

## EL GENOMA DE LOS MOLUSCOS BIVALVOS: ASPECTOS MOLECULARES Y EVOLUTIVOS

Andrés Martínez-Lage y Ana Insua  
Dpto. de Biología Celular y Molecular  
Universidad de La Coruña

La organización básica del genoma nuclear de la mayoría de los organismos superiores consiste de una disposición ordenada de secuencias de ADN de copia única entremezcladas con ADN moderada y altamente repetitivo. Las secuencias de copia única son de manera general las que codifican para polipéptidos y cuyos loci no están repetidos en el genoma haploide. Las secuencias moderadamente repetitivas comprenden por un lado genes repetidos centenares o miles de veces, como es el caso del ADN que codifica para el ARN ribosómico (ADNr), el ADN que codifica para el ARN transferente (ADNt) o el ADN que codifica para las histonas (ADNh), y por otro lado secuencias no codificantes. Las secuencias altamente repetitivas son secuencias cortas no codificantes que pueden estar repetidas hasta millones de veces y que pueden ser aisladas por centrifugación en gradientes de cloruro de cesio (ADN satélite).

El análisis del genoma nuclear de bivalvos ha comenzado a abordarse a finales de los años cincuenta con la determinación del número cromosómico de los mejillones *Mytilus galloprovincialis* y *M. edulis* y desde entonces ha ido progresando pero a un ritmo lento, si se compara con otros grupos zoológicos como mamíferos o anfibios. El contenido en ADN y el cariotipo son dos importantes características que son necesarias tener en cuenta para definir las estructuras genéticas propias de cada especie, y así determinar la capacidad de asumir los cambios evolutivos (Cavalier-Smith, 1985; De Vita et al., 1994). El contenido en ADN por célula haploide de los moluscos varía según Cavalier-Smith (1978) entre 0.43 y 5.4 pg. Los últimos resultados obtenidos utilizando citometría de flujo confirman estos postulados como podemos ver en la tabla I.

**Tabla I.-** Contenido de ADN en moluscos bivalvos

Especie	2n	ADN (pg)
<i>Aequipecten opercularis</i>	26	2.23
<i>Spisula solidissima</i>	36	2.32
<i>Ostrea edulis</i>	20	2.33
<i>Cerastodem a edule</i>	38	2.73
<i>Pecten maximus</i>	38	2.83
<i>Mya arenaria</i> *	34	3.20
<i>Venerupis rhomboides</i>	38	3.23
<i>Mytilus edulis</i>	28	3.42
<i>Venerupis pulchra</i>	38	3.56
<i>Ruditapes decussatus</i>	38	3.62
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	28	3.84

De Rodríguez-Juiz et al., 1996, excepto \* Reno et al., 1994

Así, se pueden comprobar que el contenido en ADN nuclear no está relacionado con el número cromosómico. También se confirma la hipótesis de Hinegardner (1976) en el sentido de que a mayor especialización morfológica, menor contenido en ADN. En este sentido se ha sugerido que la selección natural actuaría a favor de un menor contenido en ADN debido a que de esta forma disminuirían los gastos metabólicos, duración del ciclo celular y tamaño nuclear (Cavalier-Smith, 1985; Olmo, 1991).

En este artículo trataremos de dar a conocer la investigación que se está llevando a cabo para caracterizar el genoma de bivalvos centrándonos en el análisis directo o indirecto de los diferentes tipos de secuencias de ADN.

## 1. ADN DE COPIA ÚNICA

En bivalvos, los únicos trabajos existentes de secuenciación de genes de copia única son los del grupo de Ausio (Ausio, 1986, 1995; Carlos et al., 1993a, b) que han estudiado diversos componentes (PL-I, PL-II, PL-III, PL-IV) de las proteínas tipo protaminas de los espermatozoides, los cuales tienen una estructura y composición similar a las histonas H1. De esta forma, han podido señalar la posible evolución relacionada que conecta todas las proteínas nucleares básicas del esperma con sus precursores la histona H1 (Ausio, 1995), comprobando la anterior hipótesis de Subirana et al. (1973) en cuanto que el origen de las proteínas nucleares básicas del esperma tenían su origen en las histonas. En este sentido nuestro grupo de trabajo mantiene una colaboración con el grupo de Ausio y estamos tratando de localizar el *locus* de las protaminas,

que creemos que se localiza en el brazo largo de uno de los cromosomas submeta/subtelocéntricos de tamaño pequeño.

