

Análisis cariotípico y variabilidad de los Ag-NOR en *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819)

I. Cross, L. Vega y L. Rebordinos

Laboratorio de Genética. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Cádiz. Polígono del Río San Pedro. E-11510 Puerto Real (Cádiz), España. Correo electrónico: ismael.cross@uca.es

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

RESUMEN

El estudio de la caracterización genética en las especies acuícolas de ostras es el preámbulo imprescindible de los futuros programas de mejora por manipulación cromosómica. Se ha realizado el cariotipo de *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) y se han encontrado diferencias con respecto a otros trabajos publicados. Mediante tinción con plata, se analizó la localización y la variabilidad de las regiones organizadoras del nucleolo (Ag-NOR). Estas regiones se han visualizado en el par cromosómico número 10, aunque, esporádicamente, también se han observado NOR en otros cromosomas, lo que se describe aquí por primera vez para esta especie. Por otra parte, se ha observado una gran variabilidad, tanto entre individuos como dentro de ellos, en cuanto al número de cromosomas que presentan actividad Ag-NOR.

Palabras clave: Ostras, *Crassostrea angulata*, cariotipo, NOR, nucleolos.

ABSTRACT

Karyotype analysis and variability of Ag-NOR in Crassostrea angulata (Lamarck, 1819)

Genetic characterization of oyster species is the basis of future breeding programmes by chromosome manipulation. We determined the karyotype of *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819), and found some differences with regard to previously published reports. The nucleolus organizer regions (NOR), visualized using the silver stain method, were located on chromosome pair number 10, although NORs were occasionally detected on some other chromosomes, which had not been described before for this species. We also found a very high inter and intra-population variability in the number of chromosomes showing Ag-NOR activity.

Keywords: Cupped oyster, *Crassostrea angulata*, karyotype, NOR, nucleolus.

INTRODUCCIÓN

Hasta hace unas décadas, el estudio citogenético en los bivalvos se reducía al recuento de cromosomas de las especies analizadas (Patterson, 1969). Posteriormente, con las técnicas convencionales de tinción se ha establecido un conjunto de índices que permite clasificar cada cromosoma dentro del cariotipo, y esto es muy útil para reali-

zar estudios comparativos, dentro de cada especie y entre ellas.

En los bivalvos, las especies de la familia Ostreidae han sido las más estudiadas, principalmente, por su interés en acuicultura. Hasta ahora se han analizado 22 especies de ostras, y todas ellas, salvo *Dendrostrea folium* (Linnaeus, 1758) (Ieyama, 1990), poseen 10 parejas de cromosomas ($2n = 20$) (Nakamura, 1985). Las ostras del género

Crassostrea Sacco, 1897 presentan cromosomas meta- o submetacéntricos, lo que dificulta su correcta clasificación en la elaboración de los cariotipos (Leitao *et al.*, 1999b).

Se han descrito diferencias en la morfología de los cromosomas entre individuos de la misma especie, y esto puede deberse tanto a polimorfismos intraespecíficos como a diferencias en las técnicas de reconocimiento empleadas (Sharma y Sharma, 1980). Las técnicas de bandeo, como los bandeos C y G, han demostrado ser útiles en la identificación de cromosomas, y se han utilizado en algunas especies de bivalvos, por ejemplo, en especies de los géneros *Mytilus* Linnaeus, 1758, *Ostrea* Linnaeus, 1758 y *Crassostrea* (Dixon, McFadzen y Sisley, 1986; Martínez-Lage, González-Tizón y Méndez, 1994; Insua y Thiriot-Quévieux, 1991; Leitao *et al.*, 1999b). Sin embargo, los patrones de bandeo no siempre son claros, y, en ocasiones, su interpretación no es la adecuada.

La hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) es una técnica para localizar secuencias concretas de ADN en el genoma de una especie, y puede usarse, también, como marcador para la identificación individual de cromosomas. Hasta ahora, se ha utilizado en muy pocas especies de bivalvos, entre las que se encuentran *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 y *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (Insua y Méndez, 1998; Martínez-Expósito, Méndez y Pasantes, 1997; Clabby *et al.*, 1996).

