: 296-310.
- WANG, H.C. y B.H.J. JUURLINK, 1979. Nucleolar organizer regions (NORs) in Chinese hamster chromosomes as visualized by coomasie brilliant blue. *Chromosoma*, 75: 327-332.
- WARD, J.H., 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Statist. Ass.*, 58: 236-244.
- WHITE, M.J.D., 1973. *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, 961 pp.
- WILKINS, N.P., K. FIJINO y E.M. GOSLING, 1983. The Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in Japan. *Biol. J. Linn. Soc.*, 20: 365-374.
- WINKING, H., K. NIELSEN y A. GROPP, 1980. Variable position of NORs in *Mus musculus*. *Cytogenet. Cell Genet.*, 26: 158-164.
- YADAV, J.S. y A.S. YADAV, 1987. Localization of NORs in spermatogonial metaphase chromosomes of six species of grasshoppers. *Genetica*, 74: 155-160.

- YAMAMOTO, S. e Y. SUGAWARA, 1988. Induced triploidy in the mussel, *Mytilus edulis*, by temperature shock. *Aquaculture*, 72: 21-29.
- YOSIDA, T.H. y T. SAGAI, 1975. Variation of C-bands in several subspecies of *Rattus rattus*. *Chromosoma*, 50: 283-300.
- YUNIS, J.J., L. ROLDAN, W.G. YASMINEH y J.C. LEE, 1971. Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes. *Nature*, 231: 532-533.
- ZAKHAROV, A.F. y N.A. EGOLINA, 1972. Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUdR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma*, 38: 341-365.

ANEXO

Tabla recopilativa de los datos cariotípicos en la clase Bivalvia, referentes al número y morfología de los cromosomas. Se detallan las especies analizadas, la dotación cromosómica diploide y/o haploide, el método de obtención de los cromosomas, la constitución del cariotipo, el origen de los individuos y la referencia de los trabajos realizados. Las especies cuyos cromosomas fueron obtenidos a partir de cortes en parafina no están incluidas. La clasificación seguida corresponde a la realizada por Boss (1982), las especies se ordenaron por orden alfabético, al igual que los géneros de cada familia, respetándose los nombres específicos utilizados por los autores. Las especies triploides o poliploides se señalan con el símbolo # y su número de cromosomas figura entre paréntesis. El método de obtención de los cromosomas se representa por un número entre corchetes: 0, no especificado; 1, squash; 2, suspensión celular. Los cromosomas se describen de acuerdo con la nomenclatura establecida por Levan et al. (1969), los cariotipos señalados con el símbolo (*) fueron determinados según las medidas de los cromosomas y los restantes de manera aproximada según la forma de los cromosomas.

Clasificación	Nº cromos.		[Método] Cariotipo	Localidad	Autor
	2n	n			
Subclase Protobranchia: Orden Nuculoidea					
Superfamilia Nuculanacea					
Familia Malletiidae					
<i>Malletia gigantea</i>	38		[2] 6m, 6sm, 1sm-st, 5st, 1t-st (*)	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux et al. (1991)
<i>Malletia sabrina</i>	38		[2] 11m, 1m-sm, 1sm-st, 5st, 1st-t (*)	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux et al. (1987)
Familia Yoldiidae					
<i>Yoldia (Aequiyoldia) woodwar</i>	38		[2] 10m, 5sm, 1sm-st, 3st (*)	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux et al. (1991)
Orden Solemyoidea					
Superfamilia Solemyacea					
Familia Solemyidae					
<i>Acharax japonicus</i>	22	11	[2] 10m, 1m-sm (*)	Ehime, Japón	leyama (1982a)
<i>Petrasma pusilla</i>	22	11	[2] 5m, 2sm-m, 3sm, 1st-sm (*)	Ehime, Japón	leyama (1982a)
Subclase Pteriomorpha: Superorden Isofilibranchia: Orden Mytiloidea					
Superfamilia Mytilacea					
Familia Mytilidae					
<i>Aulacomya ater regia</i>	26		[2] 13v/st	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux (1984b)
<i>Aulacomya ater regia</i>	26		[2] 11st, 2st-t (*)	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux, com. pers.
