

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



**INDUCCION DE TRIPLOIDIA Y ANALISIS CITOGENETICOS
EN DOS ESPECIES DE SALMONIDOS CON INTERES
EN ACUICULTURA**

Rafael Lozano Ruiz
Granada, Junio, 1989



17/117

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Departamento de Biología Animal
Ecología y Genética

El ejemplar que se presenta es una copia exacta de la Tesis Doctoral defendida el día 12 de Julio de 1.989 bajo el título "Inducción de triploidia y análisis citogenéticos en dos especies de salmónidos con interés en acuicultura", que fue juzgada con la calificación de Apto Cum Laude por el Tribunal compuesto por los siguientes Profesores Doctores:

Presidente: Dr.D.Manuel de la Higuera González

Secretario: Dr.D.José L. Oliver Jiménez

Vocales: Dr.D.José Fernández Piqueras

Dr.D.Gonzálo Alvarez Jurado

Dr.D.Carlos Sentís Castaño

Fdo. Rafael Lozano Ruiz

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

DON JUAN DE DIOS PEREZ JIMENEZ, PROFESOR TITULAR
Y SECRETARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNI-
VERSIDAD DE GRANADA.

Núm. 1111

CERTIFICO: Que la presente Tesis Doctoral
corresponde a la presentada en esta Facul-
tad por DON RAFAEL LOZANO RUIZ y que fué
calificada con APTO "Cum Laude" el día
12 de Junio de 1.989 por el Tribunal corres-
pondiente, y que fué aprobado en Comisión
de Doctorado celebrada el día 4 de Julio
de 1.989, siendo el Titulo de la Tesis
"INDUCCION DE TRIPLOIDIA Y ANALISIS CITO-
GENETICOS EN DOS ESPECIES DE SALMONIDOS CON
INTERES EN ACUICULTURA".

Y para que conste expido la presente cer-
tificación con el Vº.Bº. del Iltmo Sr. Decano
en Granada a veinte de julio de mil novecien-
tos ochenta y nueve.

Vº.Bº.
EL DECANO

J. Ruiz



D. Perez

YANIA
165
174

ETICOS
INTERES
CULTURA

Rafael Lozano Ruiz
Granada, Junio, 1989



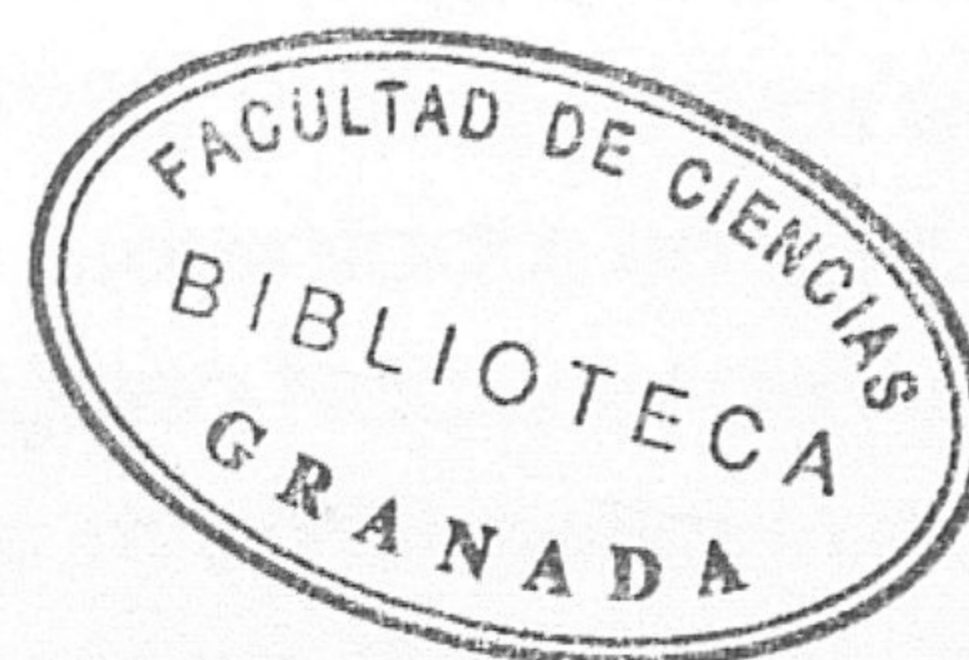
UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 24 JUL 1989
SALIDA NUM. 1111

BIBLIOTECA	UNIVERSITARIA
GRANADA	
Nº Documento	<u>216165</u>
Nº Copia	<u>216174</u>

INDUCCION DE TRIPLOIDIA Y ANALISIS CITOGENETICOS
EN DOS ESPECIES DE SALMONIDOS CON INTERES
EN ACUICULTURA



Rafael Lozano Ruiz
Granada, Junio, 1989

INDUCCION DE TRIPLOIDIA Y ANALISIS CITOGENETICOS
EN DOS ESPECIES DE SALMONIDOS CON INTERES
EN ACUICULTURA

Trabajo que presenta D. Rafael Lozano Ruiz
para optar al Grado de
Doctor en Ciencias Biológicas.

**Departamento de Biología Animal, Ecología
y Genética.**

Parte de los resultados que figuran en este trabajo han sido publicados en:
Acuicultura, J. Espinosa y R. Lozano Ruiz, *Acuicultura* (Madrid),
63(6):335-338 (1988); *Genética* (Madrid), 17(1):173-178 (1989);
Notas de Genética (Oviedo, 1987); *Actas del Congreso de Acuicultura*
Compostela, 1987; 3ª Internacional de Genética (Oslo, 1988);
Noruega, 1988, y X Internacional de Acuicultura (Oslo, 1988).

Vº Bº Directores de Tesis

Prof. Dr. Manuel Ruiz Rejón

Prof. Dr. Carmelo Ruiz Rejón

Parte de los resultados que figuran en esta Tesis han sido publicados en: Genética en Acuicultura, J.Espinosa y U. Labarta (eds.), CAICYT, pags.215-246, 1987; Stain Technology, 63(6):335-338 (1988); Genética Ibérica,40 (1988) y Perspectivas en Genética, Ed.Rueda, Madrid, pags.173-203 (1989). Otros han sido presentados en las XXII Jornadas Luso-Españolas de Genética (Oviedo,1986); II Congreso Nacional de Acuicultura (Santiago de Compostela,1987); 3rd International Symposium on Genetics in Aquaculture (Trondheim, refero Noruega, 1988, y X International Chromosome Conference (Uppsala, Suecia, 1989).

AGRADECIMIENTOS

Quizás debiera ser ésta la página más larga de la presente memoria y la primera en ser escrita. Pido disculpas por no cumplir ninguno de los objetivos. Sin embargo, sí he de decir que bastantes personas han colaborado para que el trabajo que tienen en sus manos saliese adelante. A todos mi más sincero agradecimiento.

En especial a Manuel Ruiz Rejón y Carmelo Ruiz Rejón, por su inmejorable labor como Directores de esta Tesis y su ejemplar sentido de la amistad.

A Alberto Chacón y Fernando Nieto, directores técnicos de las Piscifactorías de Benamahoma (Cádiz) y Orol (Lugo) y porque sin sus enseñanzas prácticas en las tareas reproductoras, de manejo de stock y toma de resultados, esta aventura no hubiese llegado a buen término. Y lo que es más importante, porque han sabido muy bien crear una amistad sincera entre ellos, sus familias, y los que aquí nos dedicamos a la Genética de salmónidos.

A la Dra. Laura Sánchez y a Paulino Martínez que siempre estuvieron dispuestos a hacerse unos cientos de kilómetros más porque los cultivos de linfocitos crecieran "como Dios manda". A los Dres. José Fernández Piqueras, Carlos Sentís y Javier Santos, por haber hecho posible que las endonucleasas fueran efectivas en los cromosomas de truchas y salmones.

Al Dr. José L. Oliver que tuvo que padecer las pérdidas de tiempo ocasionadas por mis pocos conocimientos en el manejo del "ordenador". Gracias por los momentos que dedicaste y por haber contribuido a que tales conocimientos no fueran tan "pocos".

Al Dr. Gonzalo Álvarez, de quien partió la iniciativa de manipular los cromosomas de estos "bichos". Gracias como no, por haber hecho de Galicia "mi segunda patria".

A Encarna Herraiz por los muchos cariotipos que tuvo que montar y los desaires que, por uno u otro motivo, tuvo que soportar. Espero que de ésta no se te olviden los cromosomas de las truchas y salmones.

A mis hermanos Alfredo y Raúl que siempre estuvieron al pie del cañón procurando que todo lo referente a la informatización de resultados y diseño del trabajo adquiriera tintes de perfección. Creo que sobran las palabras.

A Manolo Librero, Juan Queiro y Javier Serrantes que propiciaron siempre el que las experiencias se desarrollaran en las mejores condiciones.

A Amparo, Celia, Pepe y Sole, que con su constante pregunta (¿cuándo vas a leer ...?), y unas cuantas cervezas, consiguieron mantener cuatro años más lo que se inició hace ya más de una década, que no es poco.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
<u>1.1 La poliploidía en la evolución de los vertebrados</u>	2
1.1.1. Los salmónidos proceden de un ancestral poliploide	4
1.1.2. Naturaleza de la poliploidía de salmónidos	5
1.1.3. Evolución cromosómica en salmónidos	6
<u>1.2. Características Citogenéticas de la trucha arco iris y el salmón coho</u>	7
<u>1.3. Manipulación cromosómica</u>	9
1.3.1. Poliploidía, esterilidad y mejora	10
2. MATERIAL Y METODOS	19
<u>2.1. Material Biológico</u>	19
<u>2.2. Técnica de inducción de triploidía mediante choque térmico</u>	20
<u>2.3. Técnicas Citogenéticas</u>	22
2.3.1. Obtención de preparaciones cromosómicas	22
2.3.2. Técnica de Bandeo C	31
2.3.3. Técnica de impregnación argéntica	32
2.3.4. Técnicas de fluorescencia	32
2.3.5. Bandeo cromosómico mediante digestión in situ con endonucleasas de restricción	36
2.3.6. Bandeado secuencial de preparaciones cromosómicas	37
<u>2.4. Técnicas Histológicas</u>	38
<u>2.5. Técnicas Fotográficas</u>	39
3. OBJETIVOS	41

INDICE

4. RESULTADOS	43
<u>4.1. Manipulación cromosómica</u>	43
4.1.1. Inducción de triploidía mediante choque térmico en la trucha arco-iris (<i>Salmo gairdneri</i> Rich.)	43
4.1.1.1. Eficacia del método de inducción y supervivencia de las progenies	44
4.1.1.2. Crecimiento y desarrollo gonadal	47
4.1.2. Inducción de triploidía mediante choque térmico en el salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	50
4.1.2.1. Eficacia del método y supervivencia de la progenie	50
4.1.2.2. Crecimiento y desarrollo gonadal	52
<u>4.2. Análisis citogenéticos</u>	54
4.2.1. Análisis citogenéticos en la trucha arco-iris	54
4.2.1.1. Descripción del cariotipo	54
4.2.1.2. Características de la variabilidad cromosómica intra e interindividual	55
4.2.1.3. Análisis de la variabilidad intraindividual: naturaleza y herencia	57
4.2.1.4. Análisis de la variabilidad interindividual no esperada: naturaleza y herencia	67
4.2.1.5. Bando C	71
4.2.1.6. Regiones organizadoras del nucleolo.	72
4.2.1.7. Fluorescencia	73
4.2.1.8. Bando mediante enzimas de restricción	74
4.2.2. Caracterización citogenética del salmón coho	75
4.2.2.1. Descripción del cariotipo	75
4.2.2.2. Bando C	76
4.2.2.3. Regiones organizadoras del nucleolo	78
4.2.2.4. Fluorescencia	79
4.2.2.5. Bando mediante enzimas de restricción	80
4.2.2.6. Tinción secuencial: endonucleasas/CMA o Giemsa/Ag-NOR	82

INDICE

5 . DISCUSION	83
<u>5.1. Manipulación cromosómica</u>	83
5.1.1. Eficacia del choque térmico como método de inducción de triploidía en salmónidos	83
5.1.1.1. Eficacia del método en la trucha arco-iris	84
5.1.1.2. Eficacia del método en el salmón coho	88
5.1.1.3. Consideraciones generales a trucha y salmón	89
5.1.2. Desarrollo gonadal y crecimiento	91
5.1.3. Viabilidad de los triploides	95
<u>5.2. Análisis citogenéticos</u>	97
5.2.1. Características del polimorfismo cromosómico presente en la trucha arco-iris	97
5.2.1.1. Naturaleza de la variabilidad cromosómica intra e interindividual	97
5.2.1.2. Herencia de la variabilidad cromosómica intraindividual	102
5.2.1.3. Herencia del polimorfismo cromosómico interindividual	107
5.2.1.4. Relación entre variabilidad cromosómica intraindividual y polimorfismo cromosómico interindividual	110
5.2.2. Sobre los cariotipos de <i>Salmo gairdneri</i> y <i>Oncorhynchus Kisutch</i>	111
5.2.3. Las regiones organizadoras del nucleolo	113
5.2.4. Caracterización de la heterocromatina constitutiva	118
5.2.4.1 Heterocromatina asociada a los NORs	118
5.2.4.2. Heterocromatina centromérica y telomérica	120
5.2.5. Consideraciones sobre la utilidad de los enzimas de restricción en la Citogenética de peces	122

INDICE

6. CONCLUSIONES 125

7. BIBLIOGRAFIA 129

Apéndice 1: TABLAS

Apéndice 2: FIGURAS

ODUCCION

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

Desde hace ya algunos años, los miembros de la familia Salmonidae han venido siendo objeto de numerosos y sistemáticos estudios, tanto a nivel molecular como citogenético. El interés de los investigadores por los salmónidos en general, desde el punto de vista genético, reside en la compleja evolución que éstos han seguido hasta llegar a su estado actual. En este sentido, se disponen de los datos necesarios para afirmar que en este grupo de peces tuvo lugar un proceso de tetraploidización gracias al cual se duplicó completamente el genoma, y que después, los ancestrales poliploides se vieron sometidos a un proceso antagónico, la diploidización del cariotipo, que los ha conducido hasta su estado actual.

Los avances en la caracterización genética de tales fenómenos han venido marcados por la puesta a punto de técnicas como la electroforesis en gel, la aplicación del choque hipotónico y agentes antimitóticos, el desarrollo de los métodos de bandeado cromosómico, así como la estandarización de las técnicas de cultivo de linfocitos. No obstante, falta aún mucho camino por recorrer. A nivel citogenético, no se cuenta todavía con una técnica de bandedo que permita caracterizar el cariotipo de estas especies para así tratar averiguar la posible naturaleza de los fenómenos de variabilidad intra e interindividual presentes en una gran mayoría de especies de salmónidos. Asimismo, se desconocen los patrones de herencia que siguen los distintos polimorfismos implicados en tales fenómenos de variabilidad.

Por otra parte, ha transcurrido ya bastante tiempo desde que los primeros piscicultores comenzaron a darse cuenta de la viabilidad de los cultivos en cautividad, en instalaciones apropiadas, de muchas de las especies de esta familia, contribuyendo de esta forma a paliar, en cierta medida, los déficits en la oferta de pescado fresco y materias primas en algunas regiones y durante ciertos períodos del año. Ni que decir tiene que la cría de carpas, truchas y salmones fue el primer paso dado en el nacimiento de la Acuicultura, una ciencia que, en términos generales, persigue similares objetivos a la Agricultura, con la diferencia de que los orígenes de esta última son bastante más remotos.

El interés que ofrecen las especies de salmónidos para la acuicultura se ha visto ampliado en los últimos años con la aplicación de los métodos de mejora

genética, los cuales pretenden producir ejemplares que crezcan más rápidamente, toleren mejor las condiciones de stress o sean más resistentes a determinadas enfermedades. Tradicionalmente tales métodos se basaban, y lo siguen haciendo, en la selección, individual o familiar, de progenitores con las características deseadas. Sin embargo, recientemente se ha podido comprobar que las técnicas de manipulación cromosómica pueden contribuir tanto o más eficazmente que las anteriores en este proceso de mejora, pero que además, lo hacen en un tiempo mucho más corto que las primeras lo que posibilita el poder obtener resultados prácticos en pocas generaciones.