Por otra parte, aplicando técnicas moleculares se han efectuado diversos estudios de caracterización de especies y poblaciones:

- a) Aplicado la técnica de PCR para el gen de la calmodulina, el cual está altamente conservado en todas las especies, se han podido diferenciar poblaciones de mejillone detectándose la existencia de un flujo genético restringido entre las poblaciones del oeste y noreste de la Gran Bretaña (Côrte-Real et al., 1994a). Además se ha conseguido aplicar esta técnica a ADN obtenido de larvas (Côrte-Real et al; 1994b) lo que es indicativo del interés de esta técnica en estudios de fertilización.
- b) También se ha aplicado la técnica de PCR para el estudio de la fracción PL-II de las protaminas (Heath et al; 1995), con ello se ha podido diferenciar *M. trosulus* de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, y detectar en poblaciones de la isla de Vancouver (Canadá) la existencia de mejillones híbridos entre *M. trosulus* y *M. edulis/galloprovincialis*.

## 2. ADN MODERADAMENTE REPETITIVO

Dentro del ADN moderadamente repetitivo cabe destacar los genes que codifican para el ARN ribosómico (ADNr) por ser este tipo de ARN el que se sintetiza en mayores cantidades en las células. El ADNr normalmente se haya presente en los genomas eucariotas en varios centenares de copias. Además se encuentran organizado en unidades repetidas en tándem y localizado en una o más regiones específicas del complemento cromosómico.

El conocimiento de la localización y organización del ADNr se ha ampliado enormemente en los últimos años, constituyendo una de las entidades genéticas más extensivamente estudiadas. Ello es debido probablemente a que pueden ser analizados tanto a nivel citogenético como molecular y además presentan una función genética y metabólica conocida.

El ADNr que codifica para los componentes 18S, 5,8S y 28S constituyen la región del organizador nucleolar (NOR), sitio alrededor del cual se forma el nucleolo al final de la mitosis. El ADNr que codifica para el componente 5S, por el contrario, no participa en la formación del nucleolo y suele encontrarse en una posición diferente a la de la unidad repetitiva 18S, 5,8S y 28S (genes ribosomales mayores).

En muchos organismos los NORs muestran la misma posición que las constricciones secundarias en los cromosomas mitóticos, pero su localización cromosómica puede ser determinada por diferentes técnicas de bandeado: bandas N, tinción con azul de coomasie, tinción con nitrato de plata y en algunos casos mediante tinción con fluorocromos específicos, como mitramicina o cromomicina A<sub>3</sub>. No obstante, la tinción con nitrato de plata es la más utilizada por ser sencilla, rápida y específica y generalmente los NORs detectados por este método se conocen como Ag-NORs.

Si bien comparativamente con otros grupos zoológicos el genoma de bivalvos ha sido poco estudiado, cabe destacar que el análisis de los NORs ha sido objetivo de la mayor parte de los estudios citogenéticos llevados a cabo en estos últimos años. Como se muestra en la tabla II, se conoce la distribución de los NORs en la mayor parte de las especies de importancia comercial como mejillones, ostras, volandeiras, almejas y berberechos. El número máximo de Ag-NORs varía de unas especies a otras, incluso dentro del mismo género, como es el caso *Mytilus*. Por otra parte, no se observa correlación alguna entre el número de Ag-NORs y la dotación cromosómica de la especie. Así, un par de Ag-NORs lo presentan tanto las almejas y berberechos con  $2n=38$  como el mejillón *Perna perna* con  $2n=28$ , la volandeira con  $2n=26$  y la ostra *Crassostrea gigas* con  $2n=20$ ; no obstante, cabe considerar que las cuatro especies con  $2n=38$  cromosomas presentan un único par de Ag-NORs. La posición en el cariotipo y la morfología de los pares portadores de Ag-NORs varía igualmente de unas especies a otras, pero una característica dominante es la presencia de Ag-NORs en posición terminal.

