



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias  
Departamento de Bioloxía Celular e Molecular  
Área de Xenética

**Estudio citogenético en el erizo de mar *Paracentrotus lividus*  
(Lamarck, 1816)**

**Estudo citoxenético no ourizo de mar *Paracentrotus lividus*  
(Lamarck, 1816)**

**Cytogenetic study in the sea urchin *Paracentrotus lividus*  
(Lamarck, 1816)**

**Inés González Castellano**

Trabajo de Fin de Grado  
29 de junio de 2015

Directores: Andrés Martínez Lage  
Zeltia Torrecilla Pérez



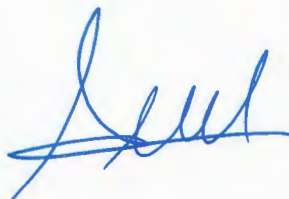


Facultade de Ciencias  
Departamento de Bioloxía Celular e Molecular  
Área de Xenética

## TRABAJO FIN DE GRADO

D. Andrés Martínez Lage y Dña. Zeltia Torrecilla Pérez autorizan la presentación del trabajo de fin de grado “Estudio citogenético en el erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)” presentado por Inés González Castellano para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 19 de Junio de 2015



Fdo.: Andrés Martínez Lage



Zeltia Torrecilla Pérez

Directores del trabajo



## RESUMEN

El erizo de mar común *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) es la especie diana de la pesquería de erizo en Europa. A pesar de que esta especie alcanza su máxima abundancia en las costas gallegas, la sobreexplotación de los bancos está conduciendo a su colapso. Actualmente se están estudiando estrategias para la acuicultura y la recuperación de poblaciones naturales del erizo de mar común. Análisis genéticos en esta especie, como el desarrollo de marcadores cromosómicos o estudios filogeográficos, pueden proporcionar herramientas útiles para una gestión comercial sostenible. Este trabajo avanza en la caracterización citogenética de *P. lividus* a la vez que estudia la optimización de protocolos para la obtención de metafases, a partir de tejidos adultos y embrionarios, y la herencia del DNA mitocondrial. Los resultados obtenidos revelan que la dotación diploide en *P. lividus* es  $2n = 36$  así como la existencia de dos *loci* rDNA 18S-5.8S-28S, la presencia de repeticiones de la secuencia telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> en los telómeros de todos los cromosomas y la herencia uniparental materna de las mitocondrias. Este trabajo puede considerarse un buen punto de partida para la mejora de protocolos destinados a la obtención de metafases de calidad en la clase Echinoidea. Asimismo, los datos proporcionados permiten incrementar el conocimiento actual de la evolución cromosómica de los equinodermos, un grupo escasamente estudiado a nivel citogenético a día de hoy.

## SUMMARY

The common sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) is the target species of European sea urchin fishery. Although this species reaches its maximum richness in the Galician coasts, the overexploitation of sea urchin stocks is leading to its collapse. Nowadays, strategies for aquaculture and the recovering of natural populations for the common sea urchin are being studied. Genetic analysis in this species, as development of chromosome markers or phylogeographic studies, can provide helpful tools for sustainable commercial management. This work goes into detail about cytogenetic characterization of *P. lividus*. It also studies the optimization of protocols for obtaining metaphases, from both adult and embryonic tissues. Finally, the mitochondrial DNA inheritance has been verified. The results reveal that diploid number is  $2n = 36$  as well as the existence of two rDNA 18S-5.8S-28S *loci*, the presence of telomeric sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> repeats in each chromosome telomeres and the maternal uniparental inheritance of mitochondria. This work can be considered a good starting point for improving cytogenetic protocols for Echinoidea class. At the same time, data provided allow to increase the current knowledge of echinoderms chromosome evolution, a poorly cytogenetically studied group until now.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN .....	9
OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Obtención de preparaciones metafásicas a partir de tejido adulto.....	15
Obtención de preparaciones metafásicas a partir de embriones.....	16
Inducción del desove de los gametos.....	16
Fecundación <i>in vitro</i> .....	16
Obtención de preparaciones metafásicas.....	17
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	18
Marcaje de las mitocondrias paternas.....	19
Fotografiado.....	19
RESULTADOS.....	20
Obtención de preparaciones metafásicas a partir de tejido adulto .....	20
Obtención de preparaciones metafásicas a partir de embriones.....	20
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	22
Localización de los genes 18S-5.8S-28S.....	22
Localización de las repeticiones teloméricas.....	23
Marcaje de las mitocondrias paternas.....	24
DISCUSIÓN.....	26
Obtención de preparaciones metafásicas a partir de tejido adulto.....	26
Obtención de preparaciones metafásicas a partir de embriones.....	27
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	28
Localización de los genes 18S-5.8S-28S.....	28
Localización de las repeticiones teloméricas.....	29
Herencia de las mitocondrias paternas.....	30
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	31
REFERENCIAS.....	32
ABREVIATURAS.....	35





## INTRODUCCIÓN

El erizo de mar común *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) es un erizo de mar ampliamente distribuido por el Mar Mediterráneo y la costa noreste atlántica, desde Escocia e Irlanda hasta Marruecos y las islas Canarias (Boudouresque y Verlaque, 2001). La abundancia máxima de esta especie se da a lo largo de las costas gallegas (Tourón-Besada, 2012). Considerada inequívocamente como una especie litoral, ocupa sustratos duros, desde la franja intermareal hasta los fondos infralitorales (Míguez-Rodríguez, 2009). Es común que las poblaciones de *P. lividus* alcancen densidades elevadas en zonas poco profundas sobre rocas o en charcas intermareales (Stefano, 2013).

Esta especie presenta un cuerpo redondeado, aplanado, asemejándose su aspecto general a una estructura discoidal. Se trata de un erizo regular de simetría pentarradial con un caparazón rígido cubierto totalmente de púas, abundantes y de tamaño irregular, pero todas ellas largas y cónicas (Figura 1). A pesar de que el color predominante es el violeta, la coloración varía desde el verde al pardo y rojo, pero siempre en tonos muy oscuros, siendo a su vez frecuentes los ejemplares albinos (Míguez-Rodríguez, 2009).



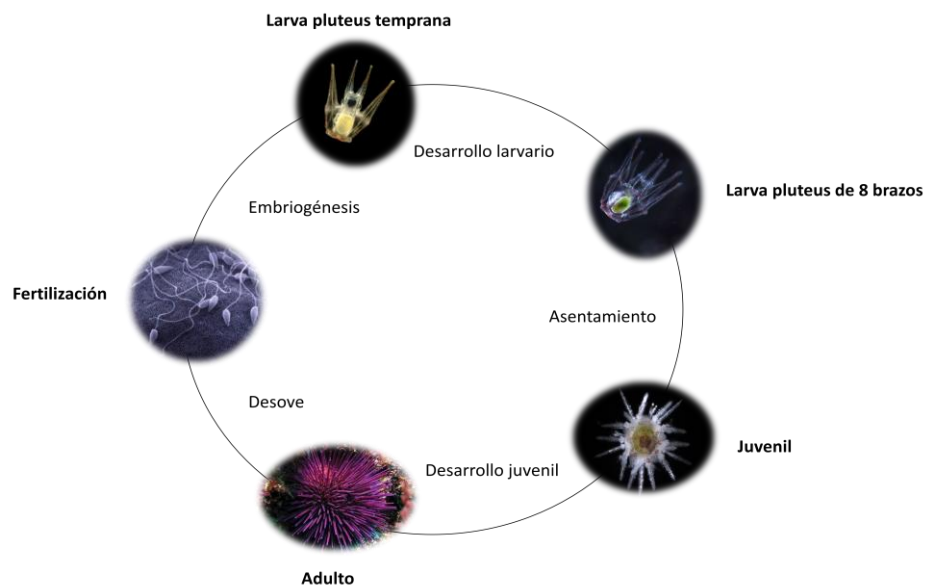
**Figura 1.** *Paracentrotus lividus*. Imagen tomada de [www.marlin.ac.uk](http://www.marlin.ac.uk)

*Paracentrotus lividus* es una especie explotada en algunas regiones europeas debido a sus valoradas gónadas. Los países con pesquerías más activas en Europa son Irlanda, Escocia, Italia y España (Paredes *et al.*, 2015). En España, *P. lividus* es la especie más abundante y la especie diana de la pesquería de erizo de mar. La mayoría de las capturas españolas proceden de Galicia, dónde la pesca se realiza entre octubre y abril, coincidiendo con el desarrollo de las gónadas del erizo, las cuales constituyen la vianda consumida y, por lo tanto, la parte que posee interés comercial (Fernández-Boán *et al.*, 2012). En Europa y en Galicia, además de *P. lividus*, existen otras especies de erizo de mar, las cuales apenas poseen valor económico (Tourón-Besada, 2012).

Se considera que las pesquerías de erizo gallegas poseen el potencial de ser muy exitosas (Fernández-Boán *et al.*, 2012), sin embargo, la pesca de *P. lividus* durante las últimas décadas ha conducido a la sobreexplotación de muchas poblaciones naturales, documentándose varios casos de colapso a nivel mundial (Paredes *et al.*, 2015). Por ello, es urgente revisar las políticas de gestión que gobiernan la explotación de este recurso con el fin de desarrollar nuevas estrategias que garanticen la sostenibilidad de estas pesquerías (Ouréns *et al.*, 2013). A día de hoy se están desarrollando estrategias para la acuicultura de esta especie, especialmente enfocadas en la cría larvaria (Paredes

*et al.*, 2015), y para recuperar el estado de sobreexplotación de los bancos de *P. lividus* en el litoral gallego mediante repoblaciones de los mismos (Tourón-Besada, 2012).

Al tratarse de una especie comercial, su reproducción resulta muy importante (Míguez-Rodríguez, 2009). Un conocimiento minucioso de su ciclo reproductivo (Figura 2) es necesario para una explotación comercial sostenible de los *stocks* naturales, a fin de proporcionar desoves en los criaderos durante todo el año y suministrar a los mercados un producto de calidad (Stefano, 2013).



**Figura 2.** Ciclo de vida de los erizos de mar.

*Paracentrotus lividus* es una especie dioica, sin dimorfismo sexual, aunque se ha observado que los machos son ligeramente más puntiagudos que las hembras (Míguez-Rodríguez, 2009). Posee cinco gónadas adheridas a la superficie interna del caparazón, a lo largo de las áreas interambulacrales (Tourón-Besada, 2012). En las hembras, las gónadas son rojo brillante, mientras que en los machos son blancas o amarillo muy pálido (Míguez-Rodríguez, 2009). En *P. lividus* los eventos de desove no suelen implicar a todos los individuos de la población. Frecuentemente, grupos de 10 o 20 individuos se agregan durante unas horas y liberan sus gametos a la columna de agua. Tales eventos de desove se suceden durante todo el año a lo largo de la distribución geográfica de la especie (Stefano, 2013).