1.1.- La poliploidía en la evolución de los vertebrados

La poliploidía o multiplicación de genomas completos, ha debido jugar un papel importante en la evolución de los vertebrados (Ohno, 1974; Fisher y col., 1980; Bogart, 1980; Schultz, 1980). De hecho se sabe que mamíferos y reptiles poseen, en términos generales, mayores cantidades de ADN por célula que anfibios y peces. Ello, unido a la existencia de gran número de genes duplicados, han llevado a Ohno y sus colaboradores (Ohno, 1967, 1970a, 1974,; Ohno y col., 1968) a proponer que, al menos en una ocasión, se ha debido duplicar el genoma de los vertebrados. Fisher y col. (1980) han aportado datos en este sentido que indican que un fenómeno de tetraploidía debió tener lugar hace 500 millones de años. Sin embargo, otros procesos similares a éste han debido suceder en distintos momentos (anteriores o posteriores) y sobre líneas filogenéticas algo más establecidas, concretamente en el ancestral reptiliano de los mamíferos (Ohno, 1967; Comings, 1972).

La segunda familia cuyos componentes...

A pesar de los múltiples ejemplos de poliploidía descritos en anfibios y reptiles (Bogart, 1980), parece ser que ésta no ha sido esencial en la evolución de tales grupos toda vez que existen especies diploides estrechamente relacionadas con cada una de las poliploides, además de que estas últimas, en ningún caso han originado taxones superiores a nivel de género o familia (Bogart, 1980).

Ambos familias difieren en un hecho esencial, y es que...

Un gran número de casos de poliploidía han sido descritos también en peces (Schultz, 1980), incluyendo especies primitivas como el pez pulmonado *Protopterus dolloi* (Vervoort, 1980), el esturión *Scaphirhynchus platorhynchus* (Ohno y col., 1969a) o la espátula *Polyodon spathula* (Dingerkus y Howell, 1976). Formas

diploides y tetraploides estrechamente relacionadas se han encontrado también en la colmilleja, *Cobitis biwae* (Kobayasi, 1976, Sezaki y Kobayasi, 1978), el pez gato del género *Corydoras* (Dunham y col., 1980) o en algunas especies de *Misgurnus* (Raicu y Tisescu, 1972). Entre los ciprínidos, el barbo (*Barbus barbus*), la carpa (*Cyprinus carpio*) o el pez dorado (*Carassius auratus*) son tetraploides (Ohno y col., 1967; Muramoto y col., 1968; Wolf y col., 1969; Ohno, 1974). Especialmente interesantes son los poliploides recientes incluidos en los géneros *Poecilia* y *Poecillopsis* encontrados en Méjico (Schultz, 1980) en los que las formas triploides se reproducen todas por ginogénesis y presentan un origen híbrido. Estas, y las formas diploides relacionadas, han sido y continúan siendo intensamente estudiadas por cuanto pueden servir como sistemas modelo donde analizar el valor adaptativo y la importancia como fuerza evolutiva que tiene la poliploidía (Schultz, 1980).

Pero quizás los casos más espectaculares de poliploidía son los que afectan a dos familias enteras de peces. Los 12 géneros y 58 especies de la familia Catostomidae parecen tener un origen tetraploide común. En este sentido, Uyeno y Smith (1972) han sugerido que los catostómidos habrían surgido de un ancestral cipriniforme en el cual tuvo lugar un fenómeno de tetraploidización del genoma hace unos 50 millones de años, como lo revela la duplicación en el número cromosómico y en la cantidad de ADN ocurrida en este grupo. La familia Catostomidae, considerada como una de las más evolucionadas de peces en Norteamérica, constituye un grupo valioso donde estudiar los cambios evolutivos en el genoma que tienen lugar tras un proceso de tetraploidización (Ferris, 1984).

La segunda familia cuyos componentes parecen tener un origen ancestral tetraploide común es la familia Salmonidae, con 9 géneros y 68 especies, las cuales se engloban a su vez en tres subfamilias según la mayoría de los taxónomos: Coregoninae, Salmoninae (truchas, salmónes y salvelinos) y Thymallinae (tímalos).

Ambas familias difieren en un hecho esencial; y es que tras la tetraploidización, los catostómidos retornaron rápidamente al estado diploide mientras que los salmónidos aún continúan en el proceso de diploidización que les conduce a la restauración de la herencia disómica para todos los genes. Por lo tanto, los fenómenos evolutivos acaecidos en estas dos familias suponen una excepción a

la idea comúnmente aceptada de que la poliploidía no es un factor decisivo en la evolución progresiva de niveles taxonómicos superiores al de especie (Stebbins, 1977; Dobzansky y col., 1977; White, 1978).

1.1.1.- Los salmónidos proceden de un ancestral poliploide

La idea de que los salmónidos tienen un origen poliploide fue propuesta por primera vez por Svardson (1945) ante la observación de que los números cromosómicos de las especies de este grupo eran múltiplos de 10 (60 cromosomas tienen la trucha arco-iris o el salmón atlántico, 80 presentan la trucha común, el salvelino y la trucha de fuente y 100 los timalos). Esto, unido a las variaciones interespecíficas en el número de cromosomas con dos brazos y a la presencia de multivalentes en meiosis, llevó a Svardson a proponer que el número cromosómico básico en esta familia era $n=10$, y que los actuales cariotipos observados eran consecuencia de sucesivos fenómenos de poliploidía. Esta hipótesis fue invalidada cuando Rees (1964) demostró que el contenido en ADN y la longitud cromosómica total era similar en especies con distinto número cromosómico.

Ohno y sus colaboradores han propuesto otro modelo de poliploidía en el pasado biológico de los salmónidos (Ohno y col., 1968, 1969b; Ohno, 1970a,b, 1974). Ellos defienden que este grupo era de origen tetraploide si se compara con otros grupos relacionados de salmonoides y clupeidos fundamentalmente. Las pruebas en las que se basa la hipótesis de Ohno y colaboradores sobre la existencia de un proceso de tetraploidización ancestral en la evolución de los salmónidos son cuatro (Ohno, 1970b):

1) los salmónidos, que contienen, como mucho, un 80% del ADN celular de los mamíferos, poseen sin embargo dos veces más ADN por célula que los grupos de peces estrechamente relacionados,

2) también presentan los salmónidos, aproximadamente el doble número de brazos cromosómicos (NF o número fundamental) que el de la mayoría de los grupos relacionados,

3) se observan con frecuencia configuraciones multivalentes en preparaciones meióticas de bastantes especies salmoniformes,

4) en esta familia de peces existen gran número de genes duplicados.

Otras observaciones posteriores han demostrado la validez de la hipótesis de Ohno y colaboradores; concretamente las relacionadas con la presencia de multivalentes en meiosis (Ohno y col., 1965; Davisson y col., 1973; Gold y Gall, 1975; Lee y Wright, 1981), las observaciones de nuevos loci duplicados (Allendorf y col., 1975; Allendorf y Utter, 1976; Allendorf, 1978; Ferris y Whitt, 1980), la aparición de herencia tetrasómica en algunos de estos loci y la no existencia de divergencia génica en los mismos (May y col., 1982; Ferris y Whitt, 1980).

1.1.2.- Naturaleza de la poliploidía de salmónidos

Las cuatro razones citadas en el apartado anterior son indicativas asimismo del alto grado de homología existente entre los genomas implicados en el proceso de tetraploidización, lo cual estaría en consonancia con que dicho proceso fuese realmente de naturaleza autopoliploide, sin descartar la posibilidad de cierta tasa de aloploidía en el mismo.

Las posibles barreras que la tetraploidía presenta en especies animales no lo son realmente en el caso de los salmónidos. Una de ellas sería la aparición de sexos separados que continuaran la línea tetraploide. Sin embargo éste no es un problema si, como propusieron Schultz (1969) y Astaurov (1969), el establecimiento de la tetraploidía tuviese lugar en dos pasos: 1) el surgimiento de un línea unisexual triploide seguido de 2) la posterior fecundación de ésta con la diploide normal. Ambas etapas son perfectamente viables en los salmónidos. De hecho en algunas especies de esta familia ocurren fenómenos de no-reducción gamética con alta frecuencia (Thorgaard y Gall, 1979). Si los gametos no reducidos se produjeran en hembras triploides serían viables y podrían desarrollar cigotos partenogenéticos e incluso ginogenéticos (si son fecundados por esperma "inactivo"). De hecho, Melander y Montén (1950) han descrito un caso probable de reproducción partenogenética en *Coregonus*. Por otra parte, la hibridación interespecífica puede inhibir en ocasiones la segunda división meiótica en el huevo (Uyeno, 1972) y, por tanto, podría inducir poliploidía en salmónidos (Capanna y col., 1974) y otros peces (Vasilev y col., 1975; Marian y Krasznai, 1978; Beck y col., 1980). En la actualidad, ambos tipos de alteraciones, ginogénesis y triploidía,

se inducen artificialmente con relativa facilidad en varias especies de esta y otras familias. En resumen, tanto la hibridación como la unisexualidad podrían haber jugado un papel importante en el establecimiento del estado tetraploide en los salmónidos (Schultz, 1969, 1980).

La posibilidad de que la poliploidía pudiera alterar el determinismo cromosómico del sexo (Muller, 1925) no es aplicable a los salmónidos por cuanto los individuos XXXY serían machos fértiles y no intersexos estériles si se tiene en cuenta que, tal y como se ha observado en la trucha de lago, el determinismo sexual en esta especie es "Y-dominante" (Phillips y Ihssen, 1985). De hecho, Refstie (1981) logró inducir individuos tetraploides de esta misma especie tratando los huevos recién fecundados con citocalasina B, habiendo observado que los machos tetraploides son productores de esperma.

Los cambios en el tamaño celular provocados por la triploidía no son tolerados en los mamíferos debido a su complejidad histológica (White, 1973), lo cual hace que los individuos poliploides sean inviábiles (Niebuhr, 1974). Esto no sucede en los peces, grupo en el que se han observado multitud de casos de poliploides espontáneos, tanto en salmónidos (Cuellar y Uyeno, 1972; Grammeltvedt, 1974; Thorgaard y Gall, 1979) como en otros grupos (Morelli y col., 1983; Venere y Galetti, 1985).

1.1.3.- Evolución cromosómica en salmónidos

El ancestral diploide de los salmónidos debió tener entre 48 y 52 cromosomas, con predominio de los subtlococéntricos y telococéntricos ya que este es el cariotipo más común entre las especies piscícolas, encontrándose en taxones bastante separados (Ohno, 1974; Gold y col., 1981), algunos de ellos relacionados con los salmónidos (Sola y col., 1981). Por consiguiente, el ancestral tetraploide debió tener entre 96 y 102 cromosomas telococéntricos. De hecho, la mayoría de los salmónidos poseen un número de brazos alrededor de 100 y un cariotipo diploide comprendido entre 56 y 84 cromosomas (ver revisión de Hartley, 1987) por lo que la tendencia en este grupo, desde que tuvo lugar la duplicación del complemento diploide, ha sido la reducción en el número cromosómico, proceso este que se ha debido llevar a cabo mediante fusiones céntricas que permitan conservar el número fundamental. A pesar de ello, se encuentran dos excepciones en este

grupo, el salmón atlántico con 74 brazos cromosómicos y el timalo con 172, anomalías atribuibles a otras reordenaciones cromosómicas, inversiones pericéntricas y translocaciones desiguales, ocurridas en el genoma de tales especies (Norden, 1961; Hartley y Horne, 1984b). Dicho proceso de diploidización parece aún no haber finalizado como lo indica la existencia de genes duplicados con herencia tetrasómica.

Por otra parte, a nivel cromosómico, los salmónidos parecen haber divergido mucho más rápidamente que otros grupos de peces como lo demuestra, por ejemplo, la existencia en el género *Oncorhynchus* de números cromosómicos que varían entre 52 y 74 según las especies. El fenómeno contrario a esta amplia variación en el número cromosómico de los salmónidos, lo protagonizan otras familias también de origen tetraploide como son la familia Cyprinidae, donde la mayoría de las especies tienen complementos con 48-52 cromosomas, la familia Centrarchidae con 46 o 48 cromosomas y la familia Catostomidae en la que todas las especies tienen 96-100 cromosomas. Por tanto, el origen tetraploide por sí solo no puede asegurar la rápida divergencia cromosómica que ha tenido lugar y a la que hacíamos referencia anteriormente. Otras razones habría que buscarlas quizás en el aislamiento histórico de las poblaciones de salmónidos causado por las glaciaciones y otros eventos geológicos, así como en el peculiar comportamiento reproductivo que muestran las especies de este grupo (Behnke, 1972). Probablemente una combinación de los tres factores sea la que ha promovido esta rápida evolución cromosómica dentro de los salmónidos.

1.2.- Características citogenéticas de la trucha arco-iris y el salmón coho

La trucha arco-iris (*Salmo gairdneri* Rich.) presenta normalmente un cariotipo con $2n=60$ cromosomas y 104 brazos cromosómicos como número fundamental. Sin embargo, en prácticamente todos los estudios citogenéticos llevados a cabo en esta especie se ha detectado la existencia de variabilidad intra e interindividual ((Ohno y col., 1965; Ohno y col., 1969; Ohno, 1970b; Fukuoka, 1972; Kajdanova, 1974; Vasil'ev, 1975; Thorgaard, 1976, 1983; Hartely y Horne, 1982, 1984; Ueda, 1984, Bolla, 1987). Esta variabilidad abarca células e individuos con números cromosómicos que oscilan entre $2n=58$ y $2n=65$, si bien en todos los casos se mantiene el número fundamental. Excepcionalmente algún autor (Bolla, 1987) ha observado la presencia de células con número de brazos distinto de 104, y no lo ha atribuido

a errores relacionados con las técnicas.

La naturaleza de tales fenómenos de variabilidad cromosómica siempre ha estado ligada a la existencia de fusiones y fisiones robertsonianas relacionadas con el proceso de diploidización en el que se encuentra inmerso esta especie (ver apartados anteriores). Por otra parte, no está nada claro hasta qué punto se hereda y de qué manera lo hace tal fenómeno de variabilidad cromosómica presente en la trucha arco-iris. Para algunos autores (Ohno y col., 1965, Beçak y col., 1966) este polimorfismo estaría causado por reordenaciones cromosómicas post-cigóticas que por tanto aparecen *de novo* en cada individuo, mientras que para otros (Thorgaard, 1976; Ueda, 1984b) dicho fenómeno tendría un componente hereditario evidente. De la misma forma, tampoco está muy clara la posible relación entre ambos niveles de variabilidad cromosómica, de hecho apenas existen resultados sobre este aspecto en la bibliografía.

Por lo que respecta al cariotipo de esta especie se ha podido determinar que las zonas de heterocromatina constitutiva, puestas de manifiesto mediante bandeo C, se localizan principalmente en los centrómeros (Thorgaard, 1976; Hartley y Horne, 1984) y que éstas fluorescen positivamente con cromomicina A₃ (Phillips y Ihssen, 1985b; Mayr y col., 1986). Además, Lloyd y Thorgaard (1988) han podido comprobar recientemente que el patrón de bandas proporcionado por la digestión *in situ* mediante enzimas de restricción es bastante similar al propio bandeo C. El número de regiones organizadoras del nucleolo presentes en el complemento diploide es normalmente de dos (Phillips y Ihssen, 1985b; Mayr y col., 1986). Por último, la existencia de cromosomas sexuales en la trucha arco-iris es uno de los aspectos de la caracterización citogenética que más se discute en esta especie ya que si bien algunos autores como Thorgaard (1977, 1988) o Ueda (1984a) han señalado la existencia del par sexual como el único par subtelocéntrico del cariotipo que presenta heteromorfismo en los machos y no en las hembras, la mayoría de los investigadores en este campo no han observado dicha relación (p.e. Fukuoka, 1972; Hartley y Horne, 1982, 1984a; Mayr y col., 1986, 1988; Bolla, 1987).