**Tabla II.-** Distribución de AG-NORs en las especies de bivalvos analizadas

Familia/Taxón	2n	Nº Ag-NORs	Posición Ag-NORs	Cromosoma	Autores
<b>Mytilidae</b>					
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	28	4	Terminal, brazo largo	st	Insuaco et al. (1994); Martínez-Expósito et al. (1994); Martínez-Lage et al. (1995)
<i>M. edulis</i>	28	4	Terminal, brazo largo	st	Dixon et al. (1986); Carnet et al. (1993); Insuaco et al. (1994); Martínez-Lage et al. (1996)
<i>M. trossulus</i>	28	5	Terminal, brazo largo	st y m	Insuaco et al. (1994); Martínez-Lage et al. (1994)
<i>M. trossulus</i>	28	6	Terminal, brazo largo	st y m	Martínez-Lage et al. (1996)
<i>M. californianus</i>	28	6	Terminal, brazo corto	sm y m	Martínez-Lage et al. (1996)
<i>Perna perna</i>	28	2	Terminal, brazo corto	t	Insuaco (1992)
<b>Ostreidae</b>					
<i>Crassostrea gigas</i>	20	2	Terminal	m	Thiriot-Quévéaux e Insuaco (1992)
<i>Ostrea edulis</i>	20	4	Terminal, brazo largo	sm	Thiriot-Quévéaux e Insuaco (1992)
<i>O. denselamellosa</i>	20	3	Terminal	m	Insuaco y Thiriot-Quévéaux (1991)
<i>O. puelchana</i>	20	3	Terminal, brazo corto	sm	Insuaco y Thiriot-Quévéaux (1993)
<i>Tiostrea chilensis</i>	20	4	Terminal, brazo corto	sm y m	Lachón de Guevara et al. (1994)
<b>Pectinidae</b>					
<i>Aequipecten opercularis</i>	26	2	Terminal, brazo largo	st	Insuaco et al. (1995)
<b>Cardiidae</b>					
<i>Cerastoderma edule</i>	38	2	Terminal, brazo corto	st y sm m	Freire (1996)
<i>C. glaucum</i>	38	2	Terminal, brazo corto	sm	Thiriot-Quévéaux y Wdowicz (1996)
<i>C. glaucum</i>	38	1	Terminal	m	Thiriot-Quévéaux y Wdowicz (1996)
<b>Veneridae</b>					
<i>Ruditapes philippinarum</i>	38	2	Terminal	m	Insuaco (1992)
<i>Venerupis aurea</i>	38	2	Intersticial	m	Insuaco (1992)

Otro aspecto común a todas las especies de bivalvos analizadas es la existencia en mayor o menor grado de diferencias intra e interindividuales (o heteromorfismo) en el número de Ag-NORs por célula, resultando particularmente evidente en especies con NORs múltiples (más de un par cromosómico portador). Generalmente este tipo de heteromorfismo es interpretado como una variación funcional más que estructural debido al hecho de que la tinción con plata permite detectar únicamente los NORs que fueron

activos transcripcionalmente en la interfase precedente. Sin embargo, la confirmación de esta interpretación no se obtendrá hasta que se determine de forma directa la localización de las secuencias de los genes ribosomales.

En un intento de iniciar el cartografiado físico del genoma de bivalvos y determinar la naturaleza precisa del heteromorfismo observado en los Ag-NORs, procedimos en nuestro laboratorio a la localización directa de los genes ribosomales mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), usando sondas heterólogas de ADNr. Esta técnica aplicada en *M. galloprovincialis*, *A. opercularis* y *C. edule* corrobora la posición de los genes ribosomales mayores en los lugares previamente señalados para los Ag-NORs. Además, indica que la variación intraindividual detectada mediante tinción con plata se debe a una actividad transcripcional diferencial de las células, es decir, a un heteromorfismo funcional. Sin embargo, en *M. galloprovincialis* y en *A. opercularis* la variación interindividual puede deberse no solo a un heteromorfismo funcional sino también estructural, determinado éste por la delección de uno de los clusters. Por otra parte, la localización directa del ADNr mediante FISH puso también de manifiesto la existencia de cambios de origen mitótico que afectan a la posición de uno de los clusters en *M. galloprovincialis*, y la presencia de distinto número de copias en *C. edule*. Por tanto, al igual que ocurre en otros organismos, los clusters de genes ribosomales en bivalvos constituyen una porción del genoma sometida a una considerable variabilidad y originada por diferentes causas.

En contraste con los genes ribosomales mayores, la localización cromosómica de los genes 5S no puede ser determinada mediante las técnicas citogenéticas clásicas de bandeado cromosómico, lo cual explicaría el desconocimiento absoluto de la posición que ocupan en el cariotipo de las especies de bivalvos. También mediante FISH, determinamos en nuestro laboratorio la localización de estos genes en *M. galloprovincialis*, utilizando en este caso sondas generadas directamente por PCR. Como generalmente ocurre en los demás eucariotas, los genes 5S de este bivalvo están separados de los genes ribosomales mayores, constituyendo dos clusters separados en un brazo de uno de los pares metacéntricos más grandes.