<i>Brachidontes minimus</i>		15	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
<i>Brachidontes recurvus</i>	30	15	[1] 15sm (*)	Tabasco, México	Diupotex-Chong et al. (1978)
<i>Choromytilus chorus</i>	30		[1] 15sm	Bahía Los Chorros, Chile	Palma Rojas et al. (1980)
<i>Crenomytilus grayanus</i>	28		[2] 4m, 5sm, 5st (*)	Hokkaido, Japón	leyama (1984b)
<i>Limnoperna fortunei kikuchii</i>	30	15	[1] 5m, 3sm-m, 5sm, 2st (*)	Hyogo, Japón	leyama (1984b)
<i>Lithophaga curta</i>	32	16	[2] 10m, 1sm-m, 3sm, 1st, 1t (*)	Ehime, Japón	leyama (1984b)
<i>Modiolus auriculatus</i>	32	16	[2] 6m, 1sm, 5sm-m, 3st, 1t (*)	Ehime, Japón	leyama (1984b)
<i>Modiolus barbatus</i>		16	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
<i>Modiolus modiolus difficilis</i>	32		[2] 10m, 2sm-m, 3sm, 1st (*)	Hokkaido, Japón	leyama (1984b)
<i>Musculus cupreus</i>	30	15	[2] 8m, 2sm, 2st, 3t (*)	Hiroshima, Japón	leyama (1984b)
<i>Musculus laevigatus</i>	28		[2] 4m, 2sm-m, 4sm, 4st (*)	Hokkaido, Japón	leyama (1984b)
<i>Musculus senhousia</i>	30	15	[2] 15m/sm	Seto, Japón	leyama (1977)
<i>Mytilus californianus</i>	28	14	[1] 11 m/sm, 3st	Varias localidades de EE UU	Ahmed y Sparks (1970)
<i>Mytilus coruscus</i>	28	14	[1,2]	Hiroshima, Japón	leyama e Inaba (1974)
<i>Mytilus coruscus</i>	28		[2] 5m, 3sm, 1st-sm, 5st (*)	Ehime, Japón	leyama (1984b)
<i>Mytilus desolationis</i>	28		[2] 5m, 2m/sm, 4st/sm, 3st	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux (1984a)
<i>Mytilus desolationis</i>	28		[2] 5m, 1m-sm, 1sm-m, 1sm, 1sm-st, 2st-sm, 3st (*)	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux (1984d)
<i>Mytilus edulis</i>		14	[1]	SO Francia	Lubet (1959)
<i>Mytilus edulis</i>	24	12	[1]	Virginia, EE UU	Menzel (1968a)
<i>Mytilus edulis</i>	28	14	[1] 11 m/sm, 3st	Washington, California, EE UU	Ahmed y Sparks (1970)
<i>Mytilus edulis</i>	28	14	[1,2]	Hiroshima, Japón	leyama e Inaba (1974)
<i>Mytilus edulis</i>	28		[2] 2m, 6sm, 6t	Cultivados en Brest y Charrons, Francia	Thiriot-Quévieux y Ayraud (1982)
<i>Mytilus edulis</i>	28		[2] 3m, 2m-sm, 2sm-m, 4sm, 1sm-st, 2st-sm (*)	Seto, Japón	leyama (1983a)
<i>Mytilus edulis</i>	28		[1] 6m, 8sm (*)	Galway, Irlanda	Moynihan y Mahon (1983)
<i>Mytilus edulis</i>	28		[2] 4m, 2m-sm, 1sm, 3sm-st, 4st (*)	Cultivados en Brest y Charrons, Francia	Thiriot-Quévieux (1984d)
<i>Mytilus edulis</i>	28		[2] 6m, 2sm, 3sm-st, 1st-sm, 2st (*)	Bahía Whitsand, Gran Bretaña	Dixon y Flavell (1986)
<i>Mytilus edulis</i>	28		[2] 6m, 2sm, 1sm-st, 5st-sm (*)	Bahía Robin Hood, Gran Bretaña	Dixon y Flavell (1986)
<i>Mytilus edulis</i>	28		[2] 6m, 1sm-st, 5st-sm, 1st, 1st-t (*)	Wimereux, Francia	Presente estudio

Clasificación	Nº cromos.		[Método] Cariotipo	Localidad	Autor
	2n	n			
<i>Mytilus galloprovincialis</i>		14	[1]	SO Francia	Lubet (1959)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>		14	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	28		[2] 1m, 6sm, 7t	Villefranche-sur-Mer, Francia	Thiriot-Quévieux y Ayraud (1982)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	28		[2] 5m, 1sm, 1sm-st, 3st-sm, 4st (*)	Villefranche-sur-Mer, Francia	Thiriot-Quévieux (1984d)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	28		[2] 6m, 5sm, 2sm-st, 1st-sm (*)	Venecia, Italia	Dixon y Flavell (1986)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	28		[2] 6m, 5sm, 3st (*)	Mera, Galicia	Pasantes et al. (1990)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	28		[2] 5m, 3sm-st, 4st-sm, 2st (*)	Niza, Francia	Presente estudio