En cambio, el cariotipo del salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) ha sido mucho menos estudiado desde el punto de vista citogenético, o al menos el número de trabajos al respecto es sensiblemente menor. En esta especie el número cromosómico

sómico citado es también $2n=60$ si bien aparecen ciertas discrepancias en el número de brazos; para Uyeno (1972) éste es de 106 mientras que para Ueda (1983) este es de 108. Pero en ningún caso, se han encontrado fenómenos de variabilidad cromosómica similar a la trucha arco-iris. En esta especie, los análisis citogenéticos llevados a cabo (Phillips y col., 1986a) tan sólo han determinado la presencia de dos regiones organizadoras del nucleolo situadas en los brazos cortos de sendos cromosomas subtelocéntricos, los cuales a su vez parecen tener tinción positiva con CMA_3 .

Por lo que se refiere a los individuos triploides inducidos artificialmente mediante choque térmico en ambas especies, son muy pocos los estudios citogenéticos que en ellos se han llevado cabo. Únicamente, el conteo cromosómico se ha utilizado para la determinación del nivel de ploidía (Thorgaard y col., 1981; Ueda, 1984b) y excepcionalmente se ha contado el número de nucleolos por célula como una estima del mismo parámetro (Phillips y col., 1986b).

1.3.- Manipulación cromosómica

Desde que a principios de este siglo, y tras el redescubrimiento de las leyes de Mendel, se comenzaron a aplicar los conceptos y principios derivados de la Genética a la mejora de animales y plantas, quedó claro que entre los métodos más prometedores figuraban los que en sentido amplio se pueden denominar "métodos de manipulación cromosómica".

Entre tales métodos hay que considerar la obtención artificial de individuos con dotaciones cromosómicas distintas de lo normal, si se considera "normal" a los diploides, con dos dosis cromosómicas, una heredada del padre y otra de la madre. Aquí se incluirían los organismos triploides, tetraploides y, en general, poliploides (con 3, 4 o n dotaciones cromosómicas).

Sin embargo, la utilización de estos métodos ha sido desigual según se trate de animales o plantas. Así, en el caso de la mejora vegetal, ha sido la poliploidía inducida artificialmente uno de los métodos más investigados. En pocos años se han creado varios cientos de combinaciones anfiploides de distintas especies con potenciales agronómicos (Riley y Kimber, 1966) así como gran variedad de aloploides artificiales, principalmente de cereales, mediante la utilización de un

agente poliploidizante como es la colchicina. Desde hace tiempo se sabe que el centeno autotetraploide compite en producción y calidad con los diploides originales (Müntzing, 1951) y lo mismo sucede con otras plantas en las que es el fruto el producto de interés, como la uva (Olmo, 1952; Dermen, 1954) o la sandía (Kihara, 1951; Stevenson, 1958). Estas últimas además, tienen la vallosa característica de no tener pepitas por el hecho de ser triploides. Otras especies se cultivan en su estado tetraploide por su valor forrajero y como materia prima para la obtención de subproductos. Tal es el caso de los tréboles, las coles o la remolacha azucarera (Akerberg y col., 1963; Olsson, 1963; Silván, 1966), sin olvidar las plantas ornamentales, susceptibles de ser mejoradas por poliploidía (Emsweller, 1948).

En el caso de la mejora genética animal, la aplicación de los métodos mencionados ha sido escasa. Sin embargo, en los últimos años se están comenzando a obtener de forma artificial, dentro del campo de los organismos acuáticos, animales triploides y tetraploides con idea de aprovechar las características favorables que presentan estos niveles cromosómicos. Asimismo, el reciente desarrollo de nuevas técnicas reproductivas ha permitido la obtención de especies piscícolas (carpa, trucha y salmón) únicamente a partir de óvulos (ginogenéticos) o bien a partir del material hereditario del espermatozoides solamente (androgenéticos). E incluso ha sido posible llevar a cabo prácticas de reversión del sexo e hibridación en tales organismos, originándose así los llamados "neomachos" o machos XX y los híbridos interespecíficos e intergenéricos respectivamente.

Entendida como un conjunto de técnicas que permiten cambiar el genoma completo de una célula, la manipulación cromosómica entronca claramente con las que en la actualidad se han denominado "nuevas tecnologías reproductivas". En este ámbito figuran todos aquellos organismos obtenidos tras la manipulación directa del conjunto de ADN contenido bien en una célula sexual (caso de los poliploides, de los animales "sin padre" o "sin madre" y de las hembras revertidas) o bien una célula somática (caso del clonaje de animales). Exceptuando la obtención de clónicos cuyo interés potencial en la mejora animal está aún sin dilucidar, las demás técnicas ofrecen claras perspectivas de aplicación para mejoradores y empresarios en general.

1.3.1.- Poliploidía, esterilidad y mejora

Aunque se han observado fenómenos de poliploidía de forma natural en poblaciones animales (Cuellar y Uyeno, 1972; Gold y Avise, 1976; Thorgaard y Gall, 1979; Morelli y col., 1983; Venere y Galetti, 1985), tal variación cromosómica numérica también puede ser inducida artificialmente, constituyendo los organismos acuáticos el soporte biológico donde esta manipulación ha alcanzado cotas superiores. Es más, si bien en ellos se han conseguido progenies tanto triploides como tetraploides, han sido las primeras las que, desde el punto de vista aplicado, mayor interés han despertado.

1.3.1.1. Métodos de inducción e identificación de poliploides

Tanto en peces, especialmente salmónidos, ciprínidos y pleuronectiformes, como en moluscos, la inducción de poliploidía se ha llevado a cabo mediante choques térmicos, choques de presión y tratamientos químicos diversos. Algunos de estos métodos actúan a nivel de las divisiones meióticas impidiendo la extrusión de uno de los corpúsculos polares, duplicando de esta forma la dotación cromosómica de uno de los gametos. Tras una fecundación normal aparece el nivel triploide en los organismos tratados. Otros sin embargo bloquean la primera división cigótica que tiene lugar tras la fecundación dando lugar al nivel tetraploide.

Aunque los choques térmicos próximos a los 0°C (choques fríos) han sido utilizados para la obtención de poblaciones triploides de salmónidos (Lincoln y col., 1974), dichos tratamientos no han demostrado ser suficientemente efectivos en lo referente al porcentaje de triploides inducido. No sucede lo mismo con los choques térmicos calientes, que tanto en el caso de peces como la trucha (ver p.e. Thorgaard y col., 1981; Chevassus y col., 1983; Lincoln y Scott, 1983; Solar y Donaldson, 1985), el salmón (ver p.e. Benfey y Sutterlin, 1984; Johnstone, 1985; Johnson y col., 1986), la carpa (ver p.e. Cherfas y col., 1981) o los peces planos (ver p.e. Purdom, 1972; Lincoln, 1981a) como en el de moluscos como la ostra japonesa (Quillet y Panelay, 1986), han aportado excelentes resultados tanto en lo que concierne a la eficacia del tratamiento como a la supervivencia de los descendientes.

En cuanto a los choques calientes, estos han sido aplicados en niveles superiores a los 26° C a ovocitos que previamente había sido fecundados e incubados en

un sistema adecuado. Tras el tratamiento se origina una descendencia en la que tanto la eficacia del método, medida en porcentaje de triploides inducido, como la supervivencia de la misma, depende de cuatro parámetros: condiciones de fertilización (proporción número de huevos/volumen de esperma, método, tiempo, etc.), intensidad del choque térmico, duración del mismo y tiempo de incubación (el que dista desde la fertilización hasta la aplicación del choque térmico).

Estimando correctamente los tres últimos parámetros y utilizando parentales de calidad, se han podido obtener descendencias de truchas, salmones y carpas compuestas por un 98% de individuos triploides ($3n$) donde la supervivencia se mantenía entre límites aceptables, del 50 al 80% aproximadamente, según los autores (Thorgaard y col., 1981; Lincoln y Bye, 1984; Solar y Donaldson, 1985).

En el caso de los moluscos como la ostra, la viera o la arola, los choques térmicos ofrecen menor efectividad (entre 25 y 60% de triploidía). En ellos, también la eficacia del tratamiento también depende de la temperatura de choque e igualmente, se mantiene la relación inversa existente entre ésta y la supervivencia no habiéndose obtenido con esta técnica porcentajes de triploides superiores al 45% (Quillet y Panelay, 1986). La baja eficacia de inducción ha hecho que en estos invertebrados sean los tratamientos con agentes químicos los más empleados, especialmente las disoluciones de citocalasina B con dimetilsulfóxido (DMSO), obteniéndose en este caso los porcentajes de triploidía cercanos al 85%. Tal es el caso de la ostra americana *Crassostrea virginica* (Stanley y col., 1981, 1984), la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* (Downing y Allen, 1987), la arola *Mya arenaria* (Allen y col., 1982) y la vieira *Argopecten irradians* (Tabarini, 1984). En moluscos además, es posible bloquear tanto la meiosis I como la meiosis II dependiendo del tiempo de incubación. Al igual que sucede con los choques térmicos, la efectividad y supervivencia de la descendencia en los tratamientos con citocalasina B u otros agentes químicos (colchicina, polietilenglicol, etc.) depende, además de la concentración de agente empleada, de factores análogos a los mencionados con anterioridad si bien parece ser la temperatura a la que transcurre el proceso es el parámetro más determinante.

En peces, los tratamientos químicos suelen originar una alta tasa de mosaicismo (Refstie y col., 1977; Allen y Stanley, 1979) lo cual no es nada deseable desde un

punto de vista comercial. No ocurre lo mismo con los choques de presión (uno de los primeros métodos empleados para inducir triploidía por el equipo del DR. Purdom en 1972) donde los ovocitos ya fecundados son sometidos a presiones, en bombas hidráulicas, comprendidas entre 400 y 480 atmósferas según las especies. El choque de presión puede actuar como agente inhibidor de la extrusión del segundo corpúsculo polar o impidiendo la primera división cigótica, dando lugar a progenies triploides en el primer caso o tetraploides en el segundo, dependiendo de si el choque se aplica temprana o tardíamente (0-40 minutos después de las 5 horas y 50 minutos respectivamente, y para el caso de la trucha arco-iris). En ambos casos se obtienen tasas de supervivencia realmente elevadas respecto al control (80-85%), lo cual supone una ventaja respecto al resto de técnicas empleadas.

Un método bastante eficaz para obtener poblaciones triploides de peces es el cruzamiento de hembras normales (diploides) con machos tetraploides obtenidos por supresión de la primera división mitótica mediante algunos de los tratamientos descritos anteriormente. Aunque la eficacia de este método es total en lo que se refiere al porcentaje de triploides inducido, sin embargo su interés depende en gran medida de la especie en cuestión, debido a los problemas que supone el disponer de un stock de tetraploides viables y fértiles, algo no siempre posible en todos los organismos. Esta técnica ya ha dado sus resultados en la trucha (Chourrout, 1984, 1986) e incluso se podría considerar como el único método para inducir triploidía en tilapia (*Tilapia aurea*) donde no es posible aplicar choques térmicos dada la dificultad de practicar inseminación artificial.

Para determinar la eficacia de los métodos de inducción de triploidía descritos y al objeto de conocer la composición de las poblaciones tratadas se han puesto a punto diversas técnicas que permiten conocer el nivel de ploidía presente en un organismo. Entre tales técnicas hay algunas basadas en estimas indirectas de este parámetro como son la determinación del volumen nuclear eritrocitario (Swarup, 1959b; Purdom, 1972; Valenti, 1975; Allen y Stanley, 1978, 1979; Lemoine y Smith, 1980; Beck y Biggers, 1983; Johnstone y Lincoln, 1986), el conteo del número de nucleolos por célula (Phillips y col., 1986), la electroforesis de proteínas (Liu y col., 1978; Magee y Phillips, 1982; Stanley, 1983) y los análisis morfológicos de características fenotípicas asociadas con los niveles $2n, 3n, etc.$ (Purdom, 1972; Allen y Stanley, 1982, 1983; Beck y Biggers, 1982).

Pero sin duda son los métodos directos los que ofrecen una información más exacta en torno a este punto. Concretamente, la determinación del número cromosómico en metafases mitóticas (ver p.e. Thorgaard y col.,1981; Ueda,1984b) y de la cantidad de ADN mediante densitometría (ver p.e. Gervai,1980; Johnstone,1985; Thorgaard y col.,1982; Allen y Stanley,1983; Utter y col.,1983; Tabarini,1984; Downing y Allen,1987) constituyen las técnicas comúnmente utilizadas tanto en peces como en moluscos. La segunda de ellas ofrece algunas ventajas adicionales como son la posibilidad de analizar un gran número de individuos en poco tiempo, el no depender de la cantidad y/o calidad de las metafases obtenidas y el no ser preciso el sacrificio del animal, si bien esto último puede ser evitado mediante el cultivo de linfocitos (Wolters,1981; Hartley y Horne,1985).

1.3.1.2. Aportaciones a la mejora

En general, la viabilidad de una progenie sometida a cualquier tipo de tratamiento triploidizante es significativamente menor que los controles establecidos (Lincoln y Scott,1983; Utter y col.,1983; Solar y Donaldson,1985), si bien en términos absolutos esto depende de la especie tratada y del estadio de desarrollo considerado. En salmónidos, dicho valor se mantiene por debajo hasta el momento de la eclosión, siendo similar al de los individuos $2n$ después de la misma y hasta la madurez sexual, etapa en la que incluso la supervivencia de los triploides supera a la de los diploides. De hecho, Lincoln y Bye (1984) encontraron una mayor supervivencia en triploides de trucha arco-iris a partir de una determinada edad. Otros autores han demostrado que la viabilidad de los triploides de algunas especies de peces es similar a la de los diploides tomados como control (Purdom y Lincoln,1973; Valenti,1975; Gervai y col.,1980). En los moluscos bivalvos, la viabilidad y supervivencia relativa de los triploides varía según el estadio que se considere (Quillet y Panelay,1986; Downing y Allen,1987). En cualquier caso, la presencia de organismos triploides de manera espontánea en las poblaciones naturales, unido a la relativa facilidad para obtenerlos artificialmente en distintas especies acuícolas, hace pensar que la viabilidad y supervivencia de los triploides se encuentra dentro de los límites permitidos desde un punto de vista adaptativo-selectivo.

De lo dicho hasta ahora se deduce que, de cara a la mejora animal, el interés de las técnicas de manipulación cromosómica dirigidas a la

Especial mención en lo que viabilidad y supervivencia se refiere merecen los híbridos de distintos géneros y especies de peces. En ellos la triploidía parece aumentar la viabilidad respecto a los híbridos diploides (Allen y Stanley, 1981; Chevassus y col., 1983; Scheerer y Thorgaard, 1983). Incluso este aspecto que es evidente en triploides inducidos artificialmente, se ve confirmado en híbridos triploides espontáneos de trucha arco-iris x trucha de fuente (Capanna y col., 1974) y de varias especies de carpa (Marian y Krasznai, 1978; Beck y col., 1980) viéndose además beneficiados por la menor frecuencia de malformaciones respecto a los híbridos diploides (Allen y Stanley, 1981, 1983; Beck y Biggers, 1982). Según Thorgaard (1983) esta mayor supervivencia de los híbridos interespecíficos triploides puede estar relacionada con el efecto amortiguador de la triploidía sobre las posibles incompatibilidades genéticas entre los complementos cromosómicos en ambas especies, pues la proporción de éstos ha pasado de ser 1:1 a 2:1.

Los efectos depresivos que los métodos de inducción de triploidía producen sobre la supervivencia en los primeros estadios de desarrollo sobre todo, suelen ser compensados con las ventajas que dicho estado triploide ofrece. No obstante, esto depende de cada especie; de hecho en el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) la triploidía parece ejercer un efecto negativo sobre la esmoltificación, proceso que conlleva grandes cambios fisiológicos que adaptan al animal a la vida marina, habiéndose observado que los salmones triploides de esta especie llegan a este estado "esmolt" en menor proporción que los diploides (Johnson y col., 1986). Además de este, pocos son los estudios existentes sobre las posibles consecuencias de la triploidía sobre características fisiológicas o bioquímicas de tales triploides, amén de que las anomalías en este sentido puedan estar causadas por una interacción del genotipo con el ambiente (cambios de los niveles de salinidad, osmorregulación, etc).