Una vez que los gametos han sido liberados al medio, se produce la atracción quimiotáctica entre los espermatozoides y los óvulos. Como resultado de dicha quimioatracción y, tras tener lugar la reacción acrosómica y el reconocimiento especie-específico entre los gametos de *P. lividus* mediante las bindinas, se produce la fusión de las membranas plasmáticas y de los núcleos haploides de los gametos (Stefano, 2013; Gilbert, 2014). Los óvulos fertilizados requieren un mecanismo que evite la formación y el desarrollo de cigotos polispermicos (Stefano, 2013). Los equinodermos presentan dos mecanismos que previenen la polispermia: el bloqueo rápido y el bloqueo lento. La fecundación provoca la exocitosis del contenido de los gránulos corticales del óvulo al pequeño espacio que existe entre la membrana plasmática y la membrana vitelina del mismo. Los mucopolisacáridos liberados absorben agua, expandiendo dicho espacio, y la membrana vitelina se transforma así en la membrana de fertilización, la cual constituye el bloqueo lento de la polispermia. Por su parte, el

bloqueo rápido de la polispermia evita que se produzca la polispermia antes de que la membrana de fertilización esté completamente formada. La entrada del espermatozoide en el óvulo desencadena la despolarización de su membrana. Los espermatozoides no pueden fusionarse con un óvulo que presenta un potencial de membrana positivo, por lo que ningún espermatozoide podrá fusionarse de nuevo con los óvulos fecundados durante los minutos que dura la despolarización (Vacquier, 2011; Gilbert, 2014).

Tras la fecundación y fusión de los pronúcleos comienza la segmentación del cigoto. Los erizos de mar experimentan una segmentación holoblástica radial que avanza hacia el estadio de blástula, fase durante la cual el embrión eclosiona de la membrana de fertilización. Las células de la blástula de vida libre poseen cilios que otorgan al embrión capacidad de natación. La embriogénesis prosigue con la gastrulación, en la cual tiene lugar la formación del tubo digestivo primitivo, el arquenteron, cuya apertura se denomina blastoporo. A medida que se forma y crece el esqueleto de fosfato cálcico del embrión, su forma cambia y adquiere el aspecto de la característica larva pluteus de los erizos de mar. La larva pluteus es una larva pelágica que posee primero cuatro y, posteriormente, seis y ocho brazos que portan estructuras de alimentación ciliadas sostenidas por el esqueleto calcáreo (Figura 2). El desarrollo larvario implica cambios significativos en la estructura corporal de la larva y culmina con el asentamiento de la misma sobre el sustrato. Tras dicho asentamiento, la larva sufre la metamorfosis y adquiere el plan corporal de los erizos juveniles, que continúan su desarrollo hacia el estadio adulto (Tourón-Besada, 2012; Stefano, 2013).

A pesar de su importancia en la biología del desarrollo y la biología molecular y de su interesante relación filogenética con los cordados, los cromosomas de los equinodermos han sido escasamente estudiados a día de hoy (Duffy *et al.*, 2007). Los análisis citogenéticos son importantes debido a que proporcionan información acerca del número y la morfología de los cromosomas de una especie, de la distribución diferencial de las regiones eucromáticas y heterocromáticas, de la ocurrencia de reordenamientos cromosómicos a lo largo de la evolución, de las relaciones filogenéticas entre taxones, etc., y a su vez ayudan a clarificar el estatus de las especies, lo cual es extremadamente importante en la biología de la conservación, y son de gran utilidad en programas de mejora genética (González-Tizón *et al.*, 2013a; González-Tizón *et al.*, 2013b). Tal y como publicaron Duffy y col. (2007), la carencia de información citogenética en los equinodermos se relaciona en parte con las dificultades inherentes derivadas de trabajar con sus cromosomas, lo cual da lugar a que la mayoría de los estudios sean numéricos y no estructurales. Además, sostienen que la dificultad de los estudios citogenéticos en equinodermos se debe al pequeño tamaño de sus cromosomas, a su elevado grado de empaquetamiento, a la presencia de índices mitóticos muy bajos en tejidos adultos, al elevado grado de sincronización en los ciclos celulares y a la dificultad de obtener preparaciones meióticas de tejido gonadal de elevada calidad. Así, mientras que el filo Echinodermata contiene cerca de 7000 especies, sólo se han llevado a cabo estudios citogenéticos en 80 taxones, aproximadamente el 1.1% de las especies descritas.

En lo que respecta a los erizos de mar (clase Echinoidea), los primeros estudios cromosómicos fueron realizados a partir de preparaciones obtenidas mediante cortes histológicos de óvulos fertilizados (Saotome, 1982). Esta técnica se considera obsoleta y, por lo tanto, es necesario verificar los datos obtenidos mediante ella. Así, cabe puntualizar que en la actualidad únicamente se consideran fiables los datos posteriores al año 1952, cuándo se introdujeron las técnicas de choque hipotónico, la utilización de cultivos celulares y la aplicación de colchicina en la investigación citogenética.

Los estudios citogenéticos fiables disponibles en erizos de mar se limitan en su mayoría a proporcionar el número cromosómico de las especies analizadas. Actualmente sólo se ha elaborado el cariotipo de cuatro especies de erizo de mar: *Arbacia punctulata* (Auclair, 1965), *Pseudocentrotus depressus* (Yamanaka *et al.*, 1989), *Paracentrotus lividus* (Lipani *et al.*, 1996) y *Strongylocentrotus purpuratus* (Eno *et al.*, 2009). De dichas especies, únicamente *P. lividus* (Lipani *et al.*, 1996; Gornung *et al.*, 2005; Caradonna *et al.*, 2007) y *S. purpuratus* (Eno *et al.*, 2009) han sido sujeto de análisis citogenéticos más completos que incluyen, además de sus respectivos cariotipos, la localización cromosómica de genes. En el caso de *S. purpuratus*, al completarse la secuenciación de su genoma (*Sea Urchin Genome Sequencing Consortium*, 2006) no estaban disponibles mapas de ligamiento o citogenéticos, por lo que en los años siguientes se llevó a cabo el primer mapeo cromosómico de genes mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en esta especie como consecuencia de la necesidad de ensamblar mapas genéticos, localizándose la posición de los genes *bindin*, *foxa*, *foxb* y *brachyury* (Eno *et al.*, 2009).

En cuanto a los estudios citogenéticos en *P. lividus*, en un primer momento se determinó que su número cromosómico haploide era  $n = 9$  (Wilson, 1895; Delage, 1901), sin embargo, estos estudios no se consideran fiables por la metodología empleada en ellos. Con el objetivo de avalar su hipótesis de la estabilidad cromosómica en los equinodermos, Colomera y col. (1977) analizaron esta especie de nuevo y determinaron el número cromosómico haploide  $n = 21$  a partir del recuento de bivalentes de espermatocitos. Finalmente, Lipani y col. (1996) concluyeron que la dotación diploide en *P. lividus* es  $2n = 36$ , mediante el análisis de cromosomas mitóticos de embriones y gónadas masculinas, y que el número haploide es  $n = 18$ , a partir del recuento de bivalentes de diacinesis en espermatocitos, corrigiendo así las publicaciones previas. Las discrepancias en los estudios publicados hasta el momento hacen que sea necesario corroborar el número cromosómico de *P. lividus* y su cariotipo con las técnicas actuales para confirmar la última corrección.

Lipani y col. (1996) elaboraron el cariotipo de *P. lividus*, el cual está compuesto por un par de cromosomas submetacéntricos de mayor tamaño que el resto de cromosomas, un par de cromosomas heteromórficos sexo-específicos y 16 pares de cromosomas subteloicéntricos. Asimismo, localizaron regiones organizadoras nucleolares (NORs) en tres pares cromosómicos.

Los genes ribosomales se consideran útiles como marcadores cromosómicos, especialmente si el bandeo cromosómico no es posible. *Paracentrotus lividus* fue el primer equinodermo en el que se localizaron los genes rRNA 5S. En un primer estudio, se localizó un único *locus* rDNA 5S (Gornung *et al.*, 2005), no obstante, posteriormente se localizaron tres *loci* rDNA 5S en diferentes cromosomas, cada uno de ellos compuesto por unidades de repetición de distinta longitud (Caradonna *et al.*, 2007). Las variantes funcionales de los correspondientes rRNAs 5S fueron caracterizadas años después (Dimarco *et al.*, 2012).

En los eucariotas prevalece la herencia uniparental materna de los genes mitocondriales, aunque existen excepciones que incluyen ciertas familias de bivalvos, trematodos, abejas, aves y múridos (Sutovsky *et al.*, 2003). En *P. lividus* se determinó, mediante cortes histológicos y microscopía electrónica de transmisión, que las mitocondrias paternas son transmitidas al ooplasma tras la fertilización y que retienen su integridad estructural durante la embriogénesis temprana (Anderson, 1968). En la especie de erizo de mar *Lytechinus variegatus* se identificaron mitocondrias paternas en embriones hasta el estadio de cuatro células, gracias al marcaje de dichas mitocondrias con el

fluorocromo clorotetraciclina (CTC) (Hinkley y Newman, 1989). Así, en este grupo las mitocondrias paternas sufren procesos de degradación, lo que sugiere que tienen poca o nula influencia en el desarrollo.

A día de hoy se han realizado estudios de diversidad genética de poblaciones y filogeografía en *P. lividus* empleando distintos marcadores mitocondriales y nucleares (Duran *et al.*, 2004; Iuri *et al.*, 2007; Calderón *et al.*, 2008; Maltagliati *et al.*, 2010). Estos estudios proporcionan información acerca del estado de las poblaciones naturales con el objetivo de llevar a cabo explotaciones sostenibles. Precisamente, una de las características de los marcadores mitocondriales que los hacen apropiados para su utilización como marcadores moleculares es su herencia clonal materna (Galtier *et al.*, 2009).

## OBJETIVOS

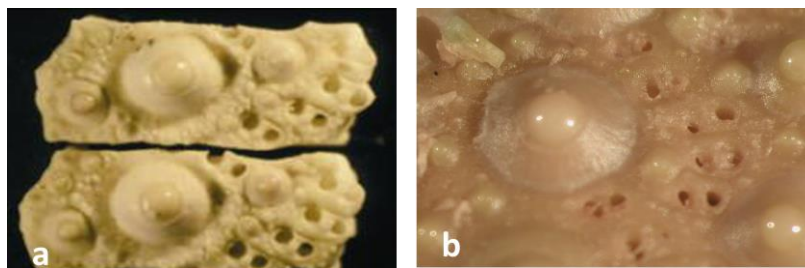
La finalidad de este trabajo es avanzar en la caracterización citogenética del erizo de mar *P. lividus*, aportando nuevos datos y revisando datos previos en los que se han observado discrepancias. Para ello se procede a:

- La obtención de preparaciones metafásicas a partir de tejido gonadal adulto y a partir de embriones en desarrollo obtenidos *in vitro* a fin de revisar el número cromosómico y, de ser posible, elaborar el cariotipo de la especie.
- La localización cromosómica de los genes ribosomales 18S-5.8S-28S y de las repeticiones de la secuencia telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH).
- El marcaje de las mitocondrias de los espermatozoides de *P. lividus* para conocer su destino tras la fecundación y durante la embriogénesis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de *P. lividus* empleados en este estudio fueron recolectados entre los meses de febrero y abril de 2015 en la zona intermareal de la Playa del Cirro, en la localidad de Veigue (43°37' N, 8°30' O, Sada, A Coruña), y en el mes de marzo de 2014 en una zona intermareal próxima a la Playa de Barrañán, situada entre Porto Sorrizo y Punta do Campelo (43°31' N, 8°56' O, Arteixo, A Coruña).