Por otro lado, los métodos de tinción con plata para detectar las regiones organizadoras de los nucleolos (Ag-NOR) en cromosomas metafásicos han sido muy usados, tanto como marcadores citogenéticos como para realizar estudios comparativos de la actividad NOR, dentro de cada especie y entre ellas. Con esta técnica se tiñen sólo los NOR que han sido activos en la interfase anterior y, por esto, las diferencias en el número de NOR por célula reflejan el número de NOR activos. Los NOR localizados mediante la técnica de tinción con nitrato de plata representan las regiones cromosómicas que contienen múltiples copias de los genes de ADN_r (Reeder, 1990; Schwarzacher, Mikelsaar y Schnedl, 1978).

En todas las especies estudiadas se encuentra, por lo menos, una pareja de cromosomas que contienen NOR, aunque puede haber más, de manera que debe existir un par de nucleolos por cada par cromosómico con actividad NOR. Sin embargo, los nucleolos tienden a fusionarse, y se puede apreciar un solo nucleolo por célula, independientemente de los

pares de cromosomas con actividad NOR existentes. Aun así, el estudio de los nucleolos sirve para confirmar el número máximo de NOR en una especie (Martínez-Expósito, Pasantes y Méndez, 1994).

Con estos precedentes, en este trabajo se ha llevado a cabo un análisis citogenético de *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819), también conocida como ostra portuguesa u ostión. Tiene un valor comercial importante, sobre todo en el suroeste de la Península, por lo que su estudio y el conocimiento de su caracterización genética son muy interesantes de cara a futuros programas de mejora en su acuicultura por manipulación cromosómica. Con este fin, se establece aquí el cariotipo de *C. angulata* y se analizan también la posición, la actividad y la variabilidad de las regiones organizadoras del nucleolo mediante la técnica de tinción con plata (Ag-NOR) en los ejemplares de las poblaciones naturales muestreadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se muestrearon cinco poblaciones de *C. angulata* a lo largo de aproximadamente 100 km de costa de la bahía de Cádiz (suroeste de la península Ibérica); se tomaron ejemplares de La Jara (desembocadura del río Guadalquivir, en Sanlúcar de Barrameda), Corrales (Chipiona), El Chato (Cádiz), Sancti Petri (desembocadura del río Sancti Petri, en Chiclana) y Roche-El Palmar (Conil). Para la elaboración del cariotipo de *C. angulata* se mantuvieron los ejemplares de 2-3 cm de longitud en tanques bien aireados y alimentados *ad libitum* durante dos días con una mezcla de fitoplancton compuesta por *Tetraselmis chuii*, *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros* sp. Después de mantener los individuos durante 8 horas en colchicina, se sometían a un choque hipotónico (tres cambios con KCl a 0,4 % en un tiempo total de 1 h) y, por último, se fijaban en Carnoy (Thiriot-Quévieux, 1984).

Realizadas las preparaciones, se tiñeron con Giemsa y se fotografiaron las placas metafásicas mejores; los cromosomas se emparejaron en función de la posición del centrómero y se determinaron los índices siguientes:

- Longitud relativa:

$$100 \frac{\text{longitud del cromosoma}}{\text{longitud total haploide}}$$

- *Arm ratio*:

$$\frac{\text{longitud del brazo largo}}{\text{longitud del brazo corto}}$$

- Centromérico:

$$\frac{\text{longitud del brazo corto}}{\text{longitud total del cromosoma}}$$

La nomenclatura de los cromosomas es la descrita por Levan, Fredga y Sandberg (1964); para la localización de los NOR se ha usado la técnica de tinción con nitrato de plata según Howell y Black (1980), introduciendo algunas modificaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha realizado el cariotipo de *C. angulata* a partir del examen de 10 placas metafásicas de 10 individuos muestreados, y está compuesto por $2n = 20$ cromosomas (figura 1). Este número cromosómico es común a casi todas las especies de ostras y ya había sido señalado por Thiriot-Quévèreux (1984). Todos los cromosomas se clasificaron como metacéntricos, como se puede observar en la tabla I,

donde se muestran los valores obtenidos de longitud relativa, índice centromérico y *arm ratio*, según la nomenclatura de Levan, Fredga y Sandberg (1964). Conforme a los datos de longitud relativa e índice centromérico detallados se realizó el idiograma de *C. angulata* (figura 2).