La primera consecuencia derivada de la triploidía es la esterilidad causada por el mal emparejamiento de los cromosomas homólogos durante la meiosis. Ello origina gametos mal formados, inviábiles o estériles en el caso de los machos o bien, ausencia de desarrollo ovárico normal en las hembras de peces y moluscos. No obstante, las manifestaciones del estado triploide varían considerablemente con la especie. De lo dicho hasta ahora se deduce que, de cara a la mejora animal, el interés de las técnicas de manipulación cromosómica dirigidas a la

obtención artificial de triploides reside en el control que la triploidía ejerce sobre la maduración sexual, especialmente en organismos acuáticos (Thorgaard, 1986). En las hembras $3n$ ésta parece estar completamente impedida, por lo que en especies como la trucha o el salmón no se desarrollan ovarios o si lo hacen éstos aparecen muy reducidos, con células confinadas en estado de paquitene. En la platija y otros peces planos, las hembras diploides maduras presentan gónadas de tamaño cuatro veces superior al de las triploides pudiéndose observar en éstas últimas algún que otro oocito mal formado (Wolters y col., 1982b; Lincoln, 1981b). En el caso de los machos, si bien tiene lugar el desarrollo gonadal, cuando el esperma es empleado para la fecundación, los embriones aneuploides resultantes pronto mueren. Al contrario que la mayoría de las especies de salmónidos y pleuronectiformes, los machos triploides de especies como la carpa (*Cyprinus carpio*) apenas muestran desarrollo gonadal durante la maduración (Gervai y col., 1980).

Pero además, la aplicación de tales técnicas es de sumo interés en las hembras de salmónidos, peces planos y especies afines y ello porque las hembras alcanzan la pubertad un año después que los machos por lo que no sufren las consecuencias negativas de la maduración sexual. Entre tales efectos negativos cabe citar la disminución de la tasa de crecimiento, el deterioro en la calidad de la carne y la alta mortalidad post-freza. De ahí que los esfuerzos de las grandes explotaciones piscícolas vayan dirigidos a la producción de poblaciones compuestas exclusivamente por hembras, especialmente en el caso de la trucha y el salmón.

La producción a gran escala de poblaciones todo-hembra es factible y de hecho ya se practica desde hace algunos años en las piscifactorías. El punto de partida es la obtención de individuos que, siendo genéticamente hembras XX, presenten fenotipo de macho XY. Son los llamados neomachos, machos XX o hembras revertidas, productoras de esperma normal. Una forma simple de obtener machos XX es mediante la administración oral de la hormona esteroídica 17-alfa-metiltestosterona durante los primeros meses de alevinaje (Solar y col., 1984; Bye y Lincoln, 1986). Tras este tratamiento, los cigotos que iban a desarrollarse como hembras revierten a machos fenotípicos distinguibles del resto porque, durante la maduración sexual, no son capaces de evacuar el esperma al exterior al carecer de conducto espermático. El semen de tales progenitores es ahora utilizado para fecundar huevos normales produciendo así una población todo-

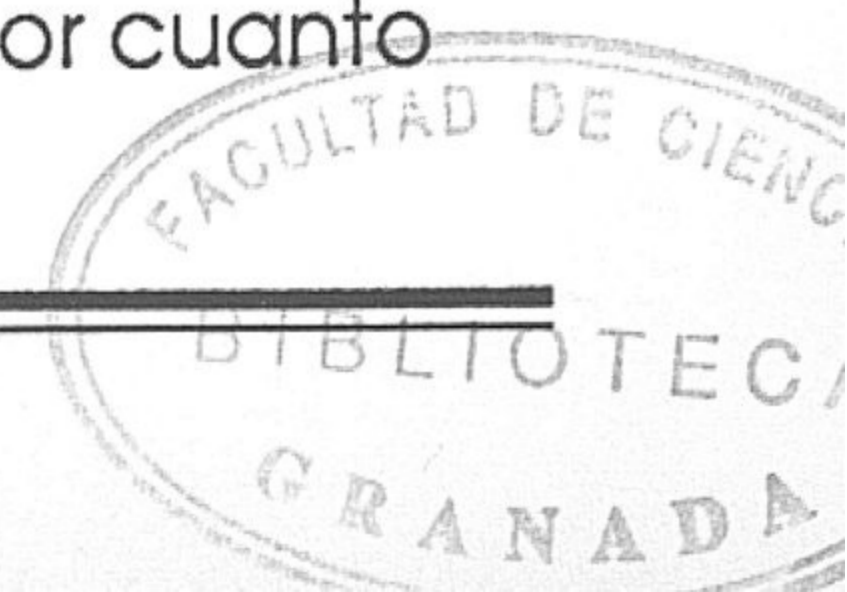
hembra (Lincoln y Scott, 1983). Tales huevos, una vez fertilizados, pueden ser sometidos a las técnicas de inducción de triploidía antes descritas lográndose así una población de hembras estériles las cuales mostrarán los efectos beneficiosos de ambas técnicas de manipulación cromosómica.

Tres ventajas ofrecen las poblaciones triploides todo-hembra, a saber, la posibilidad de producción clónica masiva de variedades favorables desde el punto de vista genético y comercial, la obtención de crecimientos más rápidos al desaparecer la competencia con los machos y la facilidad de estabular perfectamente las poblaciones al no existir los problemas derivados del stress sexual.

Pero quizás sean las consecuencias prácticas derivadas de la esterilidad de los triploides las que, desde una óptica comercial, presenten mayor interés. De los datos obtenidos en diversas especies de salmónidos así como en la carpa, tilapia y platija, se puede asegurar que la tasa de crecimiento de los triploides es superior a la de diploides, al menos a partir de una determinada edad, pudiendo alcanzar los primeros pesos hasta un 40% superiores a los segundos (Valenti, 1975; Wolters y col., 1982; Thorgaard, 1986). Adicionalmente, la esterilidad ofrece dos ventajas como son la ausencia de mortalidad post-freza y la mayor calidad de carne (la maduración sexual implica la total movilidad de las grasas y su destino hacia el desarrollo gonadal).

Por otra parte, la mayor heterocigosis presente en los triploides puede ser utilizada en los programas de mejora al haberse correlacionado dicha estima genética con una mayor estabilidad en el desarrollo, la cual a su vez viene determinada por una mayor simetría en determinados caracteres bilaterales presentes en las especies piscícolas (Leary y col., 1985). En los pelecípodos, cuando la triploidía es inducida mediante el bloqueo de la primera división meiótica en el oocito, la superior tasa de heterocigosis parece ser la causa directa del mayor crecimiento mostrado por los ejemplares triploides en relación con los diploides normales (Thorgaard, 1986). Además, la producción de ostras y almejas triploides amortiguaría los déficits de producción existentes en el mercado durante los meses de verano, época en la que tiene lugar la maduración sexual de estos seres y en la que es frecuente observar elevadas mortalidades, baja calidad de carne, sensibilidad manifiesta a agentes patógenos, etc.

En el caso de los peces, por último, los triploides podrían encontrar una excelente aplicación en los programas de repoblación de ríos y zonas marinas por cuanto



la esterilidad que la triploidía les confiere, haría de ellos una población neutra tanto desde el punto de vista reproductivo como ecológico. Tal práctica ya se ha llevado a cabo con éxito al introducir a las carpas triploides en los programas de control de la vegetación acuática (Watterdof y Anderson, 1986).

MATERIAL Y METODOS

ESTADÍSTICA

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS 17.0 para Windows. Se utilizó el método de prueba de hipótesis de Fisher para determinar la significancia de las diferencias entre los grupos de control y de intervención. El nivel de significancia se estableció en 0,05. Los resultados se expresaron como media y desviación estándar.

ESTADÍSTICA DE LA SERIE DE TIEMPO

Se utilizó el método de prueba de hipótesis de Fisher para determinar la significancia de las diferencias entre los grupos de control y de intervención. El nivel de significancia se estableció en 0,05. Los resultados se expresaron como media y desviación estándar.

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS 17.0 para Windows. Se utilizó el método de prueba de hipótesis de Fisher para determinar la significancia de las diferencias entre los grupos de control y de intervención. El nivel de significancia se estableció en 0,05. Los resultados se expresaron como media y desviación estándar.

Por lo tanto, se utilizó el método de prueba de hipótesis de Fisher para determinar la significancia de las diferencias entre los grupos de control y de intervención. El nivel de significancia se estableció en 0,05. Los resultados se expresaron como media y desviación estándar.

MATERIAL Y METODOS

2. MATERIAL Y METODOS

2.1.- Material biológico

Las especies objeto de estudio en este trabajo han sido Salmo gairdneri Richardson (trucha arco-iris) y Oncorhynchus kisutch L. (salmón coho). Ambas especies piscícolas fueron elegidas en base a su interés para la acuicultura española y a la disponibilidad de las mismas en instalaciones dedicadas a tal fin.

Tanto la trucha arco-iris como el salmón coho presentan el siguiente encuadre taxonómico (Vilsee y col., 1987):

- Clase OSTEICTIOS
- Subclase ACTINOPTERIGIOS
- Infraclasse TELEOSTEOS
- Orden SALMONIFORMES
- Familia SALMONIDAE

Los ejemplares analizados de trucha arco-iris procedían de dos piscifactorías, una situada en Benamahoma (Cádiz) perteneciente a la empresa Piscifactoría de Benamahoma, S.A, y la otra ubicada en la parroquia de Gerdiz en Orol (Lugo), propiedad de la empresa Marcultura, S.A. En la primera de dichas instalaciones, los ejemplares fueron importados, en estado de huevos embrionados, de Dinamarca en los años 1984 y 1985, mientras que las truchas gallegas eran parte de la descendencia de reproductores allí cultivados que, a su vez, procedían, en última instancia, de huevos importados de Estados Unidos entre los años 1979-1981.

Por lo que respecta al salmón coho, los individuos analizados pertenecían a los stocks que la empresa Marcultura, S.A posee en la piscifactoría de agua dulce de Orol (Lugo), así como en la instalación de agua semisalada de la Ría de Ortigueira (La Coruña). Tales ejemplares procedían, en último término, de huevos importados de Estados Unidos en 1984.

Los ejemplares de trucha arco-iris fueron obtenidos a partir de huevos de una hembra con la totalidad de los machos de un solo macho.

2.2.- Técnica de inducción de triploidía mediante choque térmico

Para las experiencias de inducción de triploidía se emplearon, en todos los casos, machos de dos años y hembras de tres años de edad, previamente seleccionados. El número de progenitores que intervino en cada experiencia, la época en que fue llevada a cabo y otros datos de interés se recogen en la Tabla I.

En cualquier experiencia diseñada para obtener artificialmente individuos triploides mediante choque térmico, especialmente en organismos acuáticos, se han de tener en cuenta tres factores importantes, a saber, el tiempo de incubación previo al choque, la duración del mismo y la intensidad, temperatura o nivel térmico empleado. En los experimentos recogidos en este trabajo se han mantenido constantes alguno de estos parámetros y variables otros, pero en general, la técnica de inducción de triploides en las dos especies tratadas, conlleva los siguientes pasos:

- 1) Desove de las hembras mediante masaje abdominal y recogida de los huevos en un recipiente de plástico desclorizado; el volumen total de huevos se reparte en tantos lotes como variables del parámetro se vayan a considerar.

- 2) Freza del macho, igualmente mediante masaje abdominal, y comprobación de la calidad del esperma mediante la determinación aproximada de la motilidad espermática del mismo (porcentaje de espermatozoides que se mueven activamente y en línea recta al contactar con un medio acuoso, solución salina o medio de inseminación, por ejemplo).

- 3) Fecundación de los lotes de huevos con un volumen similar de esperma para cada lote; este volumen aproximado fue de 1 ml. de esperma por cada 500 huevos. En la mayoría de las experiencias los huevos de dos o tres hembras se separaron en cuatro lotes aproximadamente iguales (control y tres variantes del parámetro a analizar) y se fecundaron con partes alícuotas de semen mixto de dos machos. En cambio, en otros casos, en concreto en el análisis del polimorfismo cromosómico presente en la trucha arco-iris, se fertilizó el volumen total de huevos de una hembra con la totalidad del esperma producido por un solo macho.

En el proceso de fecundación, y con el objeto de activar e incrementar la eficacia de dicho proceso, previamente a la freza del macho, se le añade al recipiente que contiene los huevos un diluyente de inseminación (Billard, 1977) en una proporción de 25-50 ml. por cada 500 huevos. La composición de este medio es la siguiente:

- ClNa 0.125 M
- Glicocola 0.05 M
- Tris 0.02 M

(ajustar preferiblemente a pH 9)

4) Traslado de los óvulos ya fecundados, y previamente lavados para eliminar el exceso de esperma, a un sistema de incubación en bateas adaptadas para tal fin. Este tiempo de incubación previo al choque térmico tiene lugar a la misma temperatura a la que transcurre todo el desarrollo embrionario hasta la eclosión, que a su vez fue la existente en cada momento en la instalación. Dicho periodo, en los experimentos donde no se analizó la incidencia del mismo en el proceso de inducción de triploidía, fue siempre de 10 minutos.

5) Inmersión de los huevos, con ayuda de cestillas adecuadas, en un baño termorregulado de agua a la temperatura deseada (nivel térmico). La empleada en las experiencias llevadas a cabo en trucha arco-iris y salmón coho osciló entre los 26 y $34 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ y la duración del shock térmico, cuando no era parámetro variable, fue siempre de 10 minutos.

6) Concluido este paso, los huevos se retornan a las pilas de incubación donde finalizarán el desarrollo embrionario hasta el momento de la eclosión.

Es de señalar que, dadas las características técnicas de la instalación de Orol (Lugo), la temperatura de incubación de los huevos, tanto anterior como posteriormente al choque térmico, no pudo ser constante como hubiese sido deseable, razón por la cual este periodo se desarrolló a la temperatura reinante en cada momento en el río de procedencia. Estos valores oscilaron, a lo largo de

los procesos de desarrollo gonadal de los reproductores, inducción de triploidía e incubación de los óvulos fertilizados, entre 4.5 y 13°C. Sin embargo esto no sucedió en la piscifactoría gaditana donde la temperatura del agua permaneció constante durante todo el año, si bien es verdad que a valores altos ($13.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$) para las prácticas de maduración sexual e incubación de huevos.

2.3.- Técnicas citogenéticas

2.3.1. *Obtención de preparaciones cromosómicas*

El presente trabajo ha sido realizado exclusivamente a partir de tejidos somáticos (branquias, riñón y sangre) y por tanto, utilizando como material citológico de análisis, preparaciones de cromosomas mitóticos. Para la obtención de éstas se han empleado tres técnicas diferentes, dos de ellas desarrolladas con anterioridad por otros autores y otra que, aunque con buenos resultados en mamíferos, ha sido modificada y adaptada por nosotros para su aplicación en peces. Dichas técnicas son:

- preparaciones cromosómicas a partir de tejido sólido
- preparaciones cromosómicas a partir de animales pretratados con levaduras y colchicinados *in vivo*
- preparaciones cromosómicas a partir de cultivos de linfocitos

2.3.1.1. Preparaciones cromosómicas a partir de tejido sólido

Esta técnica es la descrita para peces por Kligerman y Bloom (1977) tomando como base las reseñadas con anterioridad por otros autores en distintos organismos (Meredith, 1969; Evans y col., 1972; Stock y col., 1972) si bien todas ellas tienen de común el empleo de trozos de tejido fijado como material de partida.

Los tejidos analizados con esta técnica han sido riñón y branquias principalmente, y el proceso seguido ha sido el siguiente:

1) El animal se mantiene nadando durante 8-10 horas en un recipiente bien aireado que contenga una solución de colchicina 0.01-0.02 %, o bien, si es de un tamaño adecuado, se le inyecta intraperitonealmente dicha solución a razón de 0.1 ml/gr. de peso fresco.

2) Se sacrifica el animal y se extraen los tejidos objeto de estudio (branquias y riñón), los cuales se disponen en una cápsula de Petri que contenga CIK al 0.4%.

3) Para que tenga lugar el choque hipotónico, el tejido se trocea en pequeños fragmentos (0.2-0.5 cm) que se sitúan en un recipiente que contenga un volumen de CIK 0.4% diez o quince veces superior al volumen tisular. La duración del choque hipotónico debe ser de 30-45 minutos.