El ADNr resulta ser especialmente útil para estudios evolutivos debido a que al estar presentes en múltiples copias facilitan los análisis de hibridación, y además la longitud de la unidad repetitiva se encuentra dentro un rango que permite el análisis de los fragmentos de restricción. Sin embargo, la característica más importante es el contener regiones que evolucionan a diferente ritmo: las secuencias codificantes evolucionan lentamente y pueden ser usadas en comparaciones de especies relativamente distantes (especies, géneros, familias o incluso niveles superiores) (Hamby & Zimmer, 1991; Nickrent & Franchina, 1990); las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) y externas (ETS), así como ciertos dominios variables del ADNr 28S, evolucionan más rápidamente y pueden ser utilizados para comparaciones de especies próximas o poblaciones (Nazar et al., 1991; Baldwin, 1992; Bakker et al., 1992); las secuencias del espaciador intergénico son las que evolucionan más rápidamente y puede mostrar variabilidad a nivel de especies, poblaciones o incluso individuos (Rogers & Bendich, 1987; Zhuo et al., 1995).

El vertiginoso desarrollo de las técnicas de biología molecular en estos últimos años ha fomentado el interés por el ADNr de bivalvos y actualmente en las bases de datos ya figuran las secuencias parciales o completas del gen 18S en 18 especies, del 28S en 9 y del 5S en 3, siendo predecible un gran incremento de datos de secuencias en los próximos años.

Además, se han realizado varios estudios utilizando secuencias del ADNr 18S (Rice 1990; Littlewood et al., 1991; Rice et al., 1993; Kenchington et al., 1994, 1995; Steiner y Müller, 1996) o secuencias parciales del ADNr 28S (Littlewood, 1994) para establecer relaciones filogenéticas entre especies de bivalvos. Sin embargo, la comparación de secuencias y reconstrucción filogenética por el momento produce resultados confusos o contradictorios en algunos casos. Ello es debido fundamentalmente a que el número de secuencias disponibles resulta insuficiente considerando la diversidad de los bivalvos, lo que conlleva al mismo tiempo que se tenga un escaso conocimiento de la variación de la tasa de sustitución. Algunas especies presentan tasas de sustitución demasiado elevadas y en otras resulta difícil de detectar la señal filogenética por la similaridad de las secuencias. A pesar de los inconvenientes existentes para establecer filogenias fiables, los trabajos realizados permiten ir estableciendo el grado de divergencia entre especies y tasas evolutivas relativas. Así, el nivel de divergencia observado en las secuencias del ADNr 18S del género *Mytilus* fue de 0,1-0,7% (Kenchington et al., 1995) en géneros de la familia Mactridae de alrededor del 0,8% (Rice et al., 1993) y géneros de la familia Pectinidae de 0,8-1,2% (Kenchington et al., 1995). Steiner y Muller (1996) determinan la tasa evolutiva relativa de varias especies de bivalvos respecto a una especie de polioplacófora y dos de gasterópodos, observando que Mactridae presenta una disimilaridad del 50-60% de los sitios informativos, pteriomorfa del 37-40% y *Atrina* del 30%. Estas diferencias se manifestaron igualmente cuando las comparaciones se realizaron con las especies de gasterópodos aunque menos pronunciadas.

Las región espaciadora ITS-1 de dos especies de ostra morfológicamente similares (*Saccostrea commercialis* y *S. glomerata*) no presenta diferencias en la secuencia nucleotídica (Anderson y Adlard, 1994), sin embargo, el patrón de los fragmentos de restricción de esta misma región permitió la diferenciación de 12 especies de mejillones de agua dulce (White et al., 1994). También el patrón de los fragmentos de restricción de la región ITS (comprendiendo el ITS-1, 5,8S e ITS-2) permitió diferenciar *M. trossulus* de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* de la costa oeste americana (Heath et al., 1995).

En estudios realizados en nuestro laboratorio hemos determinado el tamaño de la región ITS y de la región 5S (gen 5S y espaciador) del mejillón *M. galloprovincialis*, de la volandeira *Aequipecten opercularis* y del berberecho *C. edule* y los tamaños de ambas regiones difieren entre todas las especies analizadas hasta ahora. Un estudio detallado de la secuencia permitirá precisar las diferencias entre éstas y otras especies de bivalvos y determinar su valor filogenético.

### 3. ADN ALTAMENTE REPETITIVO

El ADN satélite (Singer, 1982) está constituido por familias de secuencias cortas que se repiten en tándem varios miles de veces formando *clusters* o *loci* cromosómicos en los genomas eucariotas. Generalmente en los cromosomas de vertebrados las regiones de ADN satélite se ponen de manifiesto mediante diversas técnicas como el bandeo C o las tinciones con fluorocromos (Sumner, 1990). Sin embargo la respuesta de los cromosomas de bivalvos a las técnicas bandas C es, en general, escasa. Así en la tabla III podemos observar las diferentes localizaciones de las bandas C en bivalvos.