Al comparar el cariotipo obtenido en este estudio con el obtenido por Leitao *et al.* (1999a) para esta especie, se observó que el par cromosómico número 8 en ese análisis se clasificó como submetacéntrico. La diferencia observada puede ser imputable a diferencias en la técnica de identificación, por la posible influencia del grado de condensación de los cromosomas en el momento de la medición de los brazos. Por otro lado, datos anteriores (Thiriot-Quévèreux, 1984) indicaban que todos los cromosomas de *C. angulata* son metacéntricos, clasificación que coincide con la obtenida por nuestro grupo de investigación en este trabajo. Dada la discrepancia, serían necesarios datos adicionales para la confirmación de una clasificación u otra.

Por otro lado, en este trabajo se estudia la variabilidad de los Ag-NOR en 31 individuos pertenecientes a seis poblaciones naturales de *C. angulata*,

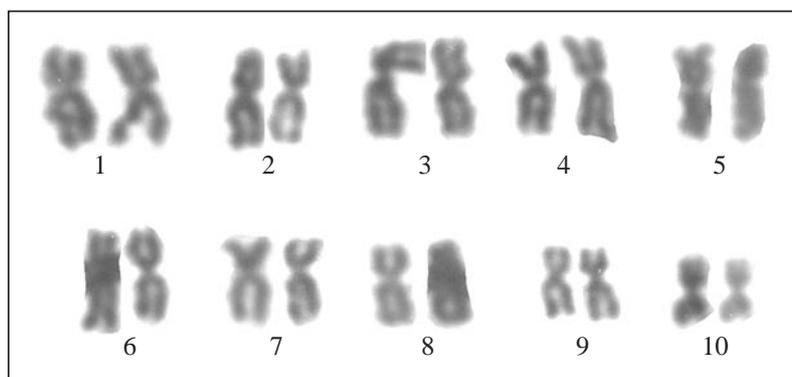


Figura 1. Cariotipo de *Crassostrea angulata*.

Tabla I. Clasificación de los cromosomas de *Crassostrea angulata* según los índices longitud relativa (LR), centromérico (IC) y *arm ratio* (AR). Media: cada valor es la media aritmética de 10 metafases. (DE): desviación estándar; (m): metacéntrico.

Par cromosómico	LR		IC		AR		Tipo
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
1	12,61	0,82	42,20	3,69	0,74	0,11	m
2	11,69	0,70	43,01	3,66	0,76	0,11	m
3	11,18	0,45	43,68	4,49	0,78	0,14	m
4	10,60	0,51	41,83	2,96	0,71	0,10	m
5	10,18	0,26	41,83	4,30	0,72	0,13	m
6	9,85	0,26	42,24	4,74	0,74	0,14	m
7	9,39	0,43	41,43	4,21	0,69	0,10	m
8	8,91	0,64	43,81	3,17	0,78	0,10	m
9	8,34	0,69	42,97	4,06	0,76	0,11	m
10	6,94	0,58	42,08	3,46	0,73	0,10	m

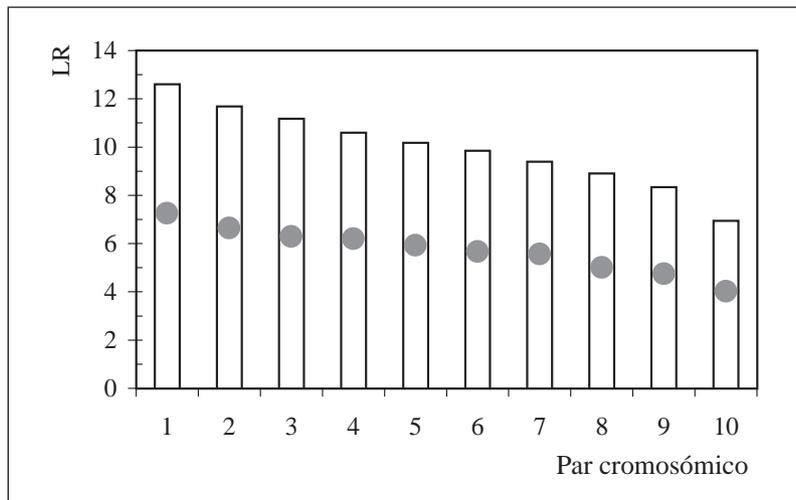


Figura 2. Idiograma de *C. angulata*. En el eje de ordenadas se muestra la longitud relativa (LR) de cada par cromosómico obtenida en la tabla I.