4) Posteriormente se elimina la solución hipotónica y se procede a la fijación del material añadiendo fijador Carnoy (etanol absoluto:ácido acético en proporciones 3:1). Esta operación debe durar unos 30 minutos y ser repetida con dos cambios adicionales de fijador.

Los trozos de tejido así dispuestos, pueden ser almacenados a 4°C hasta el momento de su estudio. A partir de ellos, el proceso a seguir para la obtención de preparaciones de cromosomas mitóticos es el siguiente:

5) Eliminar totalmente el fijador (incluso con la ayuda de un papel de filtro) y situar cada uno de los fragmentos en el fondo cónico de un tubo o en un portaobjetos excavado al que previamente se le han añadido 30-50 ul., dependiendo del tamaño del fragmento, de ácido acético 50-70%.

6) Con una micropipeta, agitar el material junto con el acético varias veces hasta formar una suspensión celular de aspecto lechoso. Este paso no se debe prolongar más de 1 ó 2 minutos trascurridos los cuales, los restos sólidos, si los hubiere, son devueltos al frasco de fijación.

7) Inmediatamente y haciendo uso de la misma micropipeta, se deposita una gota de 0.5-1 cm. de diámetro, sobre un portaobjetos previamente calentado a 50-60°C. La misma gota se vuelve a retomar de forma rápida quedando así un alo de células alrededor de una densa aglomeración de las mismas. Esta

operación se repite varias veces mientras la superficie del portaobjetos lo permita.

8) Una vez secas, las extensiones se tiñen con Giemsa 10% en tampón fosfato pH 6.8, durante 5 minutos, se lavan con agua destilada y se dejan secar al aire.

El método descrito es susceptible de modificaciones en alguno de sus apartados si bien hemos comprobado que temperaturas superiores a 60°C y/o concentraciones de ácido acético superiores al 70% alteran la morfología de los cromosomas y la extensión ("spreading") de los mismos en la placa metafásica, aunque el número de metafases parece aumentar. Contrariamente, la extensión de los cromosomas y de las metafases ("scattering") pueden ser mejoradas aumentando bien el tamaño de la gota de suspensión o bien el tiempo de permanencia del tejido en acético si bien este último no debe ser excesivo.

Cabe mencionar que esta técnica ha sido aplicada en la presente memoria para la determinación rápida del nivel de poliploidía y, sobre todo, para el estudio de la herencia y transmisión del polimorfismo cromosómico existente en la trucha arco-iris. En ambos tipos de análisis, los ejemplares de salmón y trucha fueron de pequeño tamaño (1-2 cm.), incluso a veces, embriones extraídos del huevo.

2.3.1.2. Preparaciones cromosómicas a partir de animales pretratados con levaduras y colchicinados *in vivo*

En principio, las extensiones de cromosomas mitóticos obtenidas a partir fundamentalmente del riñón, procedían de animales colchicinados 6-7 horas antes de su sacrificio siguiendo el protocolo descrito por Hsu y Patton (1969). Sin embargo, pronto nos dimos cuenta de los excelentes resultados que aportaba el pretratamiento de los animales con una solución de levaduras, mejorando de esta forma la extensión de los cromosomas, de las metafases, así como el número de células en estado de metafase por cada mil células contadas. Esta técnica, que supone una adaptación para peces de las ya desarrolladas en anfibios y reptiles por Cole y Leavens (1971) y en mamíferos por Lee y Elder (1980), ha sido puesta a punto en nuestro laboratorio y básicamente consiste en lo siguiente:

I) Pretratamiento con levaduras

1) Preparar una solución de levaduras mezclando 7 gr. de D-glucosa y 3.5 gr. de levadura seca y granulada (*Saccharomyces cerevisiae*) en 25 ml. de agua destilada calentada a 40°C.

2) Incubar dicha solución a 40°C en baño termorregulado de agua o en estufa hasta que la solución parezca efervescente, señal de que las levaduras están activas.

3) Inyectar intraperitonealmente 2 dosis de 1 ml. de esta solución por cada 100 gr. de peso del pez teniendo la precaución de no lastimar excesivamente al animal que, una vez acabada la operación, debe ser mantenido en un medio con buena aireación. El tiempo distante entre cada dosis debe ser de 24 horas aproximadamente.

II) Preparación de la suspensión celular

1) 24 horas después de administrar la 2ª dosis de levaduras, inyectar intraperitonealmente una solución de colchicina 0.02% en solución salina de ClNa 0.9%. La cantidad adecuada es de 0.75 ml./100 gr. de peso fresco.

2) Mantener el animal en óptimas condiciones de oxigenación durante 6-7 horas y posteriormente sacrificar y extraer varios trozos pequeños (0.2-0.3 cm.) de la región anterior del riñón y/o del bazo.

3) Disponer tales trozos en un recipiente que contenga abundante cantidad de ClK 0.4% (al menos diez o quince veces el volumen de tejido extraído) donde iniciar el choque hipotónico. Macerar el material junto con la solución hipotónica de ClK 0.4% en un homogenizador de tejidos, y dejar reposar durante algunos segundos.

4) Con una pipeta Pasteur tomar el sobrenadante conteniendo la suspensión celular y pasarlo a un tubo de centrífuga con fondo cónico al que se le vuelve a añadir ClK hasta completar 10 ml. El choque hipotónico debe realizarse a temperatura ambiente durante 30-60 minutos.

5) Transcurrido este tiempo se realiza una prefijación para evitar la aglutinación y consiguiente formación de grumos durante la centrifugación, añadiendo 3 ó 4 gotas de fijador Carnoy modificado (metanol absoluto:ácido acético en proporción 3:1). Seguidamente se centrifuga a 1000 r.p.m durante 10 minutos.

6) A continuación se elimina el sobrenadante, se resuspende el sedimento y se procede a la fijación del mismo. Esta se realiza con alcohol metílico absoluto:ácido acético 3:1 y de forma cuidadosa, procurando que el fijador se deslice lentamente por las paredes del tubo de centrífuga (en posición inclinada). La fijación debe prolongarse durante un mínimo de 45 minutos a 4°C.

7) Nuevamente se mezcla bien la suspensión celular y se centrifuga a 1000 r.p.m durante 10 minutos, pasados los cuales se decanta el sobrenadante y se añade fijador fresco. Este paso se repite por 3ª y última vez.

8) Tras la última centrifugación se elimina el sobrenadante y se resuspende el material en el fijador residual. Se añaden 1 ó 2 ml. de fijador fresco, según el volumen de sedimento del que se disponga, y se mezcla bien con una pipeta Pasteur quedando así la suspensión celular lista para hacer las extensiones.

III) Obtención de las extensiones

Un paso previo a la obtención de las preparaciones citológicas ha sido el tratamiento específico que se le ha dado a los portaobjetos, ya que las mejores extensiones las hemos obtenido sobre portaobjetos húmedos y fríos. Para ello, se lavaron y desengrasaron con un detergente biológico adecuado (Liqui-Nox) y se dejaron enjuagar bajo el agua del grifo durante 40-60 minutos. A continuación se efectuaron dos cambios con agua destilada y se mantuvieron en ella a 4°C durante varias horas antes de hacer las extensiones.

Una vez que se dispone de la suspensión celular, los portaobjetos así preparados se sacaron del recipiente con agua destilada, se escurrieron y dispusieron sobre un papel de filtro y soporte plano. Desde cierta altura (un metro aproximadamente) se hicieron caer de 3 a 5 gotas de la suspensión a cada portaobjetos y éstos se dejaron secar al aire.

Una vez hecha la primera extensión se comprueba que tanto la densidad celular como la extensión de los cromosomas sean las adecuadas para que, en caso contrario, éstas puedan ser corregidas al hacer las siguientes preparaciones microscópicas. Tal corrección se puede llevar a cabo bien diluyendo o concentrando la suspensión celular (añadiendo más fijador o incrementando el número de gotas en cada porta) o bien dejando caer las gotas desde mayor o menor altura.

2.3.1.3. Preparaciones cromosómicas a partir de cultivos de linfocitos

Esta técnica ha sido aplicada en aquellos casos en los que interesaba mantener vivo el animal para ulteriores análisis o para obtener preparaciones de múltiples individuos a las que aplicar los distintos métodos de marcado cromosómico. Las técnicas de cultivo de linfocitos a corto plazo comenzaron a ser puestas a punto en peces en la década de los 70 (Heckman y col., 1971; Grammeltvedt, 1974, 1975; Etlinger y col., 1976; Thorgaard, 1976) si bien su utilidad desde el punto de vista citogenético ha sido especialmente manifiesta a lo largo de los años 80 (Blaxhall, 1983a, 1983b, 1985; Al-Sabti, 1985; Hartley y Horne, 1983, 1985; Lloyd y Thorgaard, 1988).

En nuestro estudio hemos aplicado fundamentalmente dos de estas técnicas, las cuales a su vez se diferencian esencialmente en la forma de separar los linfocitos (fracción blanca) del resto de componentes sanguíneos. A continuación se describen detalladamente ambas técnicas.

1) Extracción de sangre

En ambos casos, la extracción de sangre sigue el mismo proceso, a saber:

- 1) Anestesiarse el animal con una dilución 1/15000 de MS-222 (ácido metasulfónico, marca Sandoz) durante 1-3 minutos. Enjuagar con agua limpia el pez para eliminar los restos de anestesia y desinfectar, con alcohol al 70% o armil 1/1000, la zona donde va a pinchar la aguja (generalmente la zona ventral próxima al poro genital o la parte posterior de la línea media).

2) Extraer 2-3 ml. de sangre de la vena caudal mediante succión con una jeringa estéril heparinizada (0.1-0.3 ml. de heparina, marca Analema) y traspasarla a un tubo de cultivo previamente heparinizado o a un Vacutainer (marca Becton-Dickinson).

3) Mantener los frascos con la sangre en un ambiente fresco (nevera o recipiente con hielo) hasta el momento del procesado de ésta, y retornar el animal al medio natural e incluso ayudar a su pronta recuperación.

II) Separación de linfocitos y preparación del cultivo

Como ya se ha mencionado, para dicho proceso hemos seguido dos procedimientos distintos. El primero de ellos, aunque con algunas modificaciones, fue descrito inicialmente por Etlinger y col. (1976) y readaptado por Thorgaard (1976), y el segundo corresponde al desarrollado, tras muchos y variados cambios, por Blaxhall (1985).

METODO 1.

1) Mezclar la sangre extraída con solución salina de Hank en proporción 1:1 para, de esta forma, controlar el grado de agregación de los eritrocitos y facilitar su sedimentación.

2) Centrifugar dos veces la sangre diluida a 40 x g durante 5 minutos a 4°C y extraer, en cada centrifugado, el plasma rico en linfocitos (fracción superior), procurando evitar la contaminación con los eritrocitos del fondo. En las dos extracciones, el plasma se pasa a un tubo estéril que contenga 1 ml. de medio 199.

3) Después se centrifuga durante 10 minutos este plasma rico en linfocitos a 100 x g y a 8°C, y se elimina el suero. Este paso es esencial por cuanto hemos comprobado que el suero autólogo actúa como inhibidor de la mitogénesis linfocitaria.

4) Las células se resuspenden y se lavan con 4 ml. de Hank en dos ocasiones, centrifugando a 100 x g, a 8°C durante 10 minutos cada una de ellas.

5) El sedimento obtenido se resuspende en 1 ml. de medio 199, quedando así en condiciones de ser cultivado.

METODO 2.

1) Se mezcla 1 ml. de sangre con 4 ml. de solución salina de Hank y se deposita suave y lentamente sobre 4 ml. de Ficoll o medio de separación de linfocitos (marca Flow) en un tubo estéril de fondo redondeado.

2) A continuación se centrifuga a 900 x g durante 45 minutos a 4°C y se extrae la fracción rica en linfocitos situada en la interfase entre el plasma y el Ficoll.

3) Dicha fracción blanca se lava centrifugándola, junto con 5 ml. de sales de Hank, a 100 x g durante 10 minutos, a 8°C.

4) El sedimento obtenido se resuspende con 0.5 ml de medio 199 quedando de esta forma listo para ser cultivado.
El cultivo de linfocitos se lleva cabo en Medio 199 (modificado, marca Flow) suplementado, y a una concentración de 2 ml. de inóculo por cada 3 ml. de medio enriquecido. Esta concentración es la que hemos comprobado suele ser la óptima para el adecuado crecimiento de los linfocitos.
Por lo que concierne a la composición del medio de cultivo empleado, ésta ha sido la siguiente:

- 5) Tras la última centrifugación se añade 0.2-1 ml. de fijador fresco, dependiendo de:
- 100% medio 199 (modificado: con sales de Hank, 0.35 gr/l de bicarbonato sódico y sin glutamina)
 - 25% Suero bovino fetal (marca Difco)
 - 2% Fitoheмоaglutinina (PHA-P, marca Difco)
 - 1% L-Glutamina (marca Flow)
 - 2.4% Penicilina + Estreptomicina (marca Flow)

6) Las extensiones de igual forma son tratadas con alguno de los métodos de bandeo cromosómico que se describirán a continua-

Una vez hechos los cultivos, se dejaron crecer en condiciones de oscuridad durante 5-6 días, a una temperatura constante de 20°C. Diariamente eran agitados y oxigenados dentro de la cámara de flujo laminar.

Aunque es obvio, cabe señalar que todos los pasos que incluye esta técnica de obtención de cromosomas mitóticos deben ser realizados en absolutas condiciones de esterilidad para prevenir posibles contaminaciones que dificulten el crecimiento celular.

III) Procesado de los cultivos y obtención de las preparaciones cromosómicas

1) Al quinto o sexto día (según el ritmo de crecimiento) se añaden 6 gotas de una solución de colchicina en Hank al 0.4% (correspondiente a una concentración final en el cultivo de 0.02 mgr/ml).

2) Pasadas 4-5 horas se centrifuga el cultivo a 1000 r.p.m durante 10 minutos a temperatura ambiente.

3) El choque hipotónico tiene lugar tras añadir al sedimento, previamente resuspendido, 5 ml de CIK 0.075 M y prolongar este choque durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifuga a 1000 r.p.m durante 10 minutos y se vuelven a resuspender las células.

4) Posteriormente se fija el material con fijador Carnoy modificado (3 metanol:1 ácido acético) durante 30 minutos a 4 °C. Transcurrido este tiempo se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones y se efectúan dos cambios más de fijador, esta vez consecutivos.

5) Tras la última centrifugación se añade 0.2-1 ml. de fijador fresco, dependiendo del volumen de sedimento, se resuspende bien el material y se hacen las extensiones de igual forma a la descrita en el apartado 3.2, con la única diferencia de que sólo se deposita una gota de suspensión celular en cada portaobjetos.

6) Las extensiones se dejan secar al aire y seguidamente son tratadas con alguno de los métodos de bandeado cromosómico que se describirán a continua-

ción.

2.3.2. Técnica de bandeo C

En la mayoría de las especies animales analizadas citogenéticamente mediante bandeo C, se ha empleado la técnica desarrollada por Sumner en 1972. Si bien nosotros comenzamos aplicando dicho método, pudimos comprobar que había otro más resolutivo en nuestro material de estudio, el descrito recientemente por Schwarzacher y col. (1980). Esta técnica, que fue inicialmente puesta a punto en especies vegetales, ha demostrado, a partir de nuestros datos, su completa utilidad en estudios citogenéticos de especies animales. El protocolo de la misma consta de los siguientes pasos:

1) Tratamiento de las extensiones con ácido acético 45% a 60°C durante 10-20 minutos.

2) Lavar con agua del grifo y enjuagar con agua destilada.

3) Sumergir las preparaciones en una solución saturada de hidróxido de bario a temperatura ambiente durante 5-15 minutos. Para ello disolver 6.3 gr. de $Ba(OH)_2 \cdot 8 H_2O$ en 100 ml. de agua destilada previamente calentada a 80-90°C.

4) Lavar con abundante agua del grifo y terminar con varios aclarados en agua destilada.

5) Incubar de nuevo los portaobjetos en solución salina citrato (2xSSC) a 60°C durante 1-2 horas.

6) Lavar con agua del grifo y finalmente con varios cambios de agua destilada.

7) Teñir con Giemsa (marca Merck) al 10% en tampón fosfato pH 6.8 durante 5 minutos, lavar con agua destilada y dejar secar.