Una vez en el laboratorio, se procedió a la identificación taxonómica de los erizos de mar de acuerdo con la clave taxonómica y las descripciones gráficas de Míguez-Rodríguez (2009). La observación de las placas radiales de los caparazones de los ejemplares resultó de especial utilidad en dicha identificación (Figura 3). Cada placa radial presenta cinco pares de gemini dispuestos en arco, un tubérculo primario grande y uno o dos tubérculos secundarios (Míguez-Rodríguez, 2009).



**Figura 3.** Comparativa de placas radiales. (a) Placas radiales de *P. lividus*. Imagen tomada de Míguez-Rodríguez (2009). (b) Placas radiales de ejemplar muestreado.

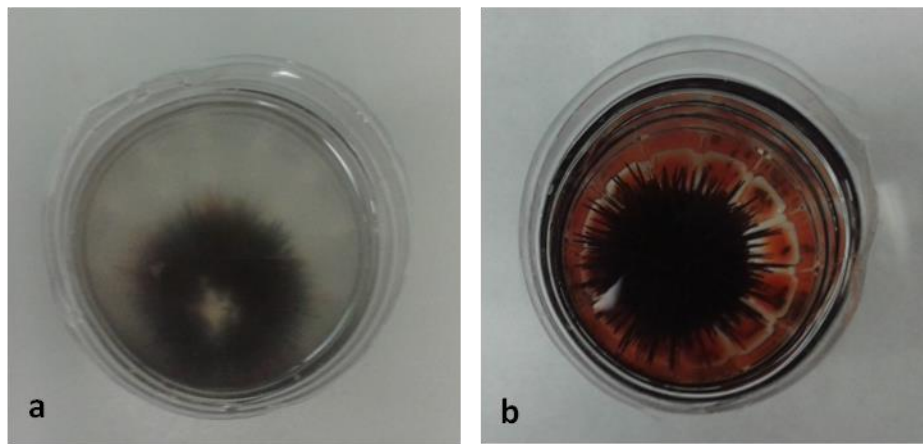
### Obtención de preparaciones metafásicas a partir de tejido adulto

Para la obtención de preparaciones metafásicas, se inyectó a cada ejemplar adulto de *P. lividus* 0.25 mL de una solución de colchicina al 0.01% a través de la membrana peristomial. La colchicina detiene la división celular en metafase al inhibir la formación del huso mitótico. Los erizos fueron mantenidos durante 5 horas en agua de mar con aireación en una cámara de incubación a 18°C con fotoperiodo. Una vez transcurrido el tiempo de incubación en colchicina, se procedió a la apertura de los caparazones de los erizos y a la extracción de sus gónadas. La determinación sexual de los individuos fue realizada mediante la observación microscópica de gametos extraídos de las gónadas, observando la presencia de óvulos o espermatozoides. Las gónadas fueron sometidas a un choque hipotónico con KCl 0.56% durante 8 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron una serie de lavados con *carnoy* (3 etanol: 1 ácido glacial acético) con el fin de fijar los tejidos: 3 lavados con *carnoy* a 4°C durante 10 minutos y 2 lavados con *carnoy* a 4°C durante 20 minutos. Las células del tejido gonadal fueron disociadas en agua acetilada al 45% y extendidas sobre portaobjetos precalentados a 42°C. Las metafases obtenidas fueron teñidas en cápsulas Coplin con Giemsa 4% en buffer fosfato pH 6.8 durante 30 minutos a temperatura y con 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, VECTASHIELD® Antifade Mounting Media with DAPI, Vector Laboratories).

### Obtención de preparaciones metafásicas a partir de embriones

#### ○ Inducción del desove de los gametos

Ejemplares adultos de *P. lividus* fueron introducidos individualmente en recipientes con agua de mar. Con el objetivo de inducir el desove de los gametos se inyectó 0.5 mL de KCl 0.5 M a través de la membrana peristomial a cada uno de los erizos (Auclair, 1965; Eno *et al.*, 2009; Vacquier, 2011). Los iones  $K^+$  despolarizan la membrana de las células musculares de la superficie externa de los ovarios y testículos, lo cual conduce a la liberación forzada de los espermatozoides y óvulos al agua de mar circundante a través de los cinco gonoporos presentes en la superficie aboral de los erizos (Vacquier, 2011). En el caso de los machos, al cabo de unos minutos el agua de mar en el que se encuentran adquiere una coloración blanquecina debido a la liberación de los espermatozoides (Figura 4a). En el caso de las hembras, el desove conduce a la aparición de un sedimento anaranjado el fondo del recipiente debido a la precipitación de los óvulos (Figura 4b).



**Figura 4.** (a) Desove de machos de *P. lividus*. (b) Desove de hembras de *P. lividus*.

#### ○ Fecundación *in vitro*

Para obtener embriones se realizaron fecundaciones *in vitro* en placas Petri, en las que se mezclaron espermatozoides y óvulos en proporción 500:1 aproximadamente. En *P. lividus*, al igual que en todos los equinodermos, tras la fecundación se forma una membrana de fertilización alrededor de los óvulos que impide la polispermia. Para obtener preparaciones cromosómicas de buena calidad, es importante que la membrana de fertilización sea eliminada (Saotome, 1982). El ácido para-amino-benzoico (PABA) facilita la eliminación posterior de la membrana de fertilización (Vacquier, 2011). Así, en algunas placas Petri la fecundación *in vitro* tuvo lugar en presencia de PABA 3 mM, de acuerdo con Lipani y col. (1996) y Eno y col. (2009). Las placas Petri se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente y se monitorizó el proceso de fecundación y el desarrollo de la segmentación mediante microscopía de contraste de fases tomando muestras de dichas placas.



○ **Obtención de preparaciones metafásicas**

Cuando en los cultivos se observó la presencia relativamente abundante de embriones próximos al estadio de blástula, se añadió colchicina al 0.01% durante 3 horas para detener las divisiones celulares. En algunas de las placas Petri en las que la fecundación *in vitro* había tenido lugar en ausencia de PABA, se añadió PABA 10 minutos o 20 minutos antes de que terminase el tiempo de incubación en colchicina.

Una vez transcurridas las 3 horas de incubación en colchicina, el contenido de las placas fue transferido a tubos Corning de 15 mL y centrifugado a 1200 rpm a 4°C durante 5 minutos. Los embriones fueron resuspendidos en agua de mar artificial sin calcio con el fin de disociar sus células mediante pipeteo prolongado (Saotome, 1982; Lipani *et al.*, 1996; Saotome, 1999). El agua de mar sin calcio se elaboró en el laboratorio de acuerdo con *Sea urchin embryology lab* ([www.celldynamics.org](http://www.celldynamics.org)). Los iones  $Ca^{+2}$  son necesarios para la adhesión de las células entre sí a través de las cadherinas. Tras una centrifugación a 1200 rpm a 4°C durante 5 minutos, las células fueron sometidas a un choque hipotónico con KCl 0.56%. Se realizaron diferentes tipos de choque hipotónico, combinándolos con las distintas condiciones de PABA, con el objetivo de determinar qué combinación proporcionaba metafases de mayor calidad para poder realizar estudios citogenéticos (Tabla 1). Los choques hipotónicos testados fueron: KCl durante 5 minutos, KCl durante 10 minutos y un choque largo compuesto por sucesivos choques de 7 minutos en los que se fue disminuyendo la proporción agua de mar: KCl (2:1, 1:1, 1:2, 0:1). En los tratamientos que incluyeron sucesivos choques hipotónicos, se realizaron entre ellos centrifugaciones a 1200 rpm a 4°C durante 5 minutos.

**Tabla 1.** Tratamientos aplicados durante la fecundación *in vitro* y a los embriones.

Tratamiento	Fecundación	Choque hipotónico
1	Ausencia de PABA	5 min KCl
2	Ausencia de PABA	10 min KCl
3	Ausencia de PABA	Choque largo*
4	PABA todo el tratamiento	5 min KCl
5	PABA todo el tratamiento	10 min KCl
6	PABA todo el tratamiento	Choque largo*
7	PABA 10 minutos	5 min KCl
8	PABA 10 minutos	10 min KCl
9	PABA 10 minutos	Choque largo*
10	PABA 20 minutos	5 min KCl
11	PABA 20 minutos	10 min KCl
12	PABA 20 minutos	Choque largo*

\*Choque largo: 7 min 2 agua de mar: 1 KCl, 7 min 1 agua de mar: 1 KCl, 7 min 1 agua de mar: 2 KCl, 7 min KCl.

Para fijar las células se realizaron tres lavados con *carroy* a 4°C durante 10 minutos, teniendo lugar entre ellos centrifugaciones a 1200 rpm a 4°C durante 5 minutos. Finalmente las células se extendieron sobre portaobjetos a temperatura ambiente, dejándolos secar al aire, y dichas extensiones fueron teñidas con DAPI.

### Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

En este trabajo se empleó la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para la localización cromosómica de los genes ribosomales mayores y de las repeticiones de la secuencia telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub>.

La localización de los genes ribosomales 18S-5.8S-28S fue realizada empleando la sonda de DNA pDm 238 de *Drosophila melanogaster* (Roiha *et al.*, 1981) marcada con fluoresceína con el kit *Prime-It Fluor Fluorescence Labeling Kit* (Agilent Technologies).

- Elaboración de la sonda. La sonda se encuentra disponible en el laboratorio insertada en el plásmido pBR 322 de *Escherichia coli*. La extracción del DNA plasmídico se realizó mediante el kit *NZYMiniprep* (NZTech). Para comprobar el éxito de la extracción de DNA se sometió una alícuota a una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Antes del marcaje de la sonda, el plásmido fue linealizado con la endonucleasa de restricción *EcoR V* (Roche) a 37°C durante 2 horas. Para confirmar la digestión se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% empleando el *DNA Molecular Weight Marker II* (Roche) y se cuantificó la concentración del DNA linealizado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% empleando el *DNA Molecular Weight Marker III* (Roche) y mediante el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific). Los geles de agarosa se visualizaron con luz UV en un transiluminador *SA-1000 Red™* (Alpha Innotech). Finalmente se marcó el producto de la digestión, en el que se incluye la sonda, siguiendo las especificaciones del kit indicado anteriormente. Dicho kit incorpora dUTPs ligados con fluoresceína mediante una exonucleasa empleando *random primers*.

La localización de las repeticiones teloméricas fue realizada empleando la sonda comercial *Star\*FISH® Pan Telomeric Chromosome Paint* (Cambio) marcada con fluoresceína.

En ambos casos, se siguió el protocolo descrito en González-Tizón y col. (2000) con modificaciones, algunas de ellas incluidas en Rojo y col. (2014). En primer lugar el DNA cromosómico fue desnaturalizado incubando las preparaciones metafásicas en RNAsa A (100µg/mL en 2x SSC) durante 30 minutos a 37°C en agitación. A continuación se realizaron dos lavados de 5 minutos en 2xSSC a temperatura ambiente en agitación y una serie de deshidrataciones en etanol al 70%, 90% y 100% de 5 minutos cada una a temperatura ambiente en agitación.

En el caso de la sonda pDm 238, 100 ng de sonda marcada (2.5 µL) fueron añadidos al *buffer* de hibridación (50% formamida en 2xSSC, 10% dextrano de sulfato, 0,33% SDS, 2xSSC) y se completó la mezcla con agua miliQ hasta los 30 µL para cada preparación. En el caso de la sonda *Star\*FISH® Pan Telomeric Chromosome Paint*, 15 µL de la sonda fueron añadidos a 25 µL de *buffer* de hibridación (37.5% formamida, 7.5% dextrano de sulfato, 0.25% SDS, 2xSSC).