con una media de 30 placas metafásicas por cada uno de los ejemplares muestreados. En la tabla II se presenta el número de metafases que mostraba cada individuo analizado, con 1, 2, 3 y 4 Ag-NOR activos. Se puede observar que hay uno o dos cromosomas con actividad Ag-NOR en la mayoría de los casos. Así, el 51,22 % de las metafases analizadas presentaron sólo un cromosoma con señal Ag-NOR y el 46,92 % de las placas presentaron dos. Sin embargo, una minoría de ellas, el 1,75 %, mostraron tres cromosomas con Ag-NOR y, por último, sólo el 0,09 % de las placas delataba regiones con cuatro cromosomas activos.

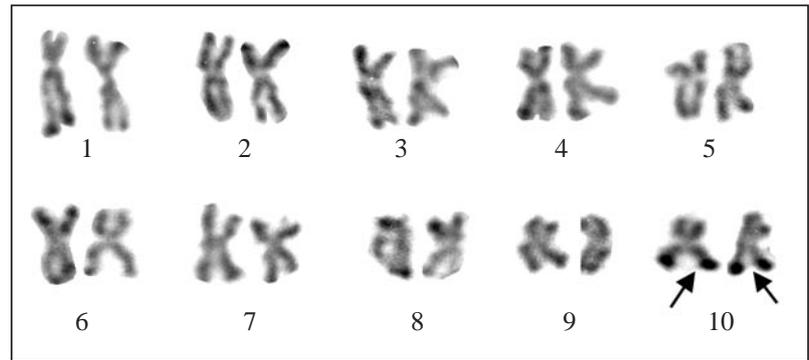
Como consecuencia, se puede deducir que, en general, existe una pareja de cromosomas en *C. angulata* con actividad Ag-NOR. En todos los casos, la señal se encontró en la región telomérica del cromosoma número 10 según su clasificación en el cariotipo. Es decir: los genes que codifican para ARNr se encuentran localizados, mayoritariamente, en una pareja de cromosomas, o, por lo menos, se están expresando en ella (figura 3). Esta localización de Ag-NOR en *C. angulata* coincide con lo descrito previamente por Leitao *et al.* (1999a) en esta misma especie y por Thiriot-Quévèreux e Insua (1992) en *C. gigas*.

Los resultados son diferentes en otras especies de ostras. Así, en *Crassostrea sikamea* (Amemiya, 1928), *C. ariakensis* (Fujita, 1913), *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley, 1933) (Leitao *et al.*, 1999a) y *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758 (Thiriot-Quévèreux e Insua, 1992) los NOR se encuentran en la región telomérica de los cromosomas 9 y 10; en *C. virginica* (Gmelin, 1791) se encuentran en las parejas 1 y 5; en *C. gasar* (Adanson, 1757) en la pa-

Tabla II. Variabilidad de los Ag-NOR en *C. angulata*.

Individuo	Células con diferente número de NOR				Total metafases
	1 cromosoma	2 cromosomas	3 cromosomas	4 cromosomas	
La Jara 1	12	7	1		20
La Jara 2	10	9			19
La Jara 3	53	72	1		126
La Jara 4	21	34	1		56
La Jara 5	25	23	1		49
La Jara 6	20	8			28
La Jara 7	11	9	1		21
El Chato 1	7	10			17
El Chato 2	13	8			21
El Chato 3	34	13			47
Roche EP 1	14	10	1		25
Roche EP 2	7	9			16
Roche EP 3	28	29			57
Roche EP 4	7	13	1		21
Roche EP 5	9	9	2		20
Roche EP 6	33	17	1		51
Roche EP 7	28	26	1		55
Roche EP 8	7	9			16
Santi Petri 1	10	15			25
Santi Petri 2	8	9			17
Santi Petri 3	11	9			20
Santi Petri 4	11	9			20
Santi Petri 5	20	8	1	1	30
Santi Petri 6	17	14	1		32
Corrales 1	17	14			31
Corrales 2	14	12	1		27
Corrales 3	19	9	1		29
Corrales 4	15	24	2		41
Corrales 5	21	13			34
Corrales 6	12	21			33
Corrales 7	11	9	1		21
Total	525	481	18	1	1025
Porcentaje	51,51	46,92	1,75	0,09	