Suele dar buen resultado, después del tratamiento con hidróxido de bario, sumergir las preparaciones en un coplin que contenga agua destilada junto con

2 ó 3 gotas de CIH 1N; se consigue así eliminar los restos de hidróxido que pudiesen quedar adheridos al portaobjetos. Por otra parte, cuando tras aplicar la técnica, las bandas heterocromáticas no se observan con suficiente nitidez, se pueden desteñir las preparaciones con fijador Carnoy seguido de alcohol etílico absoluto, y ser tratadas de nuevo bien como hemos descrito o bien únicamente con 2xSSC durante 15-30 minutos más.

2.3.3. Técnica de impregnación argéntica

Por la rapidez en su ejecución y los excelentes resultados que aporta, la técnica descrita por Howell y Black (1980) ha sido la empleada en este trabajo para la tinción de las regiones organizadoras del nucleolo (NOR). Ello requiere de la confección previa de dos soluciones cuyos componentes son:

Solución A: 2 gr. de gelatina en polvo en 100 ml. de agua destilada y 1 ml. de ácido fórmico puro

Solución B: nitrato de plata (NO_3Ag) en agua destilada en proporción peso/volumen 1:2

Una vez que se dispone de las soluciones, sencillamente la técnica consiste en mezclar, sobre la extensión celular previamente calentada a 70°C , una gota de la solución A y dos gotas de la solución B, cubrir con un cubreobjetos y mantener durante 2 minutos aproximadamente sobre la placa caliente. Este tiempo es el que tarda más o menos la preparación en tomar un color de oro viejo. A continuación se lava con agua destilada y se deja secar al aire.

2.3.4. Técnicas de fluorescencia

Desde que comenzaron a utilizarse fluorocromos como agentes de tinción diferencial en las técnicas de bandeo cromosómico, se pudo comprobar cómo las observaciones que de ellas se desprendían mejoraban sensiblemente cuando tales compuestos no se empleaban de forma aislada sino en combinación con otras sustancias, antibióticos principalmente, que, pudiendo ser o no fluorescentes, sí que actuaban como agentes de contratinción, resaltando y definiendo mejor los patrones de bandeo con fluorescencia.

En este sentido, dos técnicas han sido las empleadas en la mayoría de las ocasiones por ser las que mejores resultados aportaban, si bien otras combinaciones fluorescentes como la tri-tinción también han sido probadas.

2.3.4.1. Tinción con cromomicina A₃ (CMA) y contratinción con distamicina A (DA)

Este método de tinción fluorescente fue descrito y modificado por Schweizer (1976,1979) y su utilidad radica por una parte, en la afinidad de la cromomicina por las regiones cromosómicas ricas en pares de bases citosina/guanina, y por otra, en el realce que de tales zonas ofrece el tratamiento con distamicina.

a) Tampones y soluciones stock

* Tampón McIlvaine pH 7-7.5 el cual a su vez, está compuesto de dos soluciones:

- Solución A: ácido cítrico 0.1 M (21.01 gr. de ácido cítrico monohidratado por litro de agua destilada)

- Solución B: PO₄HNa₂ 0.2 M (35.6 gr. de PO₄HNa₂.2H₂O por litro de agua destilada)

Para conseguir una dilución a pH 7 se mezclan 18 ml de la solución A y 82 ml. de la solución B.

* Solución stock de Cl₂Mg 1 M (20.33 gr. de Cl₂Mg.6H₂O por litro de agua destilada).

* Tampón de montaje de las preparaciones compuesto por una mezcla de glicerol (Merck, específico "para microscopía de fluorescencia") y tampón McIlvaine pH 7 en proporción 1:1. El tampón debe contener Cl₂Mg 5mM hasta alcanzar una concentración final de magnesio en la mezcla de 2.5 mM.

b) Soluciones de tinción

* CMA₃ (Serva): 0.5 mgr/ml de tampón McIlvaine pH 7 (diluido este último en agua desionizada en proporción 1:1 y conteniendo Cl₂Mg 5 mM). El tampón se debe añadir al antibiótico de forma suave, procurando no agitar y que la disolución se produzca lentamente durante toda la noche. Esta solución puede ser almacenada en el frigorífico durante meses siempre y cuando no se contamine.

* DA (Sigma): 0.05-0.1 mgr/ml de tampón McIlvaine pH 7. Esta disolución se debe hacer justo antes de usar si bien puede ser almacenada en congelador durante algún tiempo (a 4°C sólo es estable 1-3 días).

c) Método de tinción

1) Añadir varias gotas de CMA a la preparación cromosómica, cubrir con un cubreobjetos e incubar a temperatura ambiente durante 1-2 horas en la oscuridad.

2) Quitar el cubre, lavar brevemente con agua destilada y secar con ayuda de un enema de caucho.

3) Cubrir de nuevo la extensión con varias gotas de DA y un cubreobjetos e incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 15-20 minutos.

4) Separar el cubreobjetos lavando con agua destilada y secar rápidamente.

5) Montar la preparación con el tampón mencionado compuesto de glicerol y McIlvaine (1:1).

6) Esperar un día antes de observar al microscopio, tiempo durante el cual la preparación debe mantenerse en una estufa a 37°C y en oscuridad.

2.3.4.2. Tinción con DAPI y contratinción con actinomicina D (AMD)

Esta técnica, también descrita por Schweizer (1976), permite la localización de regiones de ADN ricas en pares de bases adenina/timina y, aunque puede llevarse a cabo usando la distamicina como contratinción (Schweizer, 1980), sin

embargo en nuestro material parece dar mejores resultados la que a continuación se describe:

a) Tampones y soluciones stock

- * Tampón McIlvaine ácido cítrico/ PO_4HNa_2 pH 7-7.5
- * Solución stock de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 1 M ajustada a pH 7 con NaOH
- * Solución stock de EDTA 0.5 M a pH 7
- * Solución de fosfato sódico 10 mM y EDTA 1 mM
- * Solución stock de DAPI (Serva): 0.2 mgr/ml de agua bdestilada

b) Soluciones de tinción

* Solución de DAPI (Serva): 0.6 ugr/ml disueltos en tampón McIlvaine pH 7. Esta solución se debe preparar a partir de la solución stock inmediatamente antes de utilizar.

* Solución de AMD (Sigma): 0.2-0.3 mgr/ml en tampón sodio-fosfato 10 mM pH 7 con EDTA 1mM.

c) Método de tinción

1) Poner varias gotas de la solución de tinción de DAPI sobre la extensión cromosómica, cubrir con un cubreobjetos e incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 20-30 minutos.

2) Eliminar el cubre lavando suavemente con agua destilada o desionizada y secar el portaobjetos con un enema de caucho.

3) Cubrir ahora la preparación con unas gotas de AMD y un cubreobjetos y teñir 15-20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

4) Quitar el cubreobjetos, lavar con agua destilada y secar rápidamente.

5) Añadir 1 ó 2 gotas de tampón de montaje y observar al microscopio.

2.3.4.3. Algunas notas de interés

- Las soluciones de tinción de los fluorocromos se emplearon siempre, sin ningún tipo de pretratamiento, directamente sobre las preparaciones cromosómicas algo envejecidas (4 a 10 días).

- Antes de teñir con un fluorocromo determinado, la solución de tinción de éste se debe mantener 15-20 minutos a temperatura ambiente.

- En ocasiones ha sido de gran utilidad mantener las preparaciones teñidas en la estufa a 37°C, sin ser analizadas, durante 2-3 días pues es esta forma la indicada para evitar la pérdida de fluorescencia ('fading') y para estabilizar la tinción (Schweizer, 1980).

- La observación de las extensiones se llevó a cabo en un microscopio Zeiss Universal dotado con un equipo de fluorescencia que poseía las combinaciones de filtros que figuran en la Tabla II.

2.3.5. Bando cromosómico mediante *digestion in situ* con endonucleasas de restricción

En general, esta técnica la hemos aplicado en preparaciones de cromosomas mitóticos obtenidas mediante cultivo de linfocitos, siempre y cuando éstas fuesen recientes (no más de tres días de envejecimiento).

El protocolo que a continuación se describe es similar a los descritos por otros autores en diferentes especies (Miller y col., 1983; Mezzanotte y col., 1983; Bianchi y col., 1984; Schmid y G.de Almeida, 1988; Lloyd y Thorgaard, 1988) si bien presente algunas diferencias. Las endonucleasas ensayadas y las concentraciones empleadas en este métodos así como las secuencias diana de cada una de ellas y la marca utilizada figuran en la Tabla III.

1) El primer paso es la confección de la solución de enzima en su tampón adecuado. Este último suele ser específico para cada endonucleasa y, o bien es suministrado junto a ésta o bien se indica la composición del mismo. En cualquier caso, la concentración final de enzima en la solución empleada ha sido diferente

dependiendo de la actividad enzimática necesaria para la digestión de cromosomas fijados, habiendo oscilado dicha concentración entre 0.5 y 2 unidades/ul.

2) Una vez que se dispone de la solución de ensayo con el enzima, se depositan 30 ul. de la misma sobre la preparación y se cubre con un cubre objetos para asegurar la extensión de la restrictasa.

3) La preparación se incuba a 37°C en cámara húmeda durante 12-16 horas, transcurridas las cuales, se lava con agua destilada y se tiñe con Giemsa al 10% en tampón fosfato pH 6.8 durante 5-10 minutos.

4) Con objeto de comprobar la eficacia de la actividad endonucleásica, se trata una preparación distinta pero del mismo individuo, con un volumen equivalente de tampón apropiado carente de enzima y este control se incuba en las mismas condiciones.

En ocasiones aparece un patrón inespecífico de bandeo en las extensiones control. Ello es debido, según Bianchi y col., (1984), a la acción del glicerol, componente importante de los tampones. En estos casos se ha de analizar el patrón de bandeo originado por la digestión enzimática y actuar en consecuencia (aumentando la concentración de enzima si ambos patrones son similares).

2.3.6. Bandedo secuencial de preparaciones cromosómicas

2.4.- Técnicas histológicas

Algunos análisis incluidos en la presente memoria, especialmente los relacionados con la caracterización citogenética de la heterocromatina y de las regiones organizadoras del nucleolo, han requerido la aplicación de varias de las técnicas antes mencionadas de forma secuencial. En concreto, se han llevado a cabo análisis que precisaban de las siguientes combinaciones:

Por ello se ha utilizado el método descrito por...

siguiente * Tinción de las NOR - Tinción CMA-DA

* Tinción CMA/DA - Tinción DAPI/AMD

1) Una * Digestión con enzimas de restricción - Tinción CMA/DA - Tinción de las NOR

solución de Bouin (ácido pícrico al 1.2 % en agua 70 ml, ácido fólico 0.5 ml, ácido

Para aplicar una técnica, se ha hecho necesario desteñir las preparaciones

sometidas a técnicas anteriores. Los pasos seguidos en este sentido y en cada una de las técnicas se describen a continuación.

1) Para desteñir las preparaciones coloreadas con Glemsa basta sumergir éstas en fijador Carnoy durante varios minutos, hasta que desaparezca totalmente el colorante, y posteriormente rehidratar con etanol absoluto durante 2-3 minutos.

2) Para eliminar la tinción con nitrato de plata se ha seguido el método empleado por Jiménez y col. (1988) consistente en tratar las extensiones con una disolución compuesta por 0.4% de dicromato potásico, 10% de ClH y agua destilada, todo ello en proporciones 2:2:1, hasta que no queden restos de la coloración amarillenta típica de la impregnación argéntica en el portaobjetos. Inmediatamente después se sumerge en fijador fotográfico convencional (Valca 1:4, por ejemplo) durante 10 minutos y a continuación se lava con agua destilada.

3) Para desteñir las preparaciones de fluorescencia se deben desmontar con objeto de eliminar el tampón McIlvaine:Glicerol lavando con agua destilada, e incubar posteriormente los portaobjetos en fijador Carnoy durante 12 horas aproximadamente. Si es posible en este intervalo de tiempo, cambiar el fijador por otro nuevo en dos ocasiones. A continuación, sumergir las preparaciones en metanol absoluto y mantener a temperatura ambiente por espacio de uno a tres días.

2.4.- Técnicas histológicas

Algunos de los individuos utilizados en este trabajo también han sido analizados desde el punto de vista histológico a fin de determinar el grado de desarrollo gonadal que presentaban.

Para ello se ha utilizado el método descrito por Humason (1972) que consta de los siguientes pasos:

1) Una vez realizada la disección del animal las gónadas se fijan rápidamente en solución de Bouin (ácido pícrico al 1.2 % en agua 73 ml: formol 25 ml: ácido acético glacial 5 ml.), durante un periodo de tiempo que varía entre 48 y 72 horas.

- 2) Transcurrido este tiempo los tejidos son deshidratados sumergiendo la muestra en una serie de disoluciones de alcohol de concentración creciente a fin de, que la extracción del agua sea lenta y progresiva.
- 3) A continuación la muestra se incluye en parafina para permitir la realización de cortes histológicos en el microtomo. El grosor de estos cortes fue de 8-10 nm aproximadamente, y una vez obtenidos, se extienden y fijan en un porta en el que se ha depositado previamente una pequeña gota de disolución adhesiva (albúmina glicerinada 1 vol: agua destilada 20 vol).
- 4) Seguidamente se procede al desparafinado de los cortes introduciendo los portas en uno o dos baños de xilol durante 10 minutos., así como a su hidratación. Para ello las preparaciones se sumergen en la serie de disoluciones de alcohol, pero ahora en relación decreciente.
- 5) Las preparaciones así obtenidas se tiñen con una disolución de hematoxilina de Mayer durante 10 minutos y se lavan con agua corriente. Se vuelven a colorear con eosina al 1 % durante 5 a 10 segundos, lavándose a continuación con alcohol de 96°.
- 6) Por último el montaje se realiza en bálsamo de Canadá disuelto en xilol, si bien antes de montares necesario deshidratar de nuevo con alcohol de 96°, alcohol absoluto y xilol. Sobre éste último se coloca una gota de bálsamo de Canadá y a continuación se deposita un cubre-objetos suavemente con la ayuda de una aguja enmangada para que no queden burbujas de aire.

2.5.- Técnicas fotográficas

Para todas las fotografías realizadas sobre campo claro, es decir, las practicadas en aquellas técnicas que no eran de fluorescencia, se ha utilizado película marca Kodak Imagecapture AHU 5460 (12.5 ASA/ 12 DIN) que posteriormente ha sido revelada durante 15 minutos en revelador Kodak HC 110 (dilución F). En cambio, las microfotografías de preparaciones sometidas a técnicas de fluorescencia han sido realizadas en película marca Kodak Plus-X Pan film (125 ASA/ 22 DIN). Esta película fue revelada 5 minutos con el mismo tipo de revelado pero empleando

la dilución B.

En ambos casos los positivos correspondientes se hicieron en papel Agfa de los números 2 (BS 310 PE), 3 (BN 310 PE) y 4 (BP 310 PE).

OBJETIVOS

3.OBJETIVOS

Conocidos los problemas que causa la maduración sexual en las especies de salmónidos cultivadas en España, nos propusimos aplicar los actuales métodos de manipulación cromosómica, concretamente la inducción de triploidía, para tratar de solventar tales problemas que afectan de manera especial a la trucha arco-iris (*Salmo gairdneri*) y a una especie de salmón del Pacífico, el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*). Si tales métodos resultaran ser efectivos se esperarían obtener truchas y salmones incapacitados para madurar sexualmente y en los cuales los efectos perjudiciales de la maduración sexual (poco crecimiento, altas tasas de mortalidad, pobre calidad de carne y mal aspecto externo) pudiesen ser evitados.

Una vez obtenidos animales triploides de las dos especies mencionadas sería bastante interesante caracterizar citogenéticamente los cariotipos tanto de ellos como de los diploides normales, no solo por la importancia que esto tiene sino también por tratar de analizar qué sucede con determinadas zonas cromosómicas de función conocida, como las regiones organizadoras del nucleolo, cuando se pasa del estado diploide al triploide. A dicho análisis debían colaborar, además de las técnicas de bandeo cromosómico convencionales (bando C, impregnación argéntica y tinción con fluorocromos), otras más modernas y de naturaleza molecular como el bandeo con endonucleasas de restricción. Y no sólo estas técnicas aisladamente sino que también la aplicación secuencial de las mismas podría constituir un método idóneo para la caracterización citogenética de tales especies.