**Tabla III.-** Número de Bandas C y posición en moluscos bivalvos

Especie	n	Bandas C		
		Nº	Posición	NOR
<i>Ostrea edulis</i>	10	10	Centroméricas	No
<i>Crassostrea gigas</i>	10	1	Teloméricas	Si
<i>Ostrea denselam eIbsa</i>	10	14	Centroméricas y Teloméricas	Si(2)*
<i>Cardium edule</i>	19	12	Pericentroméricas, Intersticiales o teloméricas	Si (1)*
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	14	2	Teloméricas	Si
<i>Mytilus edulis</i>	14	2	Teloméricas	Si
<i>Mytilus trossulus</i>	14	3	Teloméricas	Si
<i>Venerupis pulchra</i>	19	7	Intersticiales, Centroméricas y Teloméricas	?
<i>Arquipecten opercularis</i>	13	17	Centroméricas Intersticiales o Teloméricas	Si

NOR: Coincidencia o no entre posición de NORs y bandas C; \* Nº de bandas C que coinciden con los NORs

Sin embargo cuando se aplica la técnica de bandas C a cromosomas obtenidos de larvas de mejillón el número de bandas C que somos capaces de visualizar es muy superior (Martínez-Lage et al., 1994, 1995). Las diferencias podrían ser debidas al estado de condensación cromosómica, la temperatura diferente a la cual se realizan las extensiones y/o la diferente forma de fijación (Martínez-Lage et al., 1994). Aunque podría ser debida a pérdidas de heterocromatina de los tejidos somáticos con respecto a los de la línea germinal como sucede en otros organismos (John, 1988; Sprandling et al., 1992). Por otra parte hay que tener en cuenta que no todas las regiones heterocromáticas se ponen de manifiesto después de aplicar la técnica de bandas C. Así, en larvas de mejillón de las especies europeas se han podido detectar diferentes tipos de heterocromatinas mediante el uso combinado de las técnicas de bandeo C, tinción con fluorocromos, tinción argéntica y digestión con endonucleasas de restricción (Martínez-Lage et al., 1994, 1995).

Pero la verdadera importancia del ADN satélite como instrumento de estudios evolutivos es debida a que: 1) especies relacionadas pueden compartir

un mismo tipo de secuencia (Singer, 1982), 2) generalmente se localizan en regiones similares en cromosomas no homólogos (John, 1988), 3) evoluciona de manera concertada de forma que se mantiene la homogeneidad de las unidades repetitivas (Stratachan et al., 1985; Plohl y Ugarkovic, 1994). Las familias de ADN satélite obtenidas hasta el momento en bivalvos se reflejan en la tabla IV.

**Tabla IV.-** Familias de ADNs satélites en moluscos bivalvos

Especie	Familia	pb	% Genoma	Tipo	Autores
<i>M. galloprovincialis</i>	Apa I	173	0.63	Tipo I	Ruiz-Lara et al. 1992
"	"	161	3.09	Tipo II	Ruiz-Lara, 1992
"	"	166	0.067	Tipo III	"
<i>D. trunculus</i>	EcoRV	155	0.23	E1	Plohl & Cornudella, 1996
"	"	155	0.09	E2	"
<i>C. gigas</i>	Fok I/Hae III	170	1 to 4	-	Clabby et al., 1996
<i>D. trunculus</i>	Hind III	162	0.043	DTHS1	Plohl & Cornudella, 1997
"	"	167	0.081	DTHS2	"
"	"	145	0.035	DTHS3	"
"	"	136	0.008	DTHS4	"

El ADN satélite de *Crassostrea gigas* ha sido localizado mediante hibridación *in situ* en posición telomérica en un par, y en posición submetacéntrica en otro par (Clabby et al., 1996).

En nuestro laboratorio hemos realizado experimentos de hibridación *in situ* con los tres ADN satélites de *Mytilus galloprovincialis*. Así, hemos podido observar que el ADN satélite tipo I parece encontrarse organizado en tándem aunque algunas secuencias se encuentran dispersas por el genoma, el satélite tipo II se encuentra disperso por todo el genoma, mientras que el satélite tipo III se localiza en clusters en las regiones terminales de al menos 8 pares cromosómicos.