En los dos casos, la mezcla de hibridación resultante fue desnaturalizada durante 15 minutos a 70°C, se incubó en hielo durante 5 minutos y se añadió 30 µL en el caso de la sonda ribosomal y 40 µL en el caso de la sonda telomérica a cada preparación. Se colocó un cubreobjetos sobre la preparación y se selló con pegamento para evitar la deshidratación. La desnaturalización cromosómica y posterior hibridación se realizó en un *slide-PCR* (MJ Research, MJ 100) con el siguiente programa: 75°C durante 7 minutos, 55°C durante 2 minutos, 50°C durante 30 segundos, 45°C durante 1 minuto, 42°C durante

2 minutos, 40°C durante 5 minutos, 38°C durante 5 minutos y 37°C durante 5 minutos. La hibridación se mantuvo en una cámara húmeda en oscuridad durante toda la noche a 37°C. Los lavados post-hibridación consistieron en un lavado en 2xSCC en oscuridad durante 5 minutos a 42°C en agitación, un lavado en 2x SCC en oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente en agitación y un lavado en TNT (0.1 M Tris, 0.15M NaCl pH 7.5 y 0.05% Tween-20) en oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente en agitación. Finalmente se realizaron una serie de deshidrataciones con etanol al 70%, 90% y 100% en oscuridad durante 5 minutos cada una a temperatura ambiente en agitación. Las preparaciones se dejaron secar al aire en oscuridad y se añadió a cada una 30 µL de DAPI.

### **Marcaje de las mitocondrias paternas**

Para la tinción de las mitocondrias de espermatozoides liberados tras la inducción del desove, se empleó el fluorocromo *MitoTracker® Green FM (Molecular Probes)*. Este compuesto carece de fluorescencia cuando se encuentra en solución acuosa, sin embargo, comienza a emitir fluorescencia cuando es retenido en el medio lipídico de las mitocondrias, cuando un grupo clorometil de la molécula de *MitoTracker* se une covalentemente a los grupos tiol de la membrana mitocondrial (Mariñas-Pardo, 2005). Para el marcaje de las mitocondrias espermáticas, se incubaron 5 mL de espermatozoides de *P. lividus* con 200 µL de *MitoTracker* durante 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Asimismo, se empleó un control negativo consistente en 5 mL de espermatozoides sin fluorocromo. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó una muestra a fin de confirmar mediante microscopía de fluorescencia que las mitocondrias de los espermatozoides habían sido teñidas.

A continuación, se realizó una fecundación *in vitro* en una placa Petri mezclando los 5 mL de espermatozoides marcados con óvulos no marcados en proporción 500:1 aproximadamente. Dicha placa se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente y fueron extraídas regularmente alícuotas con óvulos fecundados y embriones para su observación mediante microscopía de fluorescencia.

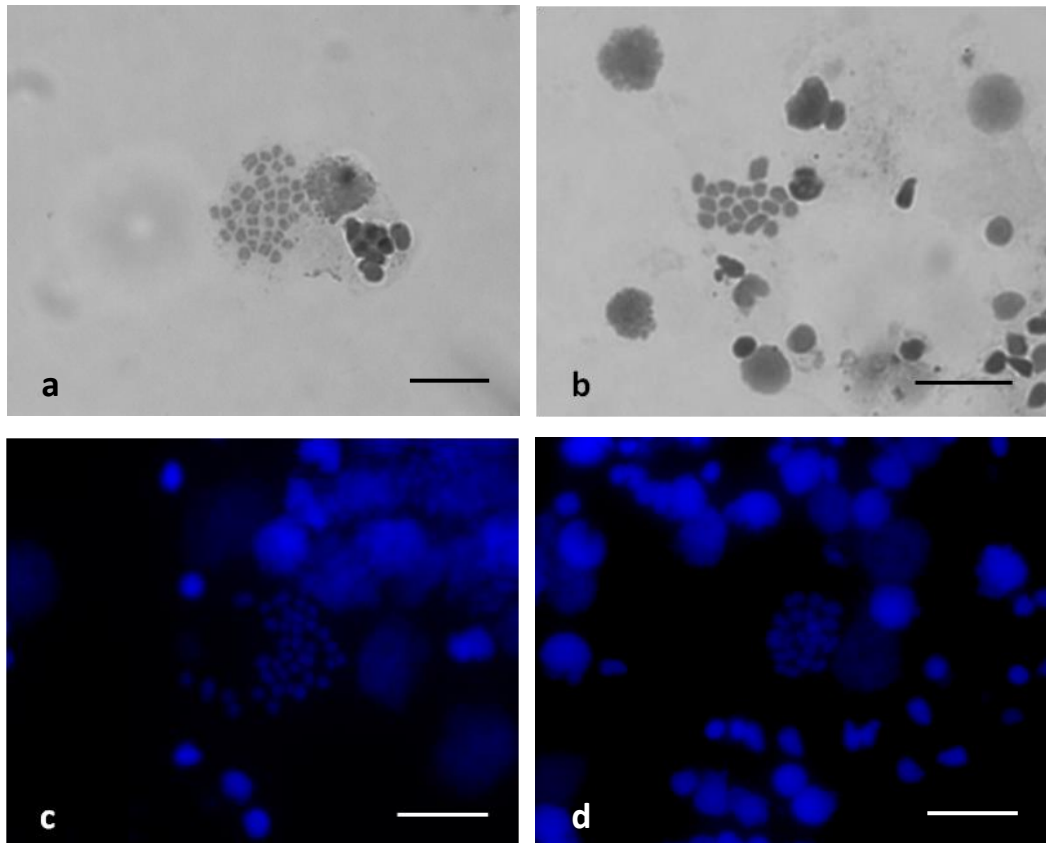
### **Fotografiado**

Las imágenes se obtuvieron empleando un microscopio de epifluorescencia *Nikon Microphot-FXA* equipado con una cámara digital *Nikon DS-Qi1 Mc* y fueron procesadas mediante el software *NIS-Elements D 3.10*.

## RESULTADOS

### Obtención de preparaciones metafásicas a partir de tejido adulto

Se obtuvieron preparaciones metafásicas a partir de tejido gonadal de los dieciocho ejemplares de *P. lividus* empleados para este fin, si bien la abundancia de las metafases es muy variable entre los distintos individuos. La tinción de las extensiones metafásicas con Giemsa 4% y DAPI reveló que el número cromosómico de la especie es  $2n = 36$  (Figura 5a, c). Asimismo, se observaron bivalentes meióticas, cromosomas homólogos apareados, que permitieron confirmar que el número haploide de la especie es  $n = 18$  (Figura 5b, d).

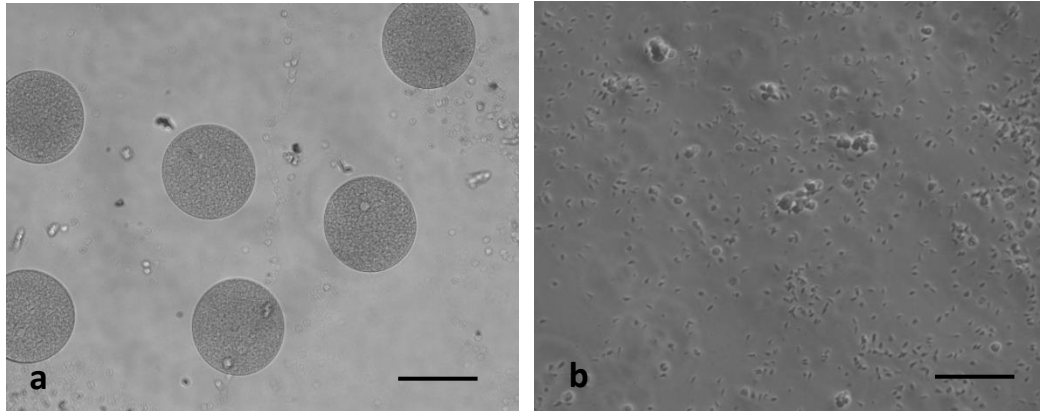


**Figura 5.** (a) Metafase teñida con Giemsa. (b) Bivalentes meióticas teñidas con Giemsa. (c) Metafase teñida con DAPI. (d) Bivalentes meióticas teñidas con DAPI. Barra = 10 µm.

Debido al elevado grado de condensación y la ausencia de un bandeo cromosómico identificable, no fue posible elaborar el cariotipo de *P. lividus* o determinar el par cromosómico sexual a partir de ninguna de las extensiones analizadas.

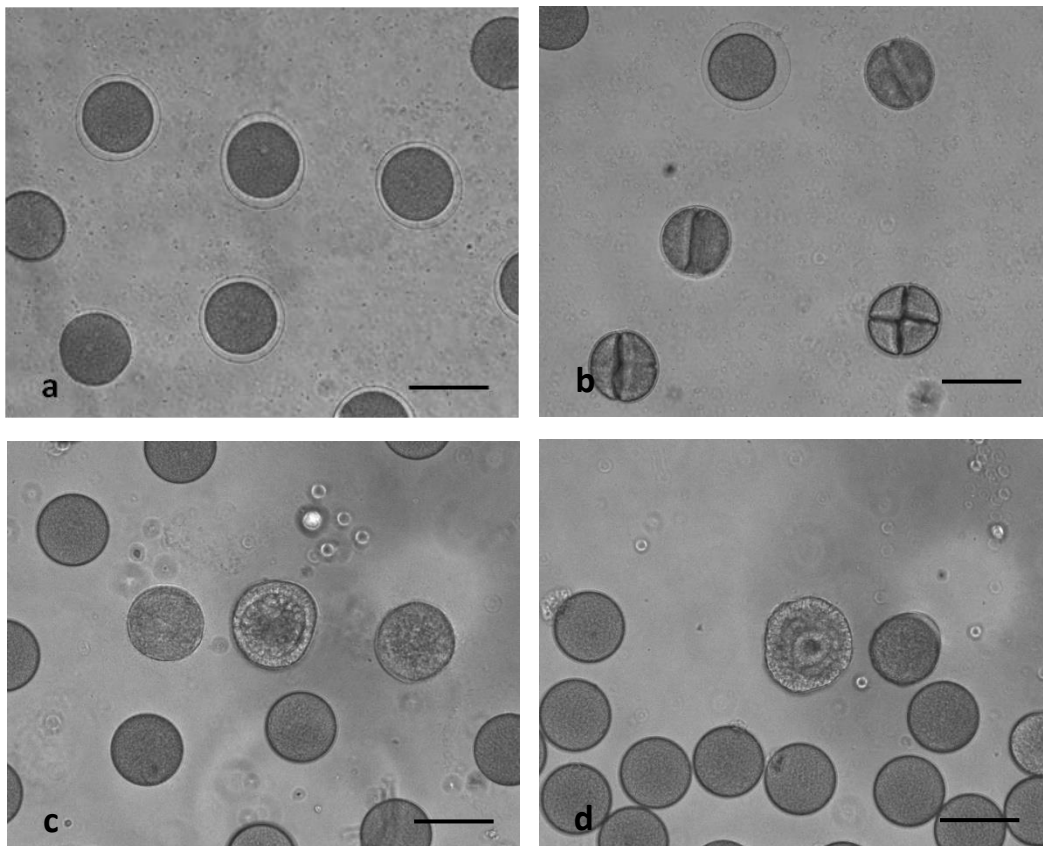
### Obtención de preparaciones metafásicas a partir de embriones.