Figura 3. Localización de los Ag-NOR en el cariotipo de *C. angulata*.



reja cromosómica 2 (Leitao *et al.*, 1999a); y en *O. denselamellosa* Lischke, 1869 los NOR se encuentran en las parejas 3 y 8. En cuanto al heteromorfismo hallado en la pareja cromosómica que presenta más frecuentemente la actividad Ag-NOR, es una característica muy común y ya descrita en otros moluscos marinos, como el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Martínez-Expósito, Pasantes y Méndez, 1994) y las ostras *C. gigas*, *O. edulis* y *O. denselamellosa* (Insua y Thiriot-Quévieux, 1991; Thiriot-Quévieux e Insua, 1992), entre otros.

Por otra parte, a la vista de los datos detallados en la tabla II, también se puede deducir que existen otros cromosomas en *C. angulata* que presentan actividad Ag-NOR (se detectan señales en 3 y 4 cromosomas), hecho que se describe aquí por primera vez para esta especie. Estas señales, sin embargo, sólo se localizan cuando se estudia un número elevado de metafases, ya que su frecuencia es muy baja. Esto admite dos interpretaciones: que estos genes, aun encontrándose siempre en dos parejas cromosómicas, sólo se expresen en dos cromosomas, o bien que sólo se encuentren en una pareja y, en raras ocasiones, también en otros cromosomas. La primera hipótesis entraña variaciones funcionales de los genes de ADN_r; la segunda asume una explicación estructural para el polimorfismo encontrado.

La razón de que no se encontraran señales en más de 2 cromosomas en el trabajo de Leitao *et al.* (1999a), donde se describe por primera vez la localización de los Ag-NOR en *C. angulata*, probablemente sea que sólo se analizaron 31 placas metafásicas. La presencia de estos Ag-NOR adicionales ha sido descrita previamente en cromosomas de *M. galloprovincialis* (Martínez-Expósito, Pasantes y Méndez, 1994), especie en la que, sin embargo, también se han descrito deleciones en *loci* ribosomales mediante FISH.

El polimorfismo encontrado en estas especies puede entenderse desde el punto de vista funcional, ya que la síntesis de ADN_r se encuentra integrada en el metabolismo celular. En el caso de los mejillones, se han demostrado respuestas, tanto bioquímicas como fisiológicas, a los cambios ambientales (Hawkins y Bayne, 1992); así, la expresión diferencial de los NOR podría estar influida por condiciones externas.

Desde el punto de vista estructural, la variación intraindividual en el número de *loci* ribosomales ha sido descrita en otros organismos, tanto en forma de *loci* adicionales (Lucchini *et al.*, 1993) como en forma de deleciones (Garrido-Ramos *et al.*, 1995). El incremento en los *loci* ribosomales podría contribuir a la evolución de la población a largo plazo; sin embargo, su reducción podría producir daños irreparables, como se ha descrito en *Xenopus*, donde una reducción del 50% en el número de copias de ADN_r causaba la muerte del individuo portador de esta deleción (Miller y Knowland, 1972). Por otro lado, se han descrito procesos de translocación de los NOR entre cromosomas en *M. galloprovincialis* en algunas líneas celulares (Martínez-Expósito, Méndez y Pasantes, 1997; Insua y Méndez, 1998), que podrían tener origen mitótico y haberse producido durante el desarrollo del individuo portador de la mutación.