<i>Mytilus trossulus</i>	28		[2] 6m, 1sm, 1sm-st, 1st-sm, 5st (*)	Trosa, Suecia	Presente estudio
<i>Perna perna</i>	28	14	[1] 10m/sm, 4st	Cultivados en varias localidades de Venezuela	Ahmed (1974)
<i>Perna perna</i>	28		[2] 4m, 5sm, 5st/t	Cultivados en San Paulo, Brasil	Jacobi et al. (1990)
<i>Perna perna</i>	28		[2] 4m, 2sm 1st-sm, 3st, 1t-st 3t (*)	Sidi Fredj, Argelia	Presente estudio
<i>Perna viridis</i>	30	15	[1] 10m/sm, 5st	Karachi, Pakistán	Ahmed (1974)
<i>Septifer bilocularis</i>	26		[1,2] 3m, 1 m-sm, 1sm-m, 1st-sm, 6st, 1t-st, (*)	Ehime, Japón	Ieyama (1983b)
<i>Septifer excisus</i>	26		[1,2] 2m, 1sm-m, 2sm, 1st-sm, 6st, 1t (*)	Ehime, Japón	Ieyama (1983b)
<i>Septifer keenae</i>	28	14	[1,2] 3m, 2m-sm, 2sm, 4st, 2t-st, 1t (*)	Ehime, Japón	Ieyama (1983b)
<i>Septifer virgatus</i>	28	14	[1,2] 4m, 1sm-m, 2sm, 1st-sm, 3st, 1t-st, 2t (*)	Ehime, Japón	Ieyama (1983b)
<i>Vignadula atrata</i>	22	11	[2] 5m, 1sm-m, 1sm-st, 2st-sm, 2st (*)	Seto, Japón	Ieyama (1977)
Superorden Prionodonta: Orden Arcoida					
Superfamilia Arcacea					
Familia Arcidae					
<i>Arca barbata</i>		19	[1]	Palmi, Calabro, Italia	Rasotto et al. (1981)
<i>Arca boucardi</i>	36		[2] 3m, 4sm, 2sm-st, 1st-sm, 7st, 1st-t (*)	Seto, Japón	Ieyama (1983c)
<i>Arcopsis symmetrica</i>	38		[2]	Ehime, Japón	Ieyama (1984a)
<i>Barbatia (Abarbatia) velata</i>	38		[2]	Ehime, Japón	Ieyama (1984a)
<i>Barbatia virescens</i>	28	14	[1,2] 5m/sm, 9st/t	Mukaishima, Japón	Ieyama, (1975)
<i>Didimacar tenebricum</i>	38	19	[2]	Seto, Japón	Ieyama (1984c)
<i>Porterius dalli</i>	38	19	[2]	Ehime, Japón	Ieyama (1984a)
<i>Scapharca subcrenata</i>	38		[2]	Seto, Japón	Ieyama (1984c)
<i>Scapharca subcrenata</i>	38		[2] 3m, 10m-sm, 3sm, 3sm-st (*)	Japón	Wada y Komaru (1985a)
Superorden Eupteriomorphia: Orden Pterioida: Suborden Pteriina					
Superfamilia Pteriacea					
Familia Pteriidae					
<i>Pinctada albina</i>	28		[2] 7m, 2m-sm, 3sm-m, 2sm-st (*)	Okinawa, Japón	Wada y Komaru (1985b)
<i>Pinctada fucata martensii</i>	28	14	[1] 10m/sm, 4st	Varias localidades de Japón	Wada (1976)
<i>Pinctada fucata martensii</i>	28		[2] 7m, 2m-sm, 2sm, 2sm-st 1t (*)	Mie, Bahía de Goshaho, Japón	Komaru y Wada (1985a)
<i>Pinctada imbricata</i>	28	14	[1] 10-11m/sm, 3-4st	Florida, EE UU	Wada (1978)
<i>Pinctada maculata</i>	28		[2] 4m, 5m-sm; 3sm-m, 1sm, 1st (*)	Okinawa, Japón	Wada y Komaru (1985b)
<i>Pinctada margaritifera</i>	28		[2] 10m, 2st, 2t (*)	Cultivada en Iriomote, Japón	Wada y Komaru (1985b)
<i>Pinctada maxima</i>	28		[2] 3m, 4m-sm, 2sm-m, 1sm, 1sm-st, 1st-t, 1t-st, 1t (*)	Kagoshima, Japón	Wada y Komaru (1985b)
<i>Pteria penguin</i>	28		[2] 2m, 9st-sm, 1st, 1t-st, 1t (*)	Kagoshima, Japón	Wada y Komaru (1985b)

Clasificación	Nº cromos.		[Método] Cariotipo	Localidad	Autor
	2n	n			
Familia Isognomonidae					
<i>Isognomon alatus</i>	28	14	[1] 5m, 9sm	Bahía de Biscayne, EE UU	Wada (1978)
<i>Isognomon alatus</i>	28		[2] 4m, 7sm, 1st, 2t (*)	Laguna de la Mancha, México	Rodríguez et al. (1983)
<i>Isognomon alatus</i>	26	13	[2] 5m, 6sm, 2st, (*)	Campeche, México	Durán-González et al. (1984)
<i>Isognomon (Isogonum) legum</i>	26		[2]	Ehime, Japón	Ieyama (1984a)
Suborden Pinnina					
Superfamilia Pinnacea					
Familia Pinnidae					