Tras el desove, se tomaron muestras de los gametos liberados al agua de mar de los recipientes y, mediante microscopía de contraste de fases, se observaron óvulos y espermatozoides en movimiento (Figura 6a, b).



**Figura 6.** (a) Óvulos liberados tras la inducción del desove. (b) Espermatozoides liberados tras la inducción del desove. Barra = 10  $\mu$ m.

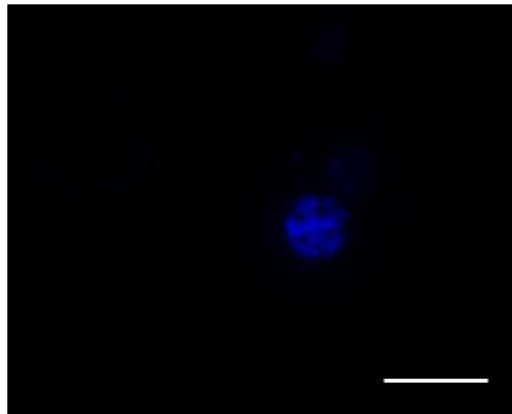
A continuación se realizaron fecundaciones *in vitro* en placas Petri en ausencia y en presencia de PABA. En las placas en las que la fecundación tuvo lugar en ausencia de PABA, se tomaron muestras y se observó mediante microscopía la presencia de óvulos fecundados, es decir, óvulos con membrana de fertilización (Figura 7a). Se dejó avanzar la embriogénesis y se monitorizó mediante microscopía el desarrollo de la misma tomando muestras de las placas, observándose así embriones en distintos estadios de desarrollo (Figura 7b, c, d).



**Figura 7.** (a) Óvulos fecundados con membrana de fertilización. (b) Óvulo fecundado y embriones en estadio de dos células y de cuatro células. (c) Blástula. (d) Gástrula. Barra = 10  $\mu$ m.

Por su parte, en las placas en las que la fecundación tuvo lugar en presencia de PABA, se tomaron muestras y se observó mediante microscopía una elevada abundancia de embriones polispérmicos, es decir, embriones en los que las divisiones celulares se producían siguiendo un patrón irregular que no se corresponde con el patrón radial de la segmentación de los equinodermos. A raíz de esta observación, se añadió PABA a algunas de las placas en las que la fecundación *in vitro* había tenido lugar en ausencia de PABA 10 o 20 minutos antes del final de la incubación de los embriones en colchicina, con el objetivo de testar su efecto en estadios más avanzados de la embriogénesis de cara a la obtención de preparaciones metafásicas.

Cuando en las placas se observó una abundancia relativa de embriones próximos al estadio de blástula, se añadió colchicina y se realizaron los distintos tratamientos anteriormente descritos con el fin de obtener preparaciones metafásicas (Tabla 1). A partir de las distintas combinaciones de tratamientos testados, se obtuvieron extensiones metafásicas muy similares entre sí. Entre dichas extensiones, aquellas que mostraron mayor calidad se obtuvieron a partir del tratamiento 9 (Tabla 1). Sin embargo, la calidad de estas extensiones era inferior a la de las extensiones obtenidas a partir de tejido adulto, ya que en ninguna metafase podían distinguirse los 36 cromosomas de la especie (Figura 8).

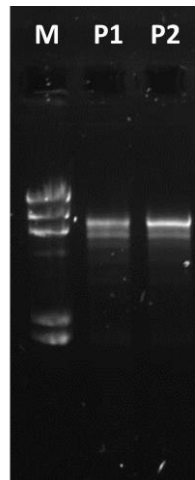


**Figura 8.** Metafase teñida con DAPI.  
Barra = 10  $\mu$ m.

### Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

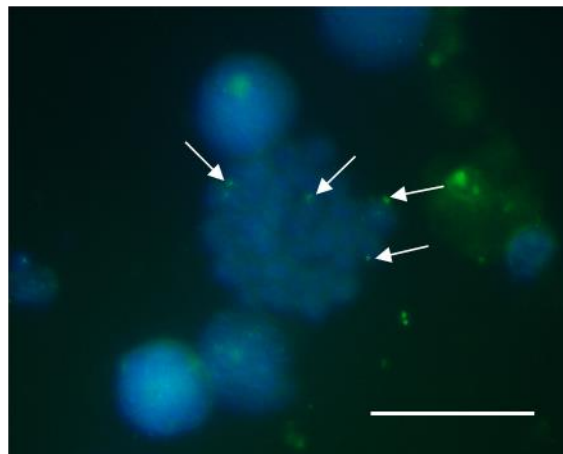
- **Localización de los genes ribosomales 18S-5.8S-28S**

Tras la extracción del DNA plasmídico y verificación de dicha extracción mediante electroforesis, se linealizó el plásmido con la sonda insertada y se confirmó su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tamaño del plásmido con el inserto es de 16.363 kb, sin embargo, la digestión del plásmido generó dos fragmentos de DNA con un tamaño entre 9.416 kb y 6.557 kb, de acuerdo con el marcador molecular empleado, *DNA Molecular Weight Marker II (Roche)* (Figura 9).



**Figura 9.** Gel de agarosa al 1% en el que se visualiza el marcador molecular (M) y el ADN plasmídico con la sonda digerido (P1 y P2).

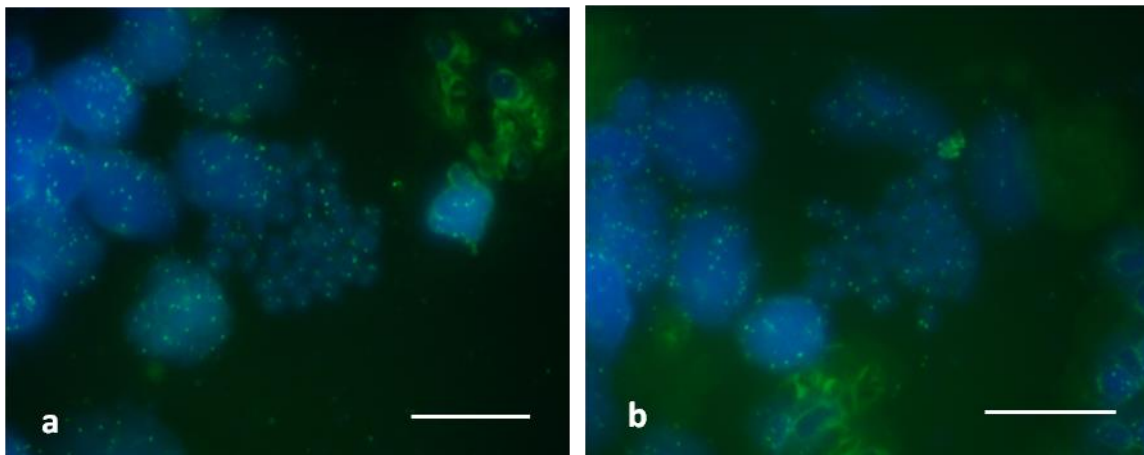
La hibridación con la sonda marcada reveló la existencia de cuatro señales de hibridación en cada metafase, lo cual permitió determinar la existencia de dos *loci* rDNA 18S-5.8S-28S situados en dos pares cromosómicos diferentes (Figura 10).



**Figura 10.** Metafase y núcleos tras FISH con la sonda rDNA 18S-5.8S-28S marcada con fluoresceína. Se observan señales en cuatro cromosomas (flechas). Barra = 10  $\mu$ m.

#### ○ Localización de las repeticiones teloméricas

La hibridación con la sonda *Star\*FISH® Pan Telomeric Chromosome Paint* permitió determinar la presencia de repeticiones de la secuencia telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> en todos los cromosomas de *P. lividus* (Figura 11). Las señales de hibridación se sitúan en los extremos de los cromosomas, sin embargo, debido al pequeño tamaño de los mismos, aunque parece que no existen repeticiones teloméricas intersticiales (ITSs), no puede descartarse por completo su presencia.



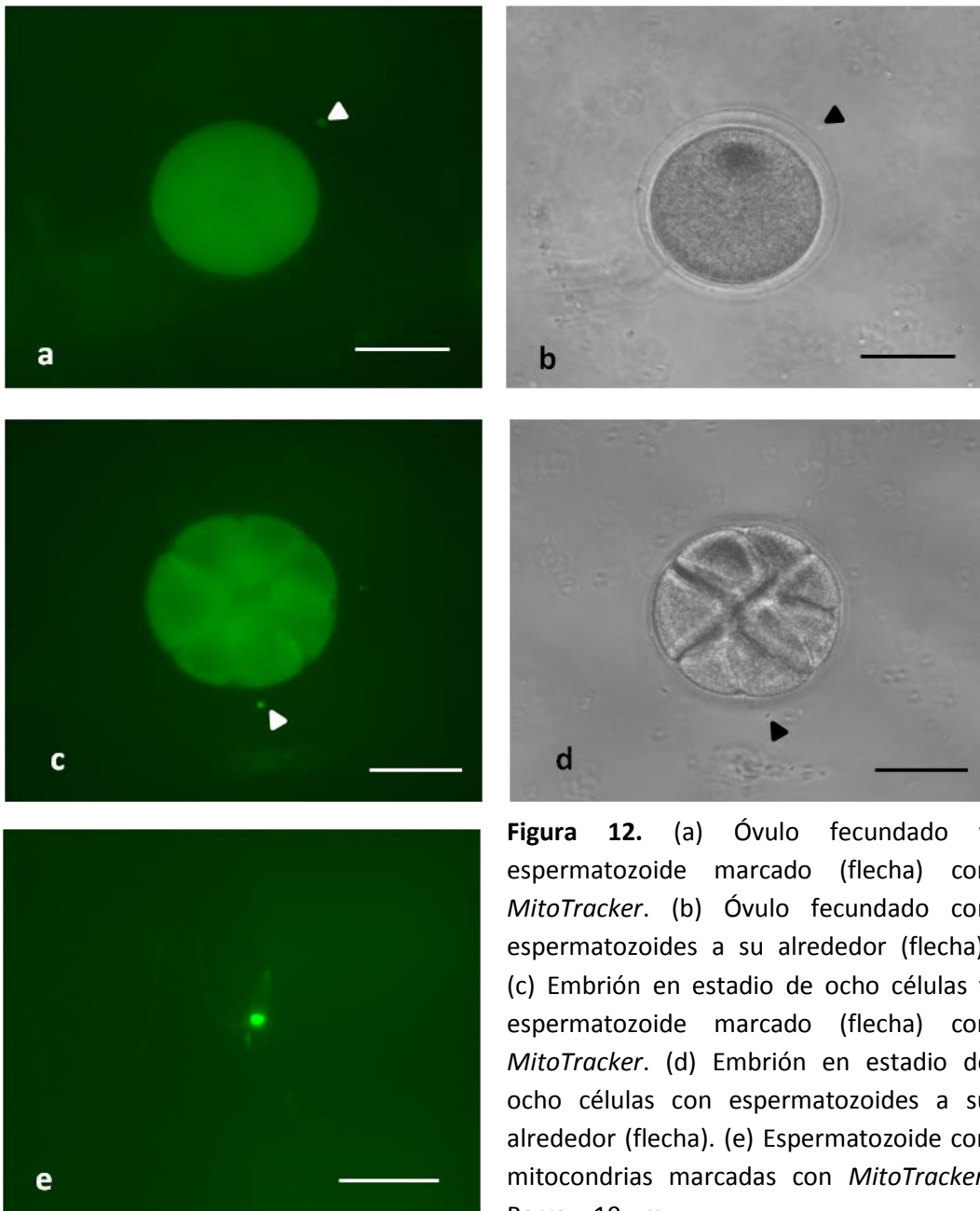
**Figura 11.** (a, b) Metafase y núcleos tras FISH con la sonda telomérica marcada con fluoresceína. Las repeticiones se localizan en los extremos de los cromosomas. Barra = 10  $\mu$ m.