Para confirmar con cierta fiabilidad los datos obtenidos, se realizó un estudio de los nucleolos de *C. angulata*. De esta manera, si existe más de un par cromosómico con actividad Ag-NOR en algunas líneas celulares o individuos, como indican los resultados obtenidos, deberían encontrarse algunos núcleos con 3 o 4 nucleolos, cada uno de ellos resultado de la transcripción de los *loci* ribosomales de la célula. En total se analizaron más de 6000 núcleos pertenecientes a 51 individuos y, como se aprecia en la figura 4, se han encontrado núcleos con 1, 2, 3 y 4 nucleolos. En la tabla III se puede

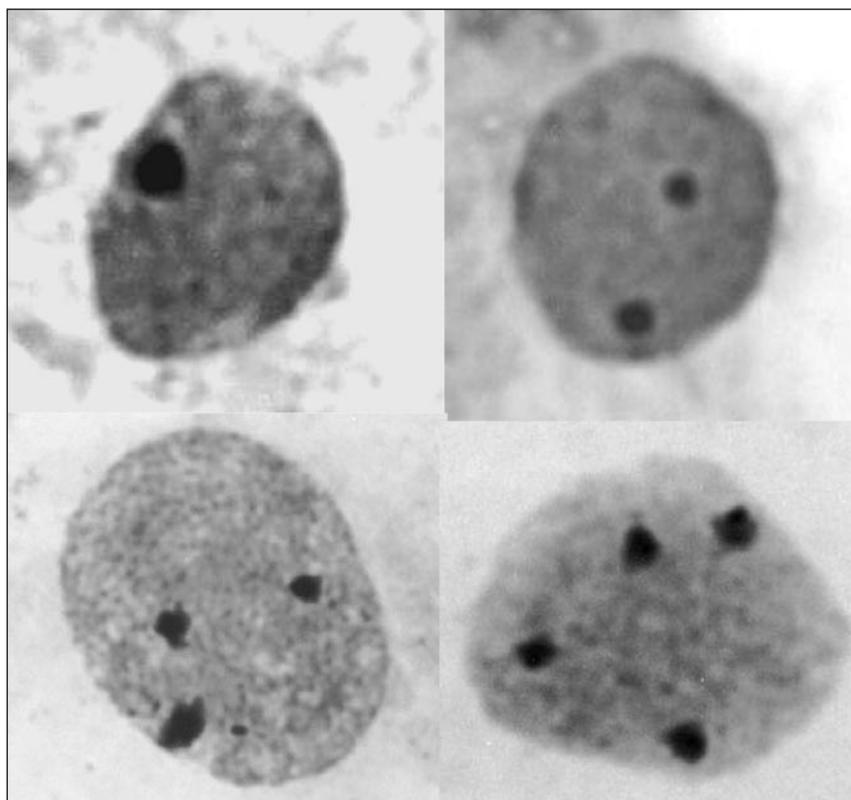


Figura 4. Núcleos interfásicos de *C. angulata* mostrando uno, dos, tres y cuatro nucleolos.

Tabla III. Frecuencia de nucleolos en *C. angulata*. (N): número de individuos.

Población (N)	Núcleos con diferente número de nucleolos				Total
	1 nucleolo	2 nucleolos	3 nucleolos	4 nucleolos	
La Jara (11)	681	736	20	3	1 441
El Chato (7)	469	470	7	3	949
Sancti Petri (9)	551	502	6	0	1 059
Roche-El Palmar (17)	1 014	1 022	23	8	2 066
Corrales (7)	439	371	11	1	822
Total	3 154	3 101	72	15	6 342
Frecuencia	0,497	0,488	0,0113	0,0023	

comprobar que las frecuencias de núcleos con 3 y 4 nucleolos fueron 0,011 y 0,0023, similares a las obtenidas en el análisis de Ag-NOR en las placas metafásicas.