Los satélites de la familia EcoRV de *Donax trunculus* sólo han sido estudiadas a nivel secuencial y aunque se supone que sus secuencias se encuentran dispersas por el genoma tendría que realizarse una hibridación *in situ* para confirmarlo.

Con respecto a los satélites de la familia Hind III de *D. trunculus* se ha observado una característica muy interesante y es que los cuatro tipos poseen un motivo de repetición característico GGGTTA.

Las repeticiones teloméricas más típicas de vertebrados son: TTAGGG (Meyne et al; 1990), que como puede observarse es idéntica a las repeticiones observadas en los satélites de la familia Hind III de *D. trunculus*. Debido a la colaboración existente entre el laboratorio del profesor Cornudella y el nuestro, hemos realizado diversos experimentos de hibridación con la sonda DTP9-6 que es una parte del satélite DTHS1 comprobando que dicha secuencia si se encuentra localizada en los telómeros tanto en *D. trunculus* como de *M. galloprovincialis*.



Actualmente, aplicando la técnica de Southern Blotting a mejillones de una población gallega para transferir ADN digerido con diferentes endonucleasas de restricción y posteriormente hibridarlo con los 3 tipos de satélite de mejillón que existen. Con ello tratamos de diferenciar poblaciones de mejillón ya que debido a la mayor velocidad evolutiva de los ADNs satélites esperamos encontrar diferencias entre poblaciones gallegas y otras poblaciones de *Mytilus galloprovincialis* de la Península Ibérica y/o poblaciones de *M. edulis* europeas. En este sentido hay que señalar que Ruiz-Lara (1993) observó trabajando con mejillones procedentes de cultivos en batea un elevado polimorfismo en las secuencias de los ADN satélites II y III. Sin embargo nosotros hemos obtenido una respuesta homogénea tras la digestión del ADN genómico con Msp I y Taq I e hibridación con el satélite tipo I, digestión con Msp I/Hae III y Dra I e hibridación con el satélite tipo II y digestión con el Msp I/Hae III e hibridación con el satélite III.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Anderson, T.J. & Adlard, R.D. (1994). Nucleotide sequence of a rDNA internal transcribed spacer supports synonymy of *Saccostrea commercialis* and *S. glomerata*. *J. Moll. Stud.*, 60: 196-197.
- Ausio, J., 1986. Structural variability and compositional homology of the protamine-like components of the sperm from the bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B, 439-449.
- Ausio, J., 1995. Histone H1 and the evolution of the nuclear sperm-specific proteins. En: Jamieson BGM, Ausio, J., Justine, J.L. (eds). *Advances in spermatozoal taxonomy and phylogeny*. Paris: Memoires de Muséum National d'Histoire Naturelle, 166: 447-462.
- Bakker, F.T., Olsen, J.L., Stam, W.T. & Van den Hoek, C. (1992). Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer regions (ITS1 and ITS2) define discrete biogeographic groups in *Cladophora albina* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 28: 839-845.
- Baldwin, B.G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1:3-16.
- Carlos, S., Jutglar, L., Borrell, I., Hunt, D.F. & Ausio, J. (1993) Sequence and Characterization of a Sperm-specific Histone Hi-like Protein of *Mytilus californianus*. *J. Biol. Chem.*, 268: 185-194.
- Carlos, S., Hunt, D.F., Rocchini, C., Arnott, D.P. & Ausio, J. (1993). Post-translational Ceavage of a Histone H1-like Protein in the Sperme of *Mytilus*. *J. Biol. Chem.*, 268: 195-199.