<i>Pinna bicolor</i>	32	16	[1,2] 11m/sm, 5st	Hiroshima Japón	Ieyama e Inaba (1974)
Orden Limoida					
Superfamilia Limacea					
Familia Limidae					
<i>Limaria hakodatensis</i>	32	16	[2]	Seto, Japón	Ieyama (1984c)
<i>Limatula pygmaea</i>	38		[2] 5m, 1m-sm, 10sm, 1sm-st, 1sm-st, 1st (*)	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux et al. (1991)
Orden Ostreoida: Suborden Ostreina					
Superfamilia Ostreacea					
Familia Ostreidae					
<i>Crassostrea amasa</i>	20	10	[1]	Australia	Menzel (1968a)
<i>Crassostrea angulata</i>	20	10	[1]	Cultivada en Inglaterra	Menzel (1968a)
<i>Crassostrea angulata</i>	20		[2] 10m (*)	Cultivada en Barfleur, Francia	Thiriot-Quévieux (1984c)
<i>Crassostrea ariakensis</i>	20	10	[1,2] 10m/sm	Bahía Ariake, Japón	Ieyama (1975)
<i>Crassostrea belcheri</i>	20	10	[1,2]	Ishikawa, Japón	Ieyama e Inaba (1974)
<i>Crassostrea commercialis</i>	20	10	[1]	Australia	Menzel (1968a)
<i>Crassostrea corteziensis</i>	20		[2] 7m, 3sm (*)	Nayarit, México	Rodríguez-Romero et al. (1979b)
<i>Crassostrea gigas</i>	20	10	[1] 8m, 2sm	Washington y California, EE UU	Ahmed y Sparks (1967)
<i>Crassostrea gigas</i>	20		[0]	No especificado	Longwell et al. (1967)
<i>Crassostrea gigas</i>	20	10	[1]	Cultivada en Washington, EE UU	Menzel (1968a)
<i>Crassostrea gigas var. Miyagi</i>	20	10	[1]	EE UU	Ahmed (1973)
<i>Crassostrea gigas var. Kuman</i>	20	10	[1]	EE UU	Ahmed (1973)
<i>Crassostrea gigas</i>	20	10	[2] 10m	Hiroshima, Japón	Nadamitsu y Shinkawa (1973)
<i>Crassostrea gigas</i>	20	10	[1, 2]	Hiroshima, Japón	Ieyama e Inaba (1974)
<i>Crassostrea gigas</i>	20		[2] 7m, 3sm	Cultivada en Barfleur, Francia	Thiriot-Quévieux y Ayraud (1982)
<i>Crassostrea gigas</i>	20		[2] 7m, 3sm (BrdU)	Cultivada en Barfleur, Francia	Thiriot-Quévieux (1984a)
<i>Crassostrea gigas</i>	20		[2] 10m (*) (BrdU)	Cultivada en Barfleur, Francia	Thiriot-Quévieux (1984c)
<i>Crassostrea glomerata</i>	20	10	[1]	Karachi, Pakistán	Ahmed (1973)
<i>Crassostrea gryphoides</i>	20	10	[1]	Karachi, Pakistán	Ahmed (1973)
<i>Crassostrea iredalei</i>	20	10	[1]	Filipinas	Menzel (1968a)
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	20		[0]	No especificado	Longwell et al. (1967)
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	20	10	[1]	Puerto Rico	Menzel (1968)
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	20	10	[2] 5m, 5sm (*)	Varias localidades de México	Rodríguez Romero et al. (1979c)
<i>Crassostrea tuberculata</i>	20	10	[1]	Karachi, Pakistán	Ahmed (1973)
<i>Crassostrea rivularis</i>	20	10	[1]	Karachi, Pakistán	Ahmed (1973)
<i>Crassostrea virginica</i>	20	10	[1] 6m, 4sm (*)	Connecticut, EE UU	Longwell et al. (1967)
<i>Crassostrea virginica</i>	20	10	[1]	Florida, EE UU	Menzel (1968a)
<i>Crassostrea virginica</i>	20	10	[1]	Karachi, Pakistán	Ahmed (1973)
<i>Crassostrea virginica</i>	20	10	[2] 6m, 4sm (*)	Tabasco, México	Rodríguez-Romero et al. (1978)
<i>Dendostrea folium</i>	18		[2] 5m, 2st, 2t (*)	Bungo Chanel, Japón	Ieyama (1990)
<i>Ostrea circumpecta</i>	20		[1,2]	Hiroshima, Japón	Ieyama e Inaba (1974)
<i>Ostrea denselamellosa</i>	20		[1,2]	Hiroshima, Japón	Ieyama e Inaba (1974)
<i>Ostrea denselamellosa</i>	20		[2] 7m, 3sm (*)	Cultivada en La Tremblade, Francia	Presente estudio

Clasificación	Nº cromos.		[Método] Cariotipo	Localidad	Autor
	2n	n			
<i>Ostrea edulis</i>	20		[0]	No especificado	Longwell et al. (1967)
<i>Ostrea edulis</i>	20	10	[1]	EE UU	Ahmed (1973)