En otro orden de cosas, pudimos constatar la existencia de bastantes trabajos que ponían de manifiesto los fenómenos de variabilidad cromosómica intra e interindividual presentes en el genoma de la trucha arco-iris. Sin embargo, ninguno de ellos hacía referencia al modo en que tales fenómenos se originan o se transmiten, ni a otras características genéticas y aplicadas de interés para nosotros. En este sentido parecía necesario efectuar un análisis exhaustivo por familias, mediante cruzamientos controlados, en los cuales pudieran ser conocidos tanto los genotipos parentales como los de las progenies obtenidas para tratar de aclarar alguna de estas cuestiones. Asimismo mediante este tipo de

trabajo se podría obtener alguna luz sobre la evolución que ha seguido el grupo de los salmónidos que, como se sabe, se encuentra en un proceso de diploidización que partió de un ancestral tetraploide común a todos ellos.

Por último, sería importante establecer relaciones entre los tres objetivos descritos. Así por ejemplo, ¿incide de alguna manera la tasa de variabilidad intraindividual de los parentales en la supervivencia de sus descendientes? o ¿cómo ha afectado o afecta el proceso de diploidización a determinadas parejas cromosómicas con características citogenéticas especiales?. Sería de esperar que estas y otras cuestiones pudiesen ser aclaradas en el transcurso de la presente memoria.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1.- Manipulación cromosómica

4.1.1. *Inducción de triploidía mediante choque térmico en la trucha arco-iris (Salmo gairdneri Rich.)*

Aunque la inducción de poliploidía en la trucha arco-iris se ha conseguido empleando diversos procedimientos como son los choques térmicos, los choques de presión hidrostática y los tratamientos con sustancias químicas como la citocalasina B, en nuestro diseño experimental hemos optado por el primer procedimiento, los choques térmicos, por ser éste el método de más fácil aplicación y cuyos resultados parecen estar más en consonancia con los objetivos a conseguir desde el punto de vista de la mejora.

Las experiencias de obtención de triploides recogidas en la presente memoria fueron llevadas a cabo en dos instalaciones piscícolas de características bien distintas tanto desde el punto de vista climático como intrínseco de las propiedades físico-químicas del medio. Así, la primera de dichas experiencias, iniciada en Agosto de 1.986 y concluida en Mayo de 1.989, se realizó en la Piscifactoría de Benamahoma (Cádiz), situada en la falda suroeste de la Sierra de Grazalema, con las peculiaridades climáticas que esto conlleva. En ella, el agua que alimenta la instalación es suministrada por un manantial (nacimient subterráneo) a razón de 250 litros/segundo de caudal medio, permaneciendo la temperatura de la misma constante, a $13'5 \pm 0'5$ °C, durante todo el año. Se trata, además, de un agua de gran pureza y excepcionales propiedades químicas y biológicas, tanto para el consumo humano como para el cultivo de salmónidos. En cambio, en la Piscifactoría de Orol (Lugo), donde tuvo lugar la segunda experiencia de inducción de triploidía en trucha arco-iris, el agua procede del curso medio del Río da Xestosa, el cual, aporta a la instalación un caudal medio de 500 litros/segundo, si bien las variaciones invierno-verano se dejan sentir de forma acusada (800 l/sg en invierno y 200 l/sg en época de estío). Tales variaciones climáticas estacionales hacen que la temperatura del agua oscile a lo largo del año, pudiéndose registrar de 3 a 5°C en invierno y hasta 18°C en verano. También lo hace la pureza del agua así como sus propiedades físico-químicas. En este caso, la experien

cia comenzó en Febrero de 1.987.

4.1.1.1. Eficacia del método de inducción y supervivencia de las progenies

La eficacia del método de inducción, medida como porcentaje de individuos triploides obtenidos en relación al total de huevos tratados, también llamada tasa de inducción, figura, junto con otros resultados que posteriormente describiremos, en dos tablas consecutivas, la Tabla IV para la experiencia de Benamahoma y la Tabla V para la de Orol. En ellas se recogen asimismo los datos referentes a las tasas de supervivencia o proporción relativa de individuos vivos respecto al inicial, los cuales, a su vez, fueron estimados en dos etapas del ciclo de desarrollo de la especie, cuales son, el momento en que aparecen los ojos en el huevo y aquel en el que los recién nacidos empiezan a tomar el alimento suministrado, adaptándose así a su nueva forma de vida. La primera de dichas etapas tiene lugar entre 230 y 250°día ($^{\circ}\text{C} \times \text{número de días}$) lo cual se corresponde aproximadamente con los 18 y 20 días después de la fecundación, en la piscifactoría gaditana, y los 29 a 32 días en la lucense; mientras que la adaptación al suministro de alimento (pienso) suele ocurrir en torno a los 450°día (31-33 días después de la fecundación, en la instalación de Benamahoma, y 60-65 días en la de Orol).

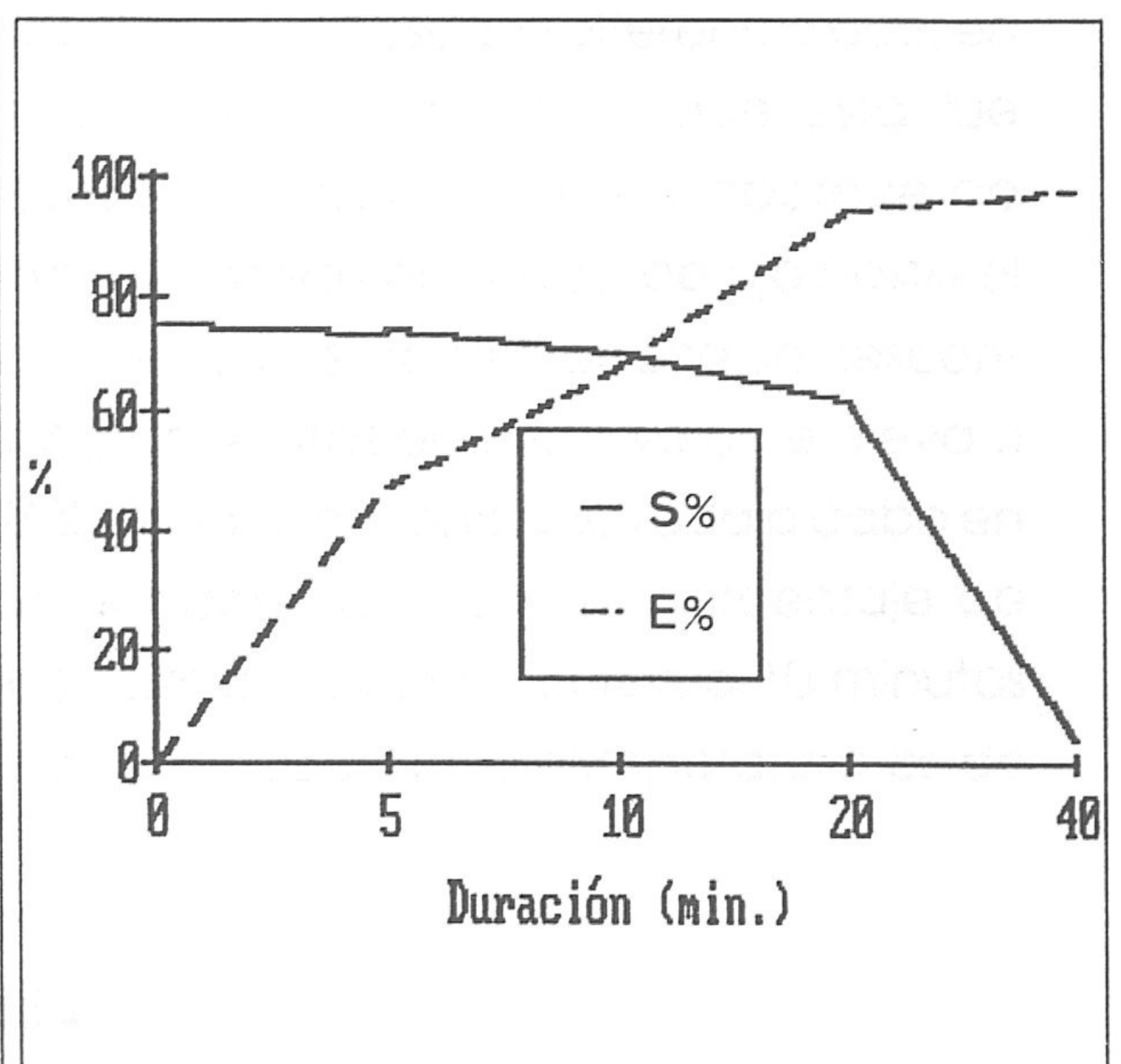
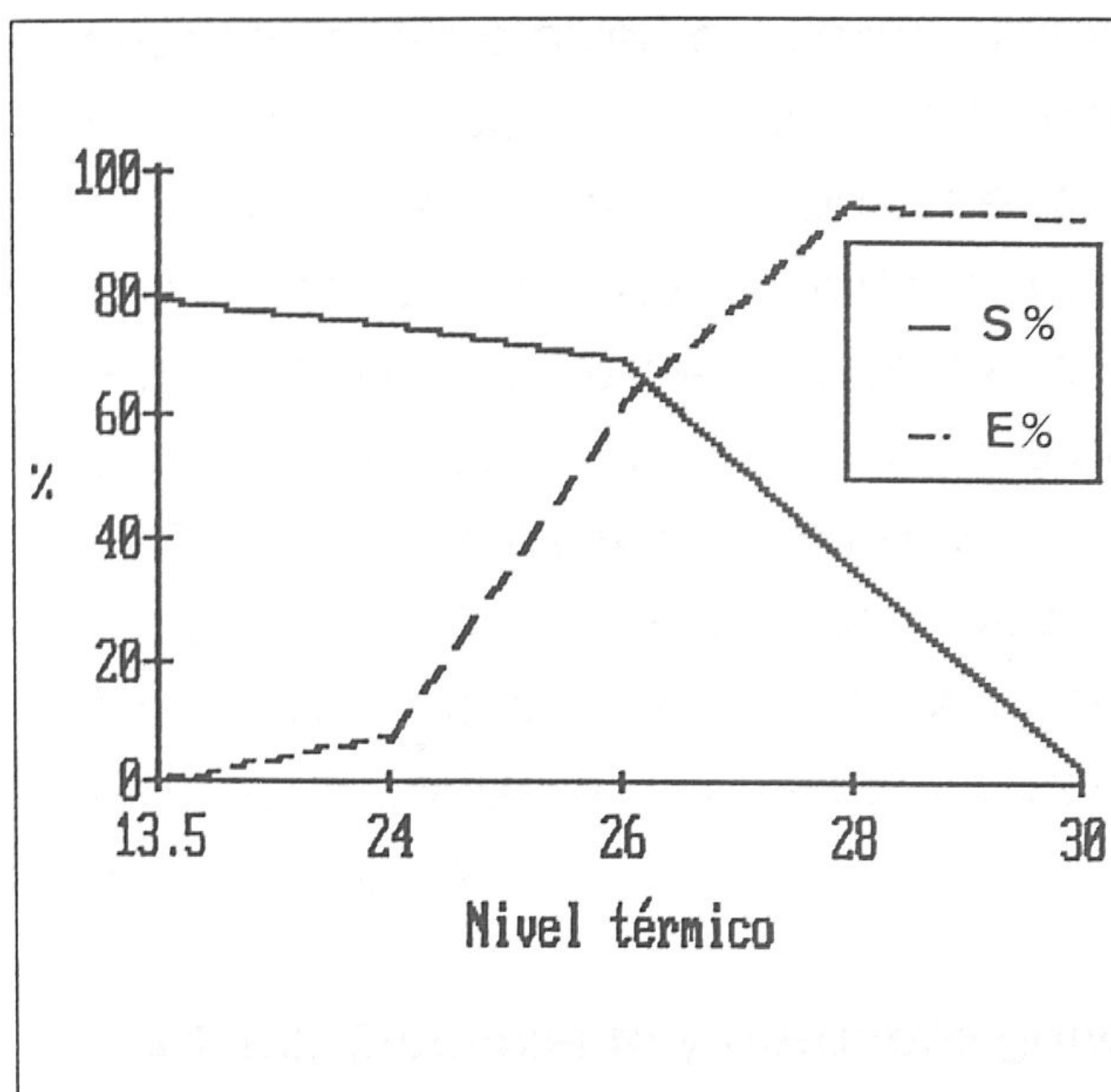
En la eficacia del choque térmico como agente inductor de triploidía, inciden, amén de componentes ambientales y de otros ajenos a la propia forma de llevarse este a cabo (la variabilidad cromosómica por ejemplo), tres factores principales: la temperatura a la que transcurre (T), la duración del mismo (D) y el tiempo de incubación (t, el que transcurre desde la fertilización de los huevos hasta el comienzo del choque térmico). Pues bien, tal y como se puede observar en la Tabla IV, en la piscifactoría de Benamahoma se diseñaron tres tipos de experimentos diferentes en función del parámetro variable en cada caso, a saber, la temperatura del choque térmico (T) en el experimento A, la duración de dicho proceso (D) en los experimentos B y C y el tiempo de incubación (t) en los experimentos D y E. De igual forma, se ha podido analizar la posible incidencia de dos niveles térmicos diferentes, 26°C y 28°C, tanto sobre duraciones variables del tratamiento (experiencias B y C) como sobre distintos tiempos de incubación (experiencias D y E).

Cuando se fija en 10 minutos la duración del choque térmico y el tiempo de incubación (experiencia A), aparecen dos niveles térmicos que, a tenor de los resultados, pueden ser descartados para posteriores experiencias de obtención artificial de triploides; éstos son, 24°C por la baja tasa de inducción (7.2%), y 30°C por la alta mortalidad que causa (96.8%). De las dos temperaturas restantes, 28°C ofrece rendimientos superiores al 90% en la tasa de inducción de triploidía, y una tasa de supervivencia relativamente baja (35.5%). El nivel 26 ofrece valores intermedios tanto de supervivencia como de eficacia. Resultados interesantes se obtienen, sin embargo, aplicando esta última temperatura durante tiempos de choque variables. Así, en los datos referidos a la experiencia B se puede observar el buen porcentaje de supervivencia (61.8%) y la extraordinaria tasa de inducción (94.3%) obtenidas cuando la duración del choque se prolonga durante 20 minutos. Es bajo estas condiciones donde se puede encontrar un óptimo equilibrio eficacia-supervivencia para los experimentos llevados a cabo en la Piscifactoría de Benamahoma. Tiempos superiores a éste provocan aumentos considerables de la mortalidad, mientras que tiempos inferiores apenas son eficaces para inducir triploidía.