- Cavalier-Smith, T. (1978). Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J. Cell Sci.* 34: 247-278.
- Cavalier-Smith, T. (1985). *The evolution of genome size*. John Wiley & Sons (eds), New York.
- Clabby, C., Goswami, U., Flavin, F., Wilkins, N., Houghton, J.A. & Powell, R. (1996) Cloning, characterization and chromosomal location of a satellite DNA from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*, 168: 205-209.
- Cornet, M., 1993. A short-term culture method for chromosome preparation from somatic tissues of adult mussel (*Mytilus edulis*). *Experientia*, 49: 87-90.
- Côrte-Real, H.B.S.M., Dixon, D.R. & Holland, P.W.H. (1994). Intron-targeted PCR: a new approach to survey neutral DNA polymorphism in bivalve populations. *Mar. Biol.*, 120: 407-413.
- Côrte-Real, H.B.S.M., Holland, P.W.H. & Dixon, D.R. (1994). Inheritance of a nuclear DNA polymorphism assayed in single bivalve larvae. *Mar. Biol.* 120: 415-420.
- De Vita, R., Cavallo, D., Eleuteri, P. & Dell'ome (1994). Evaluation of interspecific DNA content variation and sex identification in Falconiformes and Strigiformes by flow cytometric analysis. *Cytometry* 16: 346-350.
- Dixon, D.R., McFadzen, I.R.B. & Sisley, K. (1986). Heterochromatin marker regions (nucleolar organizers) in the chromosomes of the common mussel *Mytilus edulis* (Mollusca: Pelecypoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 97: 205-212.
- Freire, R. (1996). *Localización y análisis de los genes ribosomales en Cerastoderma edule*. Tesis de Licenciatura. Universidad de La Coruña.
- Hamby, R.K. & Zimmer, E.A. (1991). Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. En *Molecular systematics of plants*. Soltis, P., Soltis, D., Doyle, J. Chapman & Hall (eds), New York, pp: 50-91.
- Heath, D.D., Rawson, P.D. & Hilbish, T.J. (1995). PCR-based nuclear markers identify alien blue mussel (*Mytilus* spp.) genotypes on the west coast of Canada. *Can.J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 2621-2627.
- Hinegardner, R. (1976) Evolution of genome size. En: *Molecular Evolution*. Aysla FJ (ed) Sinauer Associates, Massachusetts, 179-199.
- Insua, A. (1993). *Estudio cariológico en moluscos bivalvos*. Tesis de Doctorado. Universidad de La Coruña.
- Insua, A. & Thiriou-Quévieux, C. (1991). The characterization of *Ostrea denselamellosa* (Mollusca, Bivalvia) chromosomes: karyotype, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. *Aquaculture*, 97: 317-325.

- Insua, A. & Thiriote-Quévieux, C. (1993). Karyotype and nucleolus organizer regions in *Ostrea puelchana* (Bivalvia: Ostreidae). *Veliger*, 36: 215-219.
- Insua, A., Labat JP & Thiriote-Quévieux, C. (1994). Comparative analysis of karyotypes and nucleolar organizer regions in different populations of *Mytilus trossulus*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *J. Moll. Stud.*, 60: 359-370.
- Insua, A., López-Piñón, M.J., Román, G. & Méndez, J. (1995). Karyotype and location of nucleolar organizer regions in *Aequipecten opercularis* (Bivalvia: Pectinidae). *Abstracts of 12th International Malacological Congress*.
- John, B. (1988). The biology of heterochromatin. Heterochromatin: molecular and structural aspects. R.S. Verma (ed), Cambridge University Press, Cambridge, 1-147.
- Kenchington, E., Roddick, D.L., Singh, K.R. & Bird, C.J. (1994). Analysis of small-subunit rRNA gene sequences from six families of molluscs. *J. Mar. Biotechnol.* 1: 215-217.
- Kenchington, E., Landry, D. & Bird, C.J. (1995). Comparison of taxa of the mussel *Mytilus* (Bivalvia) by analysis of the nuclear small-subunit rRNA gene sequence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 2613-2620.
- Ladrón de Guevara, B., Winkler, F. & Palma, C. (1994). Karyotype description and the position of the nucleolar organizer region (NOR) in the Chilean oyster *Tiostrea chilensis* (Philippi) chanley and dinamani. En: *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Beaumont A.R. (ed) Chapman & Hall, London, pp 399-405.
- Littlewood, D.T.J. (1994). Molecular Phylogenetics of cupped oysters based on partial 28S rRNA gene sequences. *Mol. Phylogen. Evol.*, 3: 221-229.
- Littlewood, D.T.J., Ford, S.E. & Fong, D. (1991). Small subunit gene sequence of *Crassostrea virginica* (Gmelin) and a comparison with similar sequences from other bivalve molluscs. *Nucleic. Acids Res.*, 19: 6048.
- Martínez-Expósito M.J., Pasantes J.J. & Méndez J. (1994). NOR activity in larval and juvenil mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 175: 155-165.
- Martínez-Lage, A., González-Tizon, A. & Méndez, J. (1994). Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity*, 72: 242-249.
- Martínez-Lage, A., González-Tizon, A. & Méndez, J. (1995). Chromosomal markers in three species of the genus *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia). *Heredity*, 74: 369-375.