<i>Ostrea edulis</i>	20		[2] 5m, 3sm, 2t	Cultivada en Barfleur, Francia	Thiriot-Quévieux y Ayraud (1982)
<i>Ostrea edulis</i>	20		[2] 6m, 2sm, 2st (BrdU)	Cultivada en Barfleur, Francia	Thiriot-Quévieux (1984a)
<i>Ostrea edulis</i>	20		[2] 5m, 3sm, 1sm-st, 1st (*)	Cultivada en Barfleur, Francia	Thiriot-Quévieux (1984c)
<i>Ostrea edulis</i>	20		[2] 5m, 4sm, 1sm--st (*)	Saint-Vaast-la-Hogue, Francia	Thiriot-Quévieux (1984c)
<i>Ostrea edulis</i>	20		[2] 5m, 3sm, 1sm-st, 1st-sm (*)	Quiberon, Francia	Thiriot-Quévieux (1984c)
<i>Ostrea edulis</i>	20		[2] 5m, 5 sm (*)	Loumergat, Francia	Thiriot-Quévieux (1984c)
<i>Ostrea equestris</i>	20		[0]	No especificado	Longwell et al. (1967)
<i>Ostrea equestris</i>	20		[1]	Florida, EE UU	Menzel (1968a)
<i>Ostrea folium</i>	20	10	[1]	Karachi, Pakistán	Ahmed (1973)
<i>Ostrea lurida</i>	20	10	[1] 7m, 3sm	Washington y California, EE UU	Ahmed y Sparks (1967)
<i>Ostrea lurida</i>	20		[0]	No especificado	Longwell et al. (1967)
<i>Ostrea lurida</i>	20	10	[1]	EE UU	Ahmed (1973)
<i>Ostrea puelchana</i>	20		[2] 4m, 5sm, 1t (*)	Cultivada en Ronce les Bains, Francia	Presente estudio
<i>Saccostrea echinata</i>	20	10	[1,2]	Hiroshima, Japón	Ieyama e Inaba (1974)
<i>Saccostrea mordax</i>	20		[1,2]	Kôchi, Japón	Ieyama e Inaba (1974)
Familia Gryphaeidae					
<i>Hytissa imbricata</i>	20		[2] 7m, 3sm (*)	Tokushima, Japón	Ieyama (1990)
<i>Pycnodonta cochlear</i>	18	9	[1] 6m, 2sm, 1st (*)	Golfo de Palermo, Italia	Vitturi et al. (1985)
Suborden Pectinina					
Superfamilia Pectinacea					
Familia Pectinidae					
<i>Argopecten irradians irradians</i>	32	16	[1]	Cultivada en Nueva York, EE UU	Wada (1978)
<i>Chlamys distorta</i>	38	19	[1]	Mar de Irlanda	Beaumont y Gruffydd (1974)
<i>Chlamys farreri farreri</i>	38		[2] 3m, 1sm, 6sm-st, 7st, 2st-t (*)	Mie, Japón	Komaru y Wada (1985b)
<i>Chlamys glabra</i>		14	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
<i>Chlamys islandica</i>		19	[1]	Tromso, Noruega	Beaumont y Gruffydd (1974)
<i>Chlamys nobilis</i>	32		[2] 3m, 13t (*)	Mie, Japón	Komaru y Wada (1985b)
<i>Chlamys opercularis</i>	26	13	[1]	Mar de Irlanda	Beaumont y Gruffydd (1974)
<i>Chlamys opercularis</i>		14	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
<i>Chlamys varia</i>	38	19	[1]	Mar de Irlanda	Beaumont y Gruffydd (1974)
<i>Chlamys varia</i>		19	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
<i>Pecten albicans</i>	38	19	[1,2] 3m-sm, 4st, 12t	Cultivada en Ondo, Japón	Ieyama (1975)
<i>Pecten albicans</i>	38		[2] 1m, 1m-sm, 3sm-st, 14t (*)	Cultivada en Japón	Komaru y Wada (1985b)
<i>Pecten jacobaeus</i>		19	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
<i>Pecten maximus</i>	38	19	[1] 2m, 2sm, 1st, 14t (*)	Mar de Irlanda	Beaumont y Gruffydd (1974)
<i>Patinopecten yessoensis</i>	38		[2] 2m, 1m-sm, 4sm, 6sm-st, 3st, 3t (*)	Cultivada en Japón	Komaru y Wada (1985b)
<i>Placopecten magellanicus</i>	38	19	[1]	Newfoundland, Canadá	Beaumont y Gruffydd (1974)
Superfamilia Anomiacea					
Familia Anomiidae					
<i>Anomia chinensis</i>	14	7	[1,2] 5m/sm, 2st	Mukaishima, Japón	Ieyama e Inaba (1974)
<i>Anomia chinensis</i>	14		[2] 2m, 1m-sm, 3st, 1st-t (*)	Ehime, Japón	Ieyama (1984a)
<i>Anomia ephippium</i>		12	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
<i>Anomia ephippium</i>	12	6	[2] 1m, 1sm-m, 2st-sm, 2st (*)		Thiriot-Quévieux, com.pers.