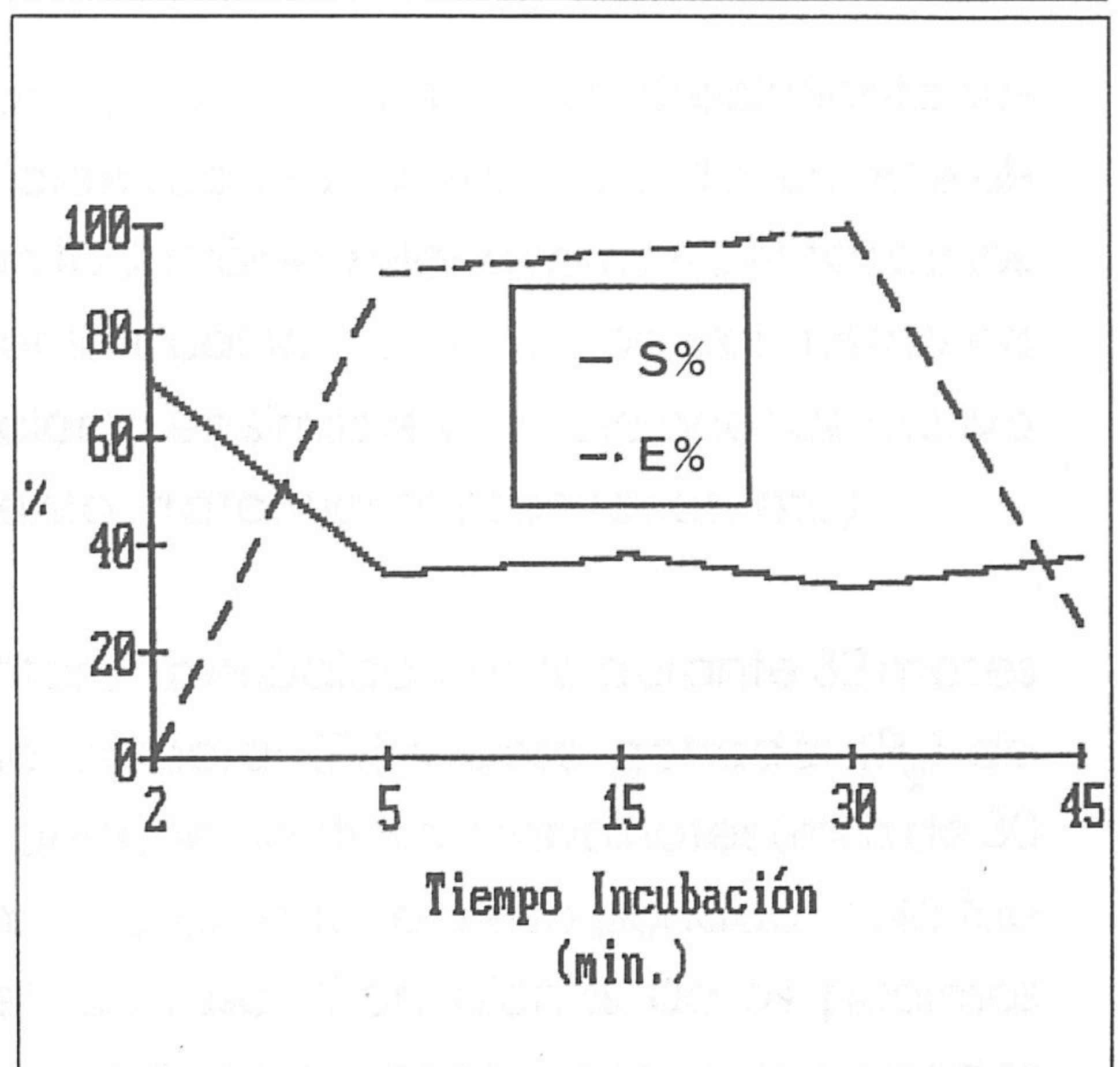
La experiencia C viene a confirmar los resultados de la experiencia A referidos a choques de 10 minutos de duración a 28°C. Sin embargo, cuando éste aumenta a 20 minutos tiene lugar una caída drástica de la supervivencia, si bien es cierto que el porcentaje de triploides que se consigue es de los más elevados (96.9%). Tanto ésta como la anterior experiencia indican claramente que, a medida que aumenta la duración del choque térmico, disminuyen los valores de supervivencia y paralelamente se incrementan los porcentajes de triploides, y por tanto, es la misma respuesta que se obtiene al incrementar la temperatura del tratamiento (Gráficas 1 y 2).

En las experiencias D y E se muestran las influencias del tiempo de incubación sobre los dos parámetros de interés aplicado, supervivencia y eficacia (Gráfica 3). En este sentido, cuando el shock térmico tiene lugar a los 30 minutos de la fecundación, la mortalidad de los huevos, en cualquiera de las dos etapas, es significativamente mayor que para valores de t de 5, 15 o 45 minutos, sea cual sea la intensidad (temperatura) del choque. Respecto a la tasa de inducción de triploides, no existen diferencias significativas entre los tres primeros valores de t (5,

15 y 30 minutos), aunque los porcentajes son tanto más elevados cuanto más nos alejamos del momento de la fecundación (99.3% a los 30 minutos); por el contrario, a los 45 minutos se invierte esta tendencia y la tasa de activación cae hasta valores realmente bajos (26.7 y 23.8% respectivamente). Como era de esperar, el nivel 28 es mucho más eficiente que el 26 a la hora de inducir triploidía, pero también ofrece mayores tasas de mortalidad.



Por lo que concierne a la experiencia desarrollada en la piscifactoría gallega, sólo se analizó la incidencia de distintos niveles térmicos sobre la supervivencia y la eficacia del tratamiento. Se trata de un diseño similar al de la experiencia A antes mencionada. Se ensayaron choques térmicos a temperaturas de 26, 28 y 30°C (el nivel 24 se eliminó en base a los resultados previamente obtenidos) manteniendo siempre constantes la duración del choque (10 minutos) y el tiempo de incubación (10 minutos). De los resultados obtenidos, los cuales se recogen en la Tabla V, se puede deducir que, en términos gene-



Gráficas 1,2 y 3. Influencia de distintos factores sobre la eficacia del choque térmico (E%) y la supervivencia de la progenie (S%): 1) nivel térmico, 2) duración del choque térmico, 3) tiempo de incubación.

rales, éstos siguen pautas similares a las descritas para la experiencia gaditana, es decir, tasa de supervivencia, y porcentaje de triploides son valores antagónicos, éste último aumenta cuando lo hace la intensidad del choque térmico y al contrario ocurre con el primero. Sin embargo, en este caso se puede observar cómo las tasas de supervivencia en los niveles 28 y 30 son sensiblemente mayores a las estimadas para las truchas de Benamahoma, permaneciendo semejantes las correspondientes al nivel 26. Asimismo llama la atención la escasa diferencia que, en términos de supervivencia, existe entre los dos momentos en que ésta fue estimada, y esto en cualquiera de los lotes tratados, cosa que sí aparece de forma notable en la experiencia gaditana. Así, desde el estado de ojo hasta el momento en que los alevines empiezan a tomar alimento se produce un descenso medio en la tasa de supervivencia del 4.5% mientras que este valor se eleva a 11.8% (con valores extremos de hasta el 26%) en la experiencia llevada a cabo en Lugo. En cuanto a la tasa de inducción se hace notar el alto porcentaje de triploides inducido tras aplicar un choque térmico de 28°C durante 10 minutos (96.1%), llegándose a alcanzar valores del 100% cuando la temperatura es de 30°C (Tabla V).

4.1.1.2. Crecimiento y desarrollo gonadal

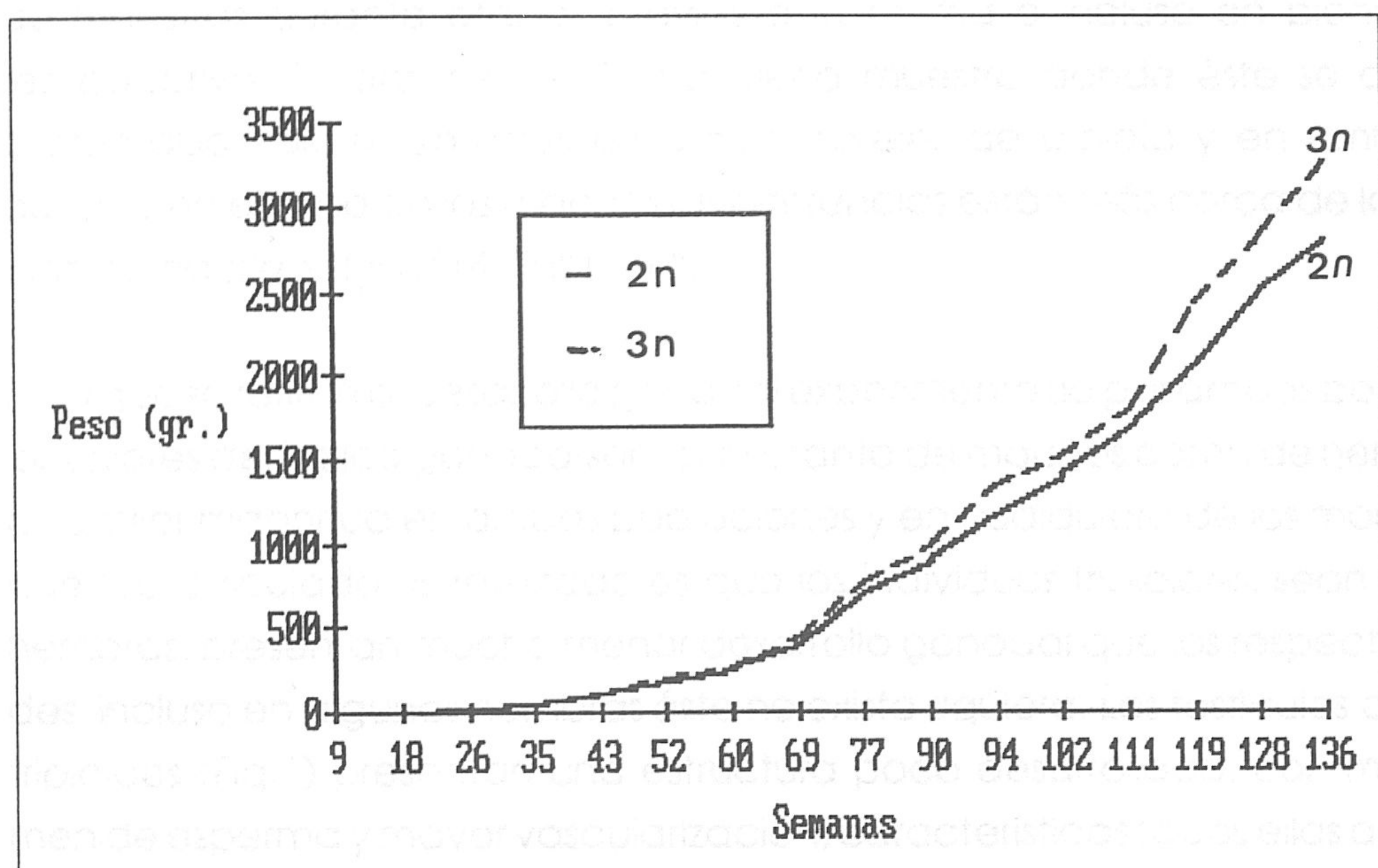
Se han llevado a cabo un seguimiento en torno a las pautas de crecimiento seguidas por dos lotes de truchas, uno diploide (control) y otro triploide. En este último, por razones de espacio, se reunieron todos los individuos procedentes de los distintos tratamientos térmicos, razón por la cual la composición del mismo no debía ser 100% triploide. Ambos lotes crecieron en similares condiciones de cultivo (densidad de carga, suministro de alimento, tratamientos sanitarios, etc).

En la población de Benamahoma se anotaron periódicamente durante 32 meses los valores medios de longitud (L), peso corporal (P_r) y peso gonadal (P_g) de muestras estadísticamente significativas pertenecientes a ambos lotes (más de 30 individuos por muestra), si bien este último parámetro, el peso gonadal, sólo fue estimado en determinadas etapas del proceso. Con dichos datos pudimos determinar, junto a los pesos medios, dos índices estrechamente relacionados con el crecimiento y el desarrollo gonadal respectivamente, cuales son, el factor de condición (K) y el índice gonado-somático (GSI), mostrándose los resultados de dicho análisis en la Tabla VI. El cálculo de los parámetros mencionados se

efectuó en base a las siguientes expresiones matemáticas:

$$K = P_T/L^3 \times 100 \quad GSI = P_g/P_T \times 100$$

En lo que se refiere a la población de Orol (Lugo), el seguimiento fue de menor duración (26 meses), y como se puede observar en la Tabla VII se vió alterado en cuatro ocasiones debido a las catástrofes climatológicas propias de esta comarca gallega. En esta instalación únicamente se estimaron los pesos medios de los dos lotes (control y triploide, este último con una pequeña proporción de diploides) crecidos bajo similares condiciones de cultivo. Por ello, los parámetros de crecimiento (K) y desarrollo gonadal (GSI) para esta población se calcularon a partir de otra muestra más reducida tal y como figura en la Tabla VIII.



Gráfica 4. Evolución comparada del crecimiento seguido por dos lotes de trucha arco iris: control (2n) y triploide. Piscifactoría de Benamahoma (Cádiz)

Como se puede observar en la población gaditana (Tabla VI, Gráfica 4), los triploides comienzan a despegarse de los diploides, en lo que al peso medio se refiere, a partir de la primera maduración sexual ya que hasta ese momento ambos lotes habían seguido un crecimiento paralelo. Estas diferencias, manifiestas tanto en machos como en hembras, se reducen en el periodo comprendido entre una y otra época de madurez sexual para volver a aparecer en los prolegómenos de la segunda de dichas etapas y especialmente durante la misma. A partir de este segundo ciclo de desarrollo gonadal se mantienen las diferencias, más o menos acusadas, llegando a ser elocuentes en las dos últimas estimas realizadas. Durante todo el proceso se observa asimismo que los machos

crecen menos que las hembras para un mismo lote considerado.

El factor de condición K de esta población oscila durante todo el seguimiento en uno y otro lote, sin que éste ofrezca valores significativamente diferentes entre el grupo control y el sometido a choque térmico en ninguna de las épocas consideradas. Como sucedía con el peso medio, para un mismo lote, las hembras muestran valores superiores de K que los machos.

En la población gallega, sólo aparecen diferencias acusadas en el crecimiento entre diploides y triploides tras la segunda maduración sexual (Tabla VII), si bien es cierto que las constantes adversidades climáticas hicieron imposible la toma de muestras durante etapas previas a la misma e incluso en pleno periodo reproductivo. El factor K, en la pequeña muestra donde éste se determinó, presentaba valores similares en ambos niveles de ploidía y en ambos sexos, aunque en el caso de los machos las diferencias están más cerca de la significación estadística ($t_s=1.414$, Tabla VIII).

En lo que se refiere al desarrollo gonadal experimentado por ambas poblaciones, los valores del índice gónado-somático, tanto de machos como de hembras, son de similar magnitud en ambas poblaciones y en cualquiera de los momentos en que fue calculado. El resultado es que los individuos triploides, sean machos o hembras, presentan mucho menor desarrollo gonadal que los respectivos diploides, incluso en algunas hembras éste no existe siquiera. Los testículos de machos triploides (Fig.1) presentan una estructura poco desarrollada, con menor volumen de esperma y mayor vascularización, características todas ellas ausentes en los testículos diploides, los cuales poseen un desarrollo normal. No obstante, en algunos casos, los machos triploides muestran testículos aparentemente con idéntico desarrollo gonadal que los diploides. A nivel histológico (Fig.2a y b) en los primeros, a diferencia de los controles, se observan gran cantidad de células en estadios tempranos de maduración (espermatoцитos I, Figs.2a y b)), además de una cantidad considerable de esperma.

Los ovarios de uno y otro tipo de individuos son fácilmente distinguibles en base a su tamaño, espectacularmente menor en los triploides. Así lo demuestran los valores de GSI de estos últimos, 0.21 en Benamahoma y 0.31 en Orol, en relación con los diploides (18.70 y 17.84 respectivamente). Como se ve, el peso de un

ovario triploide no llega a ser ni el 2% que el de un ovario normal. El análisis histológico de estos (Fig.2c y d) muestra la estructura cavitaria típica de teleósteos en la cual se disponen abundantes oocitos en distintos estadios de desarrollo (previtelogénesis, vitelogénesis endógena, etc) junto al tejido propiamente conectivo. Esta situación no es la que aparece sin embargo en los ovarios de truchas triploides, en los cuales las células más abundantes se encuentran relegadas a estadios oogoniales conformando una estructura lamelar propia de un ovario poco o nada desarrollado.

4.1.2. Inducción de triploidía mediante choque térmico en el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*)

En el salmón coho, hasta ahora, sólo se ha inducido triploidía mediante choques térmicos, a diferencia de otras especies de salmón como *Salmo salar*, *Oncorhynchus tshawytscha* u *Oncorhynchus gorbuscha*, en las cuales también han sido empleados, además de éste, los choques de presión y la citocalasina A. Siguiendo los mismos criterios que para la trucha arco-iris, elegimos el choque térmico como método para tratar de inducir triploidía en el salmón coho o salmón plateado, y poder así analizar sus posibles efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo gonadal. Dicha experiencia se comenzó el 3 de Noviembre de 1.987 en la Piscifactoría de Orol (Lugo) propiedad de