Los resultados del análisis de los nucleolos confirman la existencia de líneas celulares con *loci* ribosomales en más de dos cromosomas, aunque no podemos concretar si las variaciones encontradas dentro de los individuos y entre ellos son funcionales o estructurales.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J. J. Pasantes (Universidad de Vigo) por su ayuda en la puesta a punto de las técnicas citogenéticas y a José Luis Guzmán Llanos por su aportación a la asistencia técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- Clabby, C., U. Goswami, F. Flavin, N. P. Wilkins, J. A. Houghton y R. Powell. 1996. Cloning, characterisation and chromosomal location of a satellite DNA from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 168: 205-209.
- Dixon, D. R., I. R. B. McFadzen y K. Sisley. 1986. Heterochromatic marker regions (nucleolar organizer) in the chromosomes of the common mussel, *Mytilus edulis* (Mollusca: Pelecypoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 9: 205-212.
- Garrido-Ramos, M. A., M. Jamilena, R. Lozano, S. Cárdenas, C. Ruiz-Rejón y M. Ruiz-Rejón. 1995. Cytogenetic analysis of gilthead seabream *Sparus aurata* (Pisces, Perciformes), a deletion affecting the NOR in a hatchery stock. *Cytogenet. Cell Genet.* 68: 3-7.
- Hawkins, A. J. S. y B. L. Bayne. 1992. Physiological interrelations, and the regulation of production. In: *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. E. Gosling (ed.): 171-222. Elsevier. Amsterdam.
- Howell, W. M. y D. A. Black. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.

- Ieyama, H. 1990. Chromosomes of the oysters, *Hyotissa imbricata* and *Dendostrea folium* (Bivalvia: Pteriomorphia). *Venus Jpn. J. Malacol.* 49: 63-68.
- Insua, A. y J. Méndez. 1998. Physical mapping and activity of ribosomal RNA genes in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Hereditas* 128: 189-194.
- Insua, A. y C. Thiriot-Quiévreux. 1991. The characterization of *Ostrea denselamellosa* (Mollusca, Bivalvia) chromosomes: karyotype, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. *Aquaculture* 97: 317-325.
- Leitao, A., P. Boudry, J. P. Labat y C. Thiriot-Quiévreux. 1999a. Comparative karyological study of cupped oyster species. *Malacologia* 41 (1): 175-186.
- Leitao, A., C. Thiriot-Quiévreux, P. Boudry e I. Malheiro. 1999b. A 'G' chromosome banding study of three cupped oyster species: *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and *Crassostrea virginica* (Mollusca: Bivalvia). *Genet. Sel. Evol.* 31: 519-527.
- Levan, A., K. Fredga y A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromere position in chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lucchini, S. de, I. Nardi, G. Barsacchi y R. Batistoni. 1993. Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. *Genome* 36: 762-773.
- Martínez-Expósito, M. J., J. Méndez y J. J. Pasantes. 1997. Analysis of NOR and NOR-associated heterochromatin in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Chromosome Research* 5: 268-273.
- Martínez-Expósito, M. J., J. J. Pasantes y J. Méndez. 1994. NOR activity in larval and juvenile mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 175: 155-165.
- Martínez-Lage, A., A. González-Tizón y J. Méndez. 1994. Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity* 72: 242-249.
- Miller, L. y J. Knowland. 1972. The number and activity of ribosomal RNA genes in *Xenopus laevis* embryos carrying partial deletions in both nucleolar organizers. *Biochem. Genet.* 6: 65-73.
- 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 Jpn. J. Malacol.* 44: 193-225.
- Patterson, C. M. 1969. Chromosomes of molluscs. En: *Proceedings of the 2nd Symposium on Mollusca* (12-16 de enero, 1968. Ernakulam (Cochin), India). *J. Mar. Biol. Assoc. (India)* 2: 635-690.
- Reeder, R. H. 1990. rRNA synthesis in the nucleolus. *Trends Genet.* 6: 390-395.
- Schwarzacher, H. G. A., V. Mikelsaar y W. Schnedl. 1978. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenet. Cell Genet.* 20: 24-39.
- Sharma, A. K. y A. Sharma. 1980. *Chromosome techniques: Theory and practices*. 3.^a edición. Butterworths. Londres: 711 pp.
- Thiriot-Quiévreux, C. 1984. Analyse comparee des caryotypes d'ostreidae (Bivalvia). *Cahiers de Biologie Marine* XXV: 407-418.
- Thiriot-Quiévreux, C. y A. Insua. 1992. Nucleolar organiser region variation in the chromosomes of three oyster species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 157: 33-40.