<i>Monia umbonata</i>	26		[2]	Ehime, Japón	Ieyama (1984a)

Clasificación	Nº cromos.		[Método] Cariotipo	Localidad	Autor
	2n	n			
Subclase Palaeoheterodonta: Orden Unionoida					
Superfamilia Unionacea					
Familia Unionidae					
<i>Alasmidonta arcule</i>	38		[2]	Río Ohoopee, EE UU	Jenkinson (1976)
<i>Alasmidonta marginata</i>	38		[2]	Ohio, EE UU	Jenkinson (1976)
<i>Anodonta anatina</i>	38		[1] 10m, 3m/sm, 6sm	Lago Diemen, Holanda	Van Griethuysen et al. (1969)
<i>Anodonta grandis</i>	38		[2]	Ohio, EE UU	Jenkinson (1976)
<i>Anodontoides ferussacianus</i>	38		[2]	Ohio, EE UU	Jenkinson (1976)
<i>Crassiana crassa</i>	38		[2]	Lituania	Barsiene y Petkeviciute (1988)
<i>Gonidea angulata</i>	38		[2]	Río Wilamette, EE UU	Jenkinson (1976)
<i>Inversidens japonensis</i>	38		[2] 6m, 13sm	Yamaguchi, Japón	Nadamitsu y Kanai (1978)
<i>Lampsilis radiata luteola</i>	38		[2]	Ohio, EE UU	Jenkinson (1976)
<i>Lasmigona costata</i>	38		[2]	Ohio, EE UU	Jenkinson (1976)
<i>Potamilus alatus</i>	38		[2]	EE UU	Jenkinson (1976)
<i>Pseudodon obovalis omiensis</i>	38		[2] 9m, 10sm	Hiroshima, Japón	Nadamitsu y Kanai (1978)
<i>Ptychobranthus fasciolaris</i>	38		[2]	Ohio, EE UU	Jenkinson (1976)
<i>Quadrula quadrula</i>	38		[2]	Ohio, EE UU	Jenkinson (1976)
<i>Toxolasma lividus glans</i>	38		[2]	EE UU	Jenkinson (1976)
<i>Tritogonia verrucosa</i>	38		[2]	Ohio, EE UU	Jenkinson (1976)
<i>Unio elongatus</i>		19	[1]	Río Brenta, Italia	Vitturi et al. (1982)
<i>Unio pictorum</i>	38		[1] 8m, 1m/sm, 10sm	Lago Diemen, Holanda	Van Griethuysen et al. (1969)
<i>Unio pictorum</i>	38		[2]	Lituania	Barsiene y Petkeviciute (1988)
<i>Unio tumidus</i>	38		[2]	Lituania	Barsiene y Petkeviciute (1988)
<i>Villosa iris</i>	38		[2]	Ohio, EE UU	Jenkinson (1976)
<i>Villosa lienosa</i>	38		[2]	Ohio, EE UU	Jenkinson (1976)
Familia Margaritiferidae					
<i>Margaritifera laevis</i>	38	19	[2] 19sm	Hiroshima, Japón	Nadamitsu y Kanai (1975)
<i>Margaritifera margaritifera</i>	38		[2]	Río Wilamette, EE UU	Jenkinson (1976)
Subclase Heterodonta: Orden Veneroida					
Superfamilia Leptonacea					
Familia Lasaeidae					
<i>Lasaea australis</i>	42-44	21-22	[1]	Hasting Point, Australia	Tyler-Walters y Crisp (1988)
<i>Lasaea australis</i>	36	18	[2] 4m, 6sm, 1st-sm, 2st, 5t (*)	Varias localidades de Australia	Thiriot-Quévieux (1992)
<i>Lasaea consanguinea</i> #	(100-120)		[2] 14m, 6m-sm, 2sm-m, 9sm, 9st, 3st-t, 7t-st, 4t (*)	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux et al. (1988a)
<i>Lasaea rubra</i> #	(120-170)		[1]	Anglesey, Gran Bretaña	Tyler-Walters y Crisp (1988)
<i>Lasaea rubra</i> #	(63-340)		[2]	Banyuls-sur-Mer, Francia	Thiriot-Quévieux et al. (1989)
<i>Lasaea subviridis</i> #	(58-108)		[2] 10m, 1sm, 6sm-st, 2st-sm, 2st, 2t-st, 9t (*)	Varias localidades de Canadá	O Foighil y Thiriot-Quévieux (1991)
Superfamilia Cyamiacea					
Familia Cyamiidae					
<i>Kidderia bisulcata</i>	38	19	[2] 3m, 3sm, 1sm-st, 7st, 3t-st 2t (*)	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux et al. (1988b)