#### Marcaje de las mitocondrias paternas

La observación de los espermatozoides incubados con *MitoTracker* en las condiciones anteriormente descritas, confirmó que dichos espermatozoides emitían fluorescencia verde, es decir, las mitocondrias de los espermatozoides habían sido correctamente marcadas con el fluorocromo (Figura 12e). No obstante, a pesar de que los espermatozoides en movimiento emitían fluorescencia, es necesario señalar que dicha fluorescencia tendía a perderse rápidamente. En el control negativo, espermatozoides incubados en las mismas condiciones en ausencia de *MitoTracker*, no se observó ninguna estructura fluorescente, confirmándose así la efectividad del fluorocromo.

Tras la fecundación *in vitro* realizada con óvulos no marcados y espermatozoides marcados con *MitoTracker*, se tomaron alícuotas a intervalos de 10 minutos para su observación mediante microscopía de fluorescencia. Ninguno de los óvulos fecundados analizados presentaba en su interior ninguna estructura fluorescente, sin embargo, alrededor de dichos óvulos sí podía distinguirse alguna célula emisora de fluorescencia (Figura 12a). La observación de los mismos óvulos fecundados mediante microscopía de contraste de fases permitió confirmar que las células fluorescentes presentes en las proximidades de la membrana de fertilización eran espermatozoides (Figura 12b). Se dejó avanzar la segmentación y se extrajeron alícuotas con el fin de observar embriones tempranos. En ninguno de los embriones analizados se observó ninguna señal fluorescente en el citoplasma de ningún blastómero, sin embargo, al igual que en el caso de los óvulos fecundados, alrededor de los embriones también podían distinguirse algunas células fluorescentes (Figura 12c). Mediante microscopía de contraste de fases se confirmó que dichas células se correspondían con espermatozoides (Figura 12d).





**Figura 12.** (a) Óvulo fecundado y espermatozoide marcado (flecha) con *MitoTracker*. (b) Óvulo fecundado con espermatozoides a su alrededor (flecha). (c) Embrión en estadio de ocho células y espermatozoide marcado (flecha) con *MitoTracker*. (d) Embrión en estadio de ocho células con espermatozoides a su alrededor (flecha). (e) Espermatozoide con mitocondrias marcadas con *MitoTracker*. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSIÓN

### Obtención de preparaciones metafásicas a partir de tejido adulto

El análisis microscópico de las metafases obtenidas permitió determinar que el número cromosómico en *P. lividus* es  $2n = 36$ . Asimismo, la observación de bivalentes meióticas permitió confirmar el número cromosómico diploide al corroborarse que el número haploide es  $n = 18$ . Los primeros datos citogenéticos de *P. lividus* establecieron que el número haploide era  $n = 9$  (Wilson, 1895; Delage 1901), posteriormente se propuso que el número haploide era  $n = 21$  (Colombera *et al.*, 1977) y en el último trabajo publicado al respecto se determinó que el número diploide era  $2n = 36$  y el número haploide  $n = 18$  (Lipani *et al.*, 1996). Esta disparidad de resultados puede deberse a la diferente metodología aplicada en los tres estudios. Los resultados del presente trabajo permiten verificar la corrección de Lipani y col. (1996), confirmándose así el número cromosómico de la especie.

Los estudios existentes de cariotipado y mapeo cromosómico en diferentes especies de erizo de mar fueron realizados exclusivamente a partir de embriones (Auclair, 1965; Yamanaka *et al.*, 1989; Lipani *et al.*, 1996; Gornung *et al.*, 2005; Caradonna *et al.*, 2007; Eno *et al.*, 2009), sin embargo, nunca se habían obtenido metafases a partir de tejido adulto de calidad suficiente para estos fines. En el presente estudio se obtuvo un elevado número de metafases a partir del tejido gonadal de algunos de los ejemplares de *P. lividus*. A pesar de que se pudo determinar el número cromosómico de la especie, la calidad de las metafases obtenidas no permitió elaborar su cariotipo debido al elevado grado de condensación y a la ausencia de bandeo identificable en los cromosomas. Así, el próximo paso del trabajo sería poner a punto un protocolo que permita obtener preparaciones metafásicas de mayor calidad a partir de tejido adulto de erizo de mar ajustando la dosis y el tiempo de exposición a colchicina así como el tiempo de exposición a KCl en el choque hipotónico.

Con el propósito de intentar resolver discrepancias en números cromosómicos publicados anteriormente, Colombera (1974), Colombera y col. (1976, 1977), Colombera y Vernier (1980) y Colombera y Tagliaferri (1986) revisaron y re-analizaron la dotación cromosómica de muchos de los equinodermos previamente estudiados. En todas las especies examinadas, pertenecientes a las cinco clases de equinodermos existentes, concluyeron que el número cromosómico diploide estaba restringido a 42 o 44 cromosomas. Así, estos autores propusieron la hipótesis de la estabilidad cromosómica numérica dentro del filo Echinodermata, sugiriendo que el número cromosómico ha permanecido estable en este grupo durante un periodo de aproximadamente 500 millones de años desde la divergencia de las clases (Colombera, 1974; Duffy *et al.*, 2007). No obstante, existen notables excepciones, la dotación  $2n = 46$  observada en varias especies japonesas de erizo de mar (Saotome, 1982, 1987, 1991) o la dotación  $2n = 36$  determinada por Lipani y col. (1996) y confirmada en este estudio en el erizo *P. lividus*. Con todo, la mayoría de los equinodermos poseen números cromosómicos diploides entre 36 y 46. Considerando el tamaño del filo y la diversidad morfológica de las clases, esta aparente conservación del número cromosómico resulta sorprendente y contrasta con otros grupos animales, donde la variación en el número cromosómico es muy superior. Los mecanismos responsables de mantener dicha estabilidad y las potenciales ventajas evolutivas de un número cromosómico conservado son cuestiones sin resolver a día de hoy (Duffy *et al.*, 2007).

En este sentido hay que señalar que en los estudios mencionados anteriormente se determinaron los números cromosómicos mediante la observación microscópica de bivalentes meióticas de espermatoцитos a través de una cámara clara o tubo de dibujo y, por lo tanto, en dichos estudios no

se aportan fotografías sino dibujos realizados a partir de las observaciones. Esta metodología puede llevar a determinar números cromosómicos de forma incorrecta, como ha sido el caso de *P. lividus*. Así, la disponibilidad de más datos citogenéticos con la metodología actual, podría cambiar la presente visión sobre la evolución cromosómica de los equinodermos.

### **Obtención de preparaciones metafásicas a partir de embriones**

El punto crítico en la obtención de metafases a partir de embriones de *P. lividus* es la eliminación de la membrana de fertilización, para lo cual se utilizó el ácido para-amino-benzoico (PABA). La membrana de fertilización es “endurecida” estructuralmente mediante dos enzimas procedentes de los gránulos corticales, una transglutaminasa y una peroxidasa (ovoperoxidasa), convirtiéndola en una estructura rígida. El PABA bloquea la acción de la enzima ovoperoxidasa, lo cual evita el endurecimiento de la membrana de fertilización, facilitando su eliminación posterior y a su vez favoreciendo la polispermia (Vacquier, 2011). Esto explica que en las placas en las que la fertilización *in vitro* tuvo lugar en presencia de PABA se observara una elevada polispermia y escasos embriones monospermicos. Los embriones polispermicos no progresaron, obteniéndose así bajos índices mitóticos.

Debido a que la calidad de todas las metafases obtenidas a partir de los embriones sometidos a los diferentes tratamientos era inferior a las extensiones procedentes de tejido adulto, se concluye que es necesario ajustar un protocolo óptimo para la obtención de metafases a partir de embriones de *P. lividus* y, por extensión, de erizo de mar. Siguiendo este objetivo y, tomando como referencia que las mejores extensiones fueron obtenidas a partir del tratamiento 9 (Tabla 1), el siguiente paso de este trabajo sería probar mayores proporciones de óvulos respecto a espermatozoides en la fecundación *in vitro* junto a menores concentraciones de PABA, a fin de reducir la polispermia a la vez que facilitar la eliminación de la membrana de fertilización. A su vez es necesario testar distintas exposiciones de los blastómeros disociados a agua de mar y KCl en el choque hipotónico.

La obtención de preparaciones metafásicas a partir de embriones es un método menos invasivo que su obtención a partir de individuos adultos, ya que tras el desove los ejemplares adultos pueden devolverse a su hábitat, lo cual es muy interesante en el caso de especies amenazadas. La inducción del desove y la obtención *in vitro* de un gran número de embriones en *P. lividus* son técnicas de fácil reproducción en el laboratorio y relativamente rápidas. Optimizar un protocolo que permita obtener metafases de calidad a partir de embriones de erizo de mar ampliaría las posibilidades de utilizar esta especie como modelo en estudios citogenéticos, además de en estudios de biología del desarrollo, y a su vez abriría las puertas de su explotación pesquera. Los estudios citogenéticos y cariotípicos en *P. lividus* proporcionarían información útil para la identificación de marcadores cromosómicos, aplicables a estudios poblacionales, de trazabilidad y al ensamblaje de mapas de ligamiento destinados a la determinación de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) de interés en los programas de mejora genética.

### Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

#### ○ Localización de los genes 18S-5.8S-28S

La hibridación realizada en este estudio con la sonda de pDm 238 de *Drosophila melanogaster* (Roïha *et al.*, 1981) revela la presencia de señales de hibridación localizadas en cuatro cromosomas distintos en las metafases de *P. lividus*, concluyéndose que existen dos *loci* rDNA 18S-5.8S-28S situados en dos pares cromosómicos diferentes. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente por Vitturi y col. (1998), presentes en las actas del congreso *Fifth European Conference on Echinoderms*. En dichas actas se indica la existencia de señales de hibridación mediante FISH en dos pares cromosómicos, no obstante, no se aportaron fotografías que permitan comparar la posición cromosómica de las señales observadas en el presente trabajo y estos resultados no fueron publicados formalmente por sus autores con posterioridad.

El DNA ribosomal (rDNA) 18S-5.8S-28S se corresponde con la totalidad de las regiones organizadoras nucleolares (NORs). La tinción con nitrato de plata permite localizar los NORs transcripcionalmente activos en la interfase precedente, denominados Ag-NORs. En *P. lividus* se han descrito tres pares de Ag-NORs localizados en tres cromosomas diferentes: 5, 8 y 12 (Lipani *et al.*, 1996). Actualmente, se considera que el método más apropiado para la detección de repeticiones de rDNA es la FISH, ya que permite la localización física de los genes ribosomales independientemente de su actividad transcripcional (Martínez *et al.*, 2002). Según esto, los dos *loci* rDNA 18S-5.8S-28S determinados mediante FISH en Vitturi y col. (1998) y en este trabajo no concuerdan con los tres *loci* Ag-NORs descritos por Lipani y col. (1996). Para explicar esta discrepancia se proponen tres hipótesis no excluyentes entre sí.

En primer lugar sería necesario repetir la tinción con nitrato de plata para localizar los Ag-NORs, con el objetivo de comprobar si con dicha técnica existe este tipo de discrepancia entre el número de Ag-NORs y señales de FISH, lo cual nunca se ha documentado hasta el momento. Además, sería necesario confirmar si realmente aparecen seis señales en individuos procedentes de las localidades mediterráneas muestreadas, tal y como afirmaron Lipani y col. (1996), los cuales no aportaron fotografías en las que se observen los tres pares de Ag-NORs en una misma metafase competa. En este sentido, tampoco se aportaron datos del número de Ag-NORs observado en todas las metafases analizadas, los cuales mostrarían si se ha encontrado algún tipo de variabilidad numérica entre las metafases o células analizadas.

En segundo lugar, puede existir un tercer *locus* de rDNA 18S-5.8S-28S que no se observe mediante FISH debido a que su señal sea muy débil. Es posible que exista variabilidad en cuanto a la intensidad de las señales de los distintos *loci* rDNA 18S-5.8S-28S al realizar una FISH, lo cual se atribuye a que el número de copias de rDNA varía entre ellos. El rDNA se encuentra presente en múltiples copias dispuestas en tándem separadas entre sí por espaciadores, de modo que cada unidad de transcripción representa una unidad de repetición. Por lo tanto, aquellos *loci* que presentan un menor número de repeticiones de la unidad de transcripción aparecen marcados más débilmente en la FISH. Para tratar de confirmar esta hipótesis es necesario repetir la hibridación sobre cromosomas menos condensados o realizar lavados post-hibridación menos astringentes que los realizados en el presente trabajo.

En tercer y último lugar, es factible que exista polimorfismo entre las poblaciones de *P. lividus* respecto al número de *loci* rDNA 18S-5.8S-28S, lo cual no sería inusual considerando que en eucariotas el número de *loci* cromosómicos de rDNA y el número de genes en cada *locus* varía entre especies, entre poblaciones y entre individuos (González-Tizón *et al.*, 2000). Los erizos muestreados en este trabajo son atlánticos, mientras que los utilizados por Lipani y col. (1996) proceden del Golfo de Palermo, en el mar Mediterráneo, y en Viturri y col. (1998) no se especifica el origen de las muestras. Dada la distinta procedencia de las muestras, es posible que exista diferenciación genética entre las poblaciones atlánticas y mediterráneas de *P. lividus* en cuanto al número de *loci* rDNA 18S-5.8S-28S como resultado de la existencia de barreras hidrográficas entre ellas que impiden el flujo génico, como el estrecho de Gibraltar o el frente Almería-Orán (Pannacciulli *et al.*, 1997; García-Merchán *et al.*, 2012). La diferenciación genética entre dichas cuencas se ha documentado entre especies de camarón, mejillón, lapas, cangrejos o peces (Pannacciulli *et al.*, 1997; García-Merchán *et al.*, 2012.). En este sentido, la existencia de una ligera diferenciación genética en *P. lividus* entre estas poblaciones determinada mediante marcadores nucleares (ANT) y mitocondriales (COI y rRNA 16S) (Calderón *et al.*, 2008), podría ser un indicativo de este hecho. Para confirmar la diferenciación respecto al número de *loci* rDNA 18S-5.8S-28S sería necesario realizar de nuevo la FISH analizando un mayor número de metafases de individuos procedentes de ambas poblaciones.

La localización de los *loci* rDNA mayores, al igual que la localización de los *loci* rDNA 5S, puede considerarse útil para su aplicación como marcadores cromosómicos en especies marinas de interés económico, como es el caso del erizo de mar *P. lividus*.

#### ○ Localización de las repeticiones teloméricas

Las secuencias de DNA telomérico son cortas repeticiones organizadas en tándem y la secuencia (TTAGGG)<sub>n</sub> constituye la repetición telomérica de todos los vertebrados analizados. La presencia de dicha secuencia en los telómeros de algunos invertebrados ha llevado a considerar que la secuencia (TTAGGG)<sub>n</sub> está conservada en eucariotas, si bien el número de repeticiones es muy variable (Lejnine *et al.*, 1995; Plohl *et al.*, 2002). No obstante, se han observado secuencias teloméricas distintas en ciertos grupos de invertebrados marinos, como los camarones (Alcivar-Warren *et al.*, 2006). En equinodermos, se ha detectado la presencia de la secuencia telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> en la holoturia *Holothuria tubulosa* (Plohl *et al.*, 2002) y en el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Lejnine *et al.*, 1995) mediante *Southern Blot*.

El presente trabajo constituye el primer estudio de determinación de la presencia de la secuencia telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> y de localización de sus repeticiones en los telómeros de los cromosomas en el erizo de mar *P. lividus* mediante FISH y, por extensión, en equinodermos. Se concluye la existencia de la secuencia telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> en el genoma de esta especie. Esta observación proporciona nueva información que avala la hipótesis de que la secuencia telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> está muy conservada en eucariotas, lo cual sugiere origen y funciones comunes de dicha secuencia. Asimismo, a pesar de que no parecen existir secuencias teloméricas intersticiales (ITSs), el pequeño tamaño y la calidad de los cromosomas metafásicos obtenidos no permiten descartar su presencia. Las ITSs son repeticiones de la secuencia telomérica presentes en sitios intracromosómicos y pueden utilizarse como marcadores cromosómicos (Lin y Yan, 2008). Se considera que las ITSs son el resultado de reorganizaciones cromosómicas ocurridas durante la evolución del cariotipo (Rojo *et al.*, 2014). Con

el objetivo de confirmar la ausencia de ITSs en el cariotipo de *P. lividus*, el siguiente paso de este trabajo sería repetir la FISH sobre metafases de mayor calidad y, en el caso de sí localizarse ITSs, realizar la FISH en otras especies de erizo de mar a fin de proporcionar nuevos datos acerca de la evolución cromosómica del grupo.

### **Herencia de las mitocondrias paternas**

En los eucariotas, salvo excepciones, prevalece la herencia uniparental materna de los genes mitocondriales (Sutovsky *et al.*, 2003). El DNA mitocondrial (mtDNA) paterno no es transmitido al ooplasma o bien es eliminado durante o después de la fertilización (Galtier *et al.*, 2009). En el presente trabajo se empleó el fluorocromo *MitoTracker* para el marcaje de las mitocondrias de los espermatozoides de *P. lividus* con el objetivo de confirmar la herencia exclusiva de las mitocondrias maternas durante el desarrollo. Este fluorocromo ha sido aplicado anteriormente a óvulos y embriones de *P. lividus* con el fin de determinar la distribución y la actividad de las mitocondrias maternas durante el desarrollo embrionario (Morici *et al.*, 2007; Agnello *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos muestran que el fluorocromo *MitoTracker* permite marcar de manera efectiva las mitocondrias de los espermatozoides. El análisis de los óvulos fecundados y de los embriones obtenidos mediante fecundación *in vitro* con óvulos no marcados y con espermatozoides sí marcados permitió concluir que las mitocondrias paternas no son transmitidas al ooplasma durante la fecundación y, por lo tanto, tampoco aparecen en el citoplasma de ningún blastómero en los embriones.

En publicaciones anteriores, en el erizo *P. lividus* se observó mediante cortes histológicos y microscopía electrónica de transmisión que las mitocondrias paternas sí son transmitidas al ooplasma en la fecundación y que retienen su integridad durante la embriogénesis temprana, sufriendo procesos posteriores de degradación (Anderson, 1968). En la especie de erizo *Lytechinus variegatus*, se empleó el fluorocromo clorotetraciclina (CTC) para estudiar la herencia de las mitocondrias paternas. Así, se determinó que las mitocondrias paternas se mantenían en los embriones hasta el estadio de cuatro células (Hinkley y Newman, 1989).

Los resultados obtenidos en este trabajo se contraponen con los estudios previos realizados en *P. lividus* y en *L. variegatus*, dónde se sostiene que las mitocondrias paternas sí están presentes en los embriones durante las primeras divisiones de la segmentación. La discrepancia entre resultados puede deberse a que en el experimento realizado, los espermatozoides marcados tendían a perder la fluorescencia rápidamente, probablemente como consecuencia de habían transcurrido años desde la adquisición del *MitoTracker*. Sin embargo, a pesar de la rápida pérdida de fluorescencia, en ninguno de los óvulos fecundados o embriones analizados se observó fluorescencia en su interior, mientras que sí se observaron espermatozoides fluorescentes a su alrededor, lo cual sugiere que no se han producido falsos negativos. El siguiente paso para poder confirmar los resultados obtenidos y corregir las observaciones previas es realizar de nuevo este experimento con *MitoTracker* adquirido recientemente y analizar un mayor número de óvulos fecundados y de embriones. En cualquier caso, los resultados obtenidos en este trabajo verifican que en *P. lividus* las mitocondrias se heredan únicamente por vía materna y, por lo tanto, la herencia de los genes mitocondriales es uniparental materna.

## CONCLUSIONES

- Se obtuvieron metafases a partir de tejido gonadal adulto y de embriones de *P. lividus*, en las que se pudo confirmar que el número cromosómico diploide es  $2n = 36$ . Este trabajo constituye una herramienta útil para la optimización de protocolos que permitan obtener metafases de buena calidad de erizo de mar a partir de ambos tipos de tejido.
- Se determinó la existencia de dos *loci* rDNA 18S-5.8S-28S y por primera vez la presencia de repeticiones de la secuencia telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> en los telómeros de todos los cromosomas mediante FISH.
- Confirmación de la herencia uniparental materna de las mitocondrias en esta especie y, por lo tanto, del DNA mitocondrial.

## CONCLUSIONS

- Metaphases were obtained from both gonadal adult tissue and embryos of *Paracentrotus lividus*, in which we could confirm that diploid chromosome number is  $2n = 36$ . This work set up an useful tool for optimizing protocols in order to get sea urchin's high quality metaphases from both tissues types.
- The existance of two rDNA 18S-5'8S-28S loci was established and, for the first time, it was determined by FISH the presence of telomeric sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> repeats in each chromosome telomeres.
- Maternal uniparental inheritance of mitochondria was confirmed in this species and, therefore, it is maternal uniparental inheritance of mitochondrial DNA.

## REFERENCIAS

- Agnello, M., Morici, G. & Rinaldi, A. M. (2008). A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology*, **56**: 145-149.
- Alcivar-Warren, A., Meehan-Meola, D., Wang, Y., Guo, X., Zhou, L., Xiang, J., Moss, S., Arce, S., Warren, W., Xu, Z. & Bell, K. (2006). Isolation and mapping of telomeric pentanucleotide (TAACC)<sub>n</sub> repeats of the Pacific whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*, using fluorescence in situ hybridization. *Marine Biotechnology*, **8**: 467-480.
- Anderson, W. A. (1968). Structure and fate of the paternal mitochondrion during early embryogenesis of *Paracentrotus lividus*. *Ultrastructure research*, **24**: 311-321.
- Auclair, W. (1965). The chromosomes of sea urchins, especially *Arbacia punctulata*; a method for studying unsectioned eggs at first cleavage. *Biological Bulletin of the Marine Biological Laboratory, Woods Hole*, **128**: 169-176.
- Boudouresque, C. F. & Verlaque, M. (2001). Ecology of *Paracentrotus lividus*. In: Lawrence, J. M. (Ed.), *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*, 1st edition Elsevier, pp. 247-286 (2007 2nd edition).
- Calderón, I., Giribet, G. & Turon, X. (2008). Two markers and one history: phylogeography of the edible common sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Lusitanian region. *Marine Biology*, **154**: 137-151.
- Caradonna, F., Bellavia, D., Clemente, A. M., Sisino, G. & Barbieri, R. (2007). Chromosomal localization and molecular characterization of three different 5S ribosomal DNA clusters in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Genome*, **50**: 867-879.
- Colombera, D. (1974). Chromosome evolution in the phylum Echinodermata. *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung*, **12**: 299-308.
- Colombera, D., Sibuet, M. & Venier, G. (1976). Constance du nombre chromosomique chez les échinodermes. *Cahiers de Biologie Marine*, **17**: 433-438.
- Colombera, D., Venier, G. & Vitturi, R. (1977). Chromosome and DNA in the evolution of Echinoderms. *Biologisches Zentralblatt*, **96**: 43-49.
- Colombera, D. & Venier, G. (1980). Il numero dei cromosomi di cinque specie di echinodermi. *Caryologia*, **33**: 503-507.
- Colombera, D. & Tagliaferri, T. (1986). The male chromosomes of five species of echinoderms together with some technical hints. *Caryologia*, **39**: 347-352.
- Delage, Y. (1901). Etudes expérimentales sur la maturation cytoplasmique et sur la parthénogenèse artificielle chez les échinodermes. *Archives de zoologie expérimentale et générale*, **9**: 285-326 in Lipani *et al.* (1996).
- Dimarco, E., Cascone, E., Bellavia, D. & Caradonna, F. (2012). Functional variants of 5S rRNA in the ribosomes of common sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Gene*, **508**: 21-25.
- Duffy, L., Sewell, M. A. & Murray, B. G. (2007). Chromosome number and chromosome variation in embryos of *Evechinus chloroticus* (Echinoidea: Echinometridae): Is there conservation of chromosome number in the Phylum Echinodermata? New findings and a brief review. *Invertebrate Reproduction and Development*, **50**: 219-231.
- Duran, S., Palacín, C., Becerro, M. A., Turon, X. & Giribets, G. (2004). Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Molecular ecology*, **13**: 3317-3328.



- Eno, C. C., Böttger, S. A. & Walker, C. W. (2009). Methods for karyotyping and for localization of developmentally relevant genes on the chromosomes of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *The Biological Bulletin*, **217**: 306-312.
- Fernández-Boán, M., Fernández, L. & Freire, J. (2012). History and management strategies of the sea urchin *Paracentrotus lividus* fishery in Galicia (NW Spain). *Ocean & Coastal Management*, **69**: 265-272.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S. & Hurst, G.D.D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, **18**: 4541-4550.
- García-Merchán, V. H., Robainas-Barcia, A., Abelló, P., Macpherson, E., Palero, F., García-Rodríguez, M., Gil de Sola, L. & Pascual, M. (2012). Phylogeographic patterns of decapod crustaceans at the Atlantic-Mediterranean transition. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **62**: 664-672.
- Gilbert, S. F. (2014). *Developmental biology* (10th edition). Sinaeur, Sunderland.
- González-Tizón, A. M., Martínez-Lage, A., Rego, I., Ausió, J. & Méndez, J. (2000). DNA content, karyotypes, and chromosomal location of 18S-5.8S-28S ribosomal *loci* in some species of bivalve molluscs from the Pacific Canadian coast. *Genome*, **43**: 1065-1072.
- González-Tizón, A. M., Rojo, V., Vierna, J., Jensen, K.T., Egea, E. & Martínez-Lage A. (2013a). Cytogenetic characterisation of the razor shells *Ensis directus* (Conrad, 1843) and *E. minor* (Chenu, 1843) (Mollusca: Bivalvia). *Helgoland Marine Research*, **67**: 73-82.
- González-Tizón, A. M., Rojo, V., Menini, E., Torrecilla, Z. & Martínez-Lage, A. (2013b). Karyological analysis of the shrimp *Palaemon serratus* (Decapoda: Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*, **33**: 843-848.
- Gornung, E., Kartavenko, T., Kurchashova, S., Kireev, I. & Fais, D. (2005). Physical mapping of the 5S rRNA genes in the common sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea), by in situ hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*, **111**: 186C.
- Hinkley, R. E. & Newman, A. N. (1989). Selective identification of the paternal mitochondrion in living sea urchin eggs and embryos by chlorotetracycline. *The Journal of Experimental Zoology*, **249**: 111-114
- Iuri, V., Patti, F. P. & Procaccini, G. (2007). Phylogeography of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck)(Echinodermata: Echinoidea): first insights from the South Tyrrhenian Sea. *Hydrobiologia*, **580**: 77-84.
- Lejnine, S., Makarov, V. L. & Langmore, J. P. (1995). Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**: 2393-2397.
- Lin, K. W. & Yan, J. (2008). Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutation Research*, **658**: 95-110.
- Lipani, C., Vitturi, R., Sconzo, G. & Barbata, G. (1996). Karyotype analysis of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata): evidence for a heteromorphic chromosome sex mechanism. *Marine Biology*, **127**: 67-72.
- Maltagliati, F., Di Giuseppe, G., Barbieri, M., Castelli, A. & Dini, F. (2010). Phylogeography and genetic structure of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) inferred from the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Biological Journal of the Linnean Society*, **100**: 910-923.
- Mariñas-Pardo, L. (2005). Marcadores moleculares y dimorfismo sexual en los géneros *Mytilus* y *Ensis* (Mollusca, Bivalvia). (Tesis doctoral). Universidade da Coruña, A Coruña.

- Martínez, A., Mariñas, L., González-Tizón, A. & Méndez, J. (2002). Cytogenetic characterization of *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) by means of karyotyping, fluorochrome banding and fluorescent *in situ* hybridization. *Journal of Molluscan Studies*, **68**: 393-396.
- Míguez-Rodríguez, L. J. (2009). Equinodermos (Crinoideos, Equinoideos y Holothuroideos), litorales, batiales y abisales de Galicia. (Tesis doctoral). Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- Morici, G., Agnello, M., Spagnolo, F., Roccheri, M. C., Di Liegro, C. M. & Rinaldi, A. M. (2007). Confocal microscopy study of the distribution, content and activity of mitochondria during *Paracentrotus lividus* development. *Journal of Microscopy*, **228**: 165-173.
- Ouréns, R., Fernández, L., Fernández-Boán, M., Naya, I. & Freire, J. (2013). Reproductive dynamics of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Galician coast (NW Spain): effect of the habitat and population density. *Marine Biology*, **16**: 2413-2423.
- Pannacciulli, F. G., Bishop, J. D. D. & Hawkins, S. J. (1997). Genetic structure of populations of two species of *Chthamalus* (Crustacea: Cirripedia) in the north-east Atlantic and Mediterranean. *Marine Biology*, **128**: 73-82.
- Paredes, E., Bellas, J. & Costas, D. (2015). Sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval rearing – Culture from cryopreserved embryos. *Aquaculture*, **437**: 366-369.
- Plohl, M., Prats, E., Martínez-Lage, A., González-Tizón, A., Méndez, J. & Cornudella, L. (2002). Telomeric localization of the vertebrate-type hexamer repeat, (TTAGGG)<sub>n</sub>, in the wedgeshell clam *Donax trunculus* and other marine invertebrate genomes. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 19839-19846.
- Roiha, H., Miller, J. R., Woods, L. C. & Glower, D. M. (1981). Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertion in *D. melanogaster*. *Nature*, **290**: 749-753.
- Rojo, V., Giovannotti, M., Naveira, H., Nisi Cerioni, P., González-Tizón, A. M., Caputo Barucchi, V., Galán, P., Olmo, E. & Martínez-Lage, A. (2014) Karyological characterization of the endemic iberian rock lizard, *Iberolacerta moticola* (Squamata, Lacertidae): insights into sex chromosome evolution. *Cytogenetic and Genome Research*, **142**: 28-39.
- Saotome, K. (1982). A method for chromosome preparation of sea urchin embryos. *Stain Technology*, **57**: 103-105.
- Saotome, K. (1987). Chromosome numbers in eight Japanese species of sea urchins *Zoological Science*, **4**: 483-487.
- Saotome, K. (1991). Chromosome number and nucleolus organizer regions of the irregular sea urchin *Peronella japonica*. *Chromosome Information Service*, **50**: 32-34.
- Saotome, K. (1999). Chromosome number of sea urchin andromerogones during early development. *Zoological Science*, **16**: 87-92.
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium. (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, **314**: 941-952.
- Stefano, C. (2013). Research and development of hatchery techniques to optimise juvenile production of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*. (PhD Thesis). University of Stirling, Stirling.
- Sutovsky, P., Van Leyen, K., McCauley, T., Day, B. N. & Sutovsky, M. (2004). Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reproductive BioMedicine Online*, **8**: 24-33.

- Tourón-Besada, N. (2012). Caracterización genética de poblaciones de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) en Asturias, Galicia y Canarias y desarrollo de sistemas de cultivo en batea. (Tesis doctoral). Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- Vacquier, V. D. (2011). Laboratory on sea urchin fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, **78**: 553-564.
- Vitturi, R., Colomba, M. S., Pirrone, A. M., Toia, L. & Barbieri, R. (1998). Chromosome mapping of ribosomal genes in sea urchin. En: Carnevali, C. & Bonasoro, F. (Ed.), *Echinoderm Research 1998: Proceedings of the Fifth European Conference on Echinoderms*. A.A. Balkema, Rotterdam, Netherlands. pp. 171-172.
- Yamanaka, K., Jung-Gang, W., Komagata, N., Suzuki, A., Kuwabara, R. & Hirano, R. (1989). A method of chromosome observation and karyotype in *Pseudocentrotus depressus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**: 1456.
- Wilson, E. B. (1895). Archoplasm, centrosome and chromatin in the sea urchin egg. *Journal of Morphology*, **11**: 443-478 in Lipani *et al.* (1996).

○ **Recursos web**

Center for Cell Dynamics, University of Washington. (s.f.). Sea urchin embryology lab. Recuperado el 15 de abril de 2015, de [www.celldynamics.org](http://www.celldynamics.org).

The Marine Life Information Network (s.f.). Biodiversity & Conservation, Purple sea urchin – *Paracentrotus lividus*. Recuperado el 6 de junio de 2015, de [www.marlin.ac.uk](http://www.marlin.ac.uk).

**ABREVIATURAS**

ANT: Translocador de nucleótidos de adenina

COI: Citocromo oxidasa I

CTC: Clorotetraciclina

DAPI: 4'-6'-diamidino-2-fenilindol

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente

ITS: Secuencia telomérica intersticial

mtDNA: DNA mitocondrial

NOR: Región organizadora nucleolar

PABA: Ácido para-amino-benzoico

QTL: *Quantitative Trait Loci*

rDNA: DNA ribosomal

rRNA: RNA ribosomal