- Martínez-Lage, A., González-Tizon, A., Ausio, J. & Méndez, J. (1996). Karyotypes and Ag-NORs of the mussels *Mytilus californianus* and *M. trossulus* from the Pacific Canadian Coast. *Aquaculture*, 0000-0000.
- Meyne, J., Baker, R.J., Hobart, H.H., Hsu, T.C. Ryder, O.A. et al. (1990). Distribution on non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, 99: 3-10.
- Nazar, R.N., Hu, X., Schmidt, J., Culham, D. & Robb, J. (1991). Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of verticillium wilt pathogens. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, 39: 1-11.
- Nickrent, D.L., Franchina, C.R. (1990). Phylogenetic relationships of the Santalales and relatives. *J. Mol. Evol.*, 31: 294-301.
- Olmo, E. (1991). Genome variations in the transition from amphibians to reptiles. *J. Mol. Evol.*, 33: 68-75.
- Plohl, M. & Cornudella, L. (1996). Characterization of a complex satellite DNA in the *Donax trunculus*: analysis of sequence variations and divergence. *Gene*, 0000-0000.
- Plohl, M. & Cornudella, L. (1997) Characterization of inter-related sequence motifs in four stellite DNAs and their distribution in the genome of the mollusc *Donax trunculus*. *Gene* 0000-0000.
- Plohl, M. & Ugarkovic, D. (1994). Characterization of two abundant satellite DNAs from the mealworm *Tenebrio molitor*. *J. Mol. Evol.* 39: 489-495.
- Reno, P.W., House, M. & Illingworth, A. (1994). Flow Cytometric and Chromosome Analysis of Softshell Clams, *Mya arenaria*, with Disseminated Neoplasia. *J. Inv. Pathol.*, 64: 163-172.
- Rice, E.L. (1990). Nucleotide sequence of the 18S ribosomal RNA gene from the Atlantic sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Nucleic. Acids Res.*, 18: 5551.
- Rice, E.L., Roddick, D. & Singh, R.K. (1993). A comparison of molluscan (Bivalvia) phylogenies based on palaeontological and molecular data. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 2: 137-146.
- Rodríguez-Juiz, A.M., Torrado, M. & Méndez, J. (1996) Genome-size variation in bivalve molluscs determined by flow cytometry. *Mar. Biol.* 126: 489-497.
- Rogers, S.O. & Bendich, A.J. (1987). Heritability and variability in ribosomal RNA genes of *Vicia faba*. *Genetics*, 117: 285-295.
- Ruiz-Lara, S. (1993). *Análisis del ADN satélite en el mejillón Mytilus edulis*. Tesis Doctoral. Universidad Central de Barcelona.

- Ruiz-Lara, S., Prats, E., Sainz, J. & Cornudella, L. (1992). Cloning and characterization of a highly conserved satellite DNA from the mollusc *Mytilus edulis*. *Gene*, 117: 237-242.
- Singer, M. F. (1982). Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Internat. Rev. Cytol.*, 76: 63-112.
- Spradling, A.C., Karpner, G., Graser, A. & Zhang, P. (1992) Evolutionary conservation of developmental mechanisms: DNA elimination in *Drosophila*. *Evolutionary conservation of developmental mechanisms*: 39-53. A. Spradling (ed), Wiley-Liss, New York.
- Steiner, G. & Müller M. (1996). What can 18S rDNA do for bivalve phylogeny?. *J. Mol. Evol.*, 43: 58-70.
- Stratarchan, T., Webb, D. & Dover, G.A. (1985). Transition stages of molecular drive in multiple-copy DNA families in *Drosophila*. *EMBO J.* 4: 1701-1708.
- Subirana, J.A., Cozculluela, C., Plau, J. & Unzeta, M. (1973). Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs. *Biochim. Biophys. acta* 317: 364-379.
- Sumner, A.T. (1990). *Chromosome banding*. Ed. Unwinn Hyman, London.
- Thiriot-Quévieux C. & Ayraud N. (1982). Les caryotypes de quelques espèces de Bivalves et de Gastéropodes marins. *Mar. Biol.* 70: 165-175.
- Thiriot-Quévieux, C. & Insua, A. (1992). Nucleolar organiser region variation in the chromosomes of three oyster species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 157: 33-40.
- Thiriot-Quévieux, C. & Wolowicz, M. (1996). Karyotypes of *Cerastoderma glaucum* (Bivalvia) from Baltic and Mediterranean populations. *Hydrobiologia*, 324: 149-155.
- White, L.R., McPherson, B.A. & Stauffer, J.R. (1994). Identification of freshwater mussel glochidia on host fishes using restriction fragment length polymorphisms. *Mol. Ecol.*, 3: 183-185.
- Zhuo, L., Reed, K.M. & Phillips, R.B. (1995). Hypervariability of ribosomal DNA at multiple chromosomal sites in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Genome*, 38: 487-496.