<i>Kidderia minuta</i>	36	18	[2] 3m, 1sm-m, 1sm-st, 8st, 5t (*)	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux et al. (1988b)
Familia Gaimardiidae					
<i>Gaimardia trapesina</i>	38	19	[2] 8m, 7sm, 1st-sm, 3st (*)	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux et al. (1988b)
Superfamilia Carditacea					
Familia Carditidae					
<i>Cyclocardia astartoides</i>	30		[2] 5m, 10t (*)	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriot-Quévieux et al. (1991)

Clasificación	Nº cromos.		[Método] Cariotipo	Localidad	Autor
	2n	n			
Superfamilia Cardiacea					
Familia Cardiidae					
<i>Cerastoderma edule</i>	38	19	[1] 7sm, 7st, 5t	Varias localidades de Holanda	Koulman y Wolff (1977)
<i>Cerastoderma edule</i>	38		[2] 1sm-m, 8sm, 3sm-st, 4st, 3t-st (*)	Ría del Pasaje y Baldayo, Galicia	Presente estudio
= <i>Cardium edule</i>		20	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
<i>Cerastoderma glaucum</i>	38	19	[1]	Estuario de los rios Rhin, Meuse, Scheldt, Holanda	Koulman y Wolff (1977)
<i>Cardium tuberculatum</i>		20	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
<i>Dinocardium robustum</i>	24	12	[1]	Florida, EE UU	Menzel (1968a)
Superfamilia Mactracea					
Familia Mactridae					
<i>Labiosa plicatela</i>	36	18	[1]	Florida, EE UU	Menzel (1968a)
<i>Mactra chinensis</i>	38		[2]	Seto, Japón	Ieyama (1982b)
<i>Mactra scultorum</i>	38	19	[2]	Cesenático, Italia	Corni y Trentini (1987)
<i>Mactra veneriformis</i>	38	19	[2]	Seto, Japón	Ieyama (1982b)
<i>Mulinia lateralis</i>	36	18	[1]	Virginia, EE UU	Menzel (1968a)
<i>Mulinia lateralis</i>	38	19	[2] 19 t	Delaware y Virginia, EE UU	Wada et al. (1990)
<i>Spisula solidissima</i>	36	18	[1]	Maryland, EE UU	Ropes (1972)
<i>Spisula subtruncata</i>	38	19	[2]	Cesenático, Italia	Corni y Trentini (1987)
Superfamilia Tellinacea					
Familia Tellinidae					
<i>Macoma baltica</i>	38		[2] 11m, 2m-sm, 1sm-m, 2st-sm, 3st (*)	Estuario de Gironde, Francia	Cornet y Soulard (1990a)
<i>Tellina tenuis</i>	38		[2] 1m, 1m-sm, 4sm, 1sm-st, 3st-sm, 9st (*)	Arcachon, Francia	Cornet y Soulard (1990a)
Familia Semelidae					
<i>Abra ovata</i>	38		[2] 5m, 1m-sm, 1sm-m, 5sm, 2sm-st, 2st-sm, 2st, 1st-t (*)	Arcachon, Francia	Cornet y Soulard (1987)
Familia Scrobiculariidae					
<i>Scrobicularia plana</i>	38		[2] 6m, 5sm, 7st, 1t (*)	Arcachon, Francia	Cornet y Soulard (1989)
Familia Donacidae					
<i>Donax variabilis</i>	38	19	[1]	Florida, EE UU	Menzel (1968a)
<i>Donax trunculus</i>	38		[2] 7m, 2m-sm, 2sm-m, 3sm, 2sm-st, 3st (*)	Arcachon, Francia	Cornet y Soulard (1990b)
Superfamilia Corbiculacea					
Familia Corbiculidae					
<i>Corbicula japonica</i>	38		[2] 1m, 1sm, 17st	Osaka, Japón	Okamoto y Arimoto (1986)
<i>Corbicula leana</i>	48	24	[1,2]	Iwakuni e Hiroshima, Japón	Nadamitsu y Kanai (1978)
<i>Corbicula (Corbiculina) leana</i>	[54]		[2] 1m, 4sm, 13st	Shiga, Japón	Okamoto y Arimoto (1986)
<i>Corbicula sandai</i>	36		[2] 1m, 1sm, 16st	Shiga, Japón	Okamoto y Arimoto (1986)
Familia Pisidiidae					
<i>Sphaerium comeum</i>	36	18	[1]	Wilhelmshaven, Alemania	Keyl (1956)
Superfamilia Veneracea					
Familia Veneridae					
<i>Chione cancellata</i>	38	19	[1]	Florida, EE UU	Menzel (1968a)
<i>Circe scripta</i>	38		[2] 19m	Seto, Japón	Ieyama (1980)
<i>Irus mitis</i>	38	19	[1, 2] 14m, 5sm (*)	Seto, Japón	Ieyama (1980)
<i>Mercenaria campechiensis</i>	38	19	[1]	Florida, EE UU	Menzel y Menzel (1965)
<i>Mercenaria mercenaria</i>	38	19	[1]	Varias localidades, EE UU	Menzel y Menzel (1965)

Clasificación	Nº cromos.		[Método] Cariotipo	Localidad	Autor
	2n	n			
<i>Paphia verrucosa</i>	38	19	[2] 19m/sm	Seto, Japón	Ieyama (1980)
<i>Pitaria chione</i>		19	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
<i>Ruditapes decussatus</i>	38		[1]	No especificado	Gerard (1978)
= <i>Venerupis decussata</i>	38	19	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
<i>Ruditapes decussatus</i>	38		[2] 6m, 1sm, 2sm-st, 9st, 1st-t(*)	Sète, Francia	Borsa y Thiriót-Quéievreux (1990)
<i>Ruditapes philippinarum</i>	38		[1]	No especificado	Gerard (1978)
<i>Ruditapes philippinarum</i>	38		[2] 10m, 1sm-m, 7sm, 1st-sm (*)	Hiroshima, Japón	Ieyama (1985)
<i>Ruditapes philippinarum</i>	38		[2] 9m, 10sm (*)	Cultivada en Barfleur, Francia	Borsa y Thiriót-Quéievreux (1990)
<i>Ruditapes philippinarum</i>	38	19	[2] 19 m/sm	Mar Adriático, Italia	Corni y Trentini (1990)
<i>Venerupis aurea</i>		19	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
= <i>Ruditapes aureus</i>	38		[2] 8m, 9sm, 1st, 1t-st (*)	Sète, Francia	Borsa y Thiriót-Quéievreux (1990)
<i>Venerupis aurea</i>	38	19	[2] 19 m/sm	Mar Adriático, Italia	Corni y Trentini (1990)
<i>Venus gallina</i>		15	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
= <i>Chamelea gallina</i>	38	19	[2] 15m/sm, 4st	Cesenatico, Italia	Corni y Trentini (1986)
<i>Venerupis pullastra</i>	38		[2] 3m, 2sm-m, 4sm, 2sm-st 3st-sm, 5st (*)	Baldayo	Presente estudio
<i>Venerupis rhomboides</i>	38		[2] 3m, 1m-sm, 2sm-m, 6sm 2st-sm, 2st, 3t (*)	Ría de Arosa, Galicia	Presente estudio
<i>Venus verrucosa</i>		19	[1]	Venecia, Italia	Rasotto et al. (1981)
Familia Petricolidae					
<i>Petricola pholadiformis</i>	46	23	[1]	Virginia, EE UU	Menzel (1968a)
Orden Myoida					
Superfamilia Myacea					
Familia Myidae					
<i>Mya arenaria</i>	34		[2]	Maine, EE UU	Allen et al. (1982)
Superfamilia Pholadacea					
Familia Pholadidae					
<i>Barnesia dilatata</i>		19	[1]	Hiroshima, Japón	Ieyama (1983d)
<i>Barnesia manilensis</i>	38	19	[1] 3m, 3m-sm, 6sm, 2sm-m, 1st-sm, 4st (*)	Ehime Japón	Ieyama (1983d)
<i>Barnesia truncata</i>	34	17	[1]	Virginia, EE UU	Menzel (1968a)
<i>Cyrtopleura costata</i>	34	17	[1]	Florida, EE UU	Menzel (1968a)
<i>Penitella kamakurensis</i>		19	[1]	Ehime, Japón	Ieyama (1983d)
<i>Zirfaea subconstricta</i>		19	[2]	Ehime, Japón	Ieyama (1983d)
Familia Teredinidae					
<i>Teredo utriculis</i>	38	19	[1] 3m, 2st, 14t (*)	Palermo, Italia	Vitturi et al. (1983)
Subclase Anomalodesmata					
Superfamilia Pandoracea					
Familia Laternulidae					
<i>Laternula elliptica</i>	40		[2] 2m, 1sm, 2st-t, 2t-st, 13t (*)	Islas Kerguelen, Antártida	Thiriót-Quéievreux et al. (1991)

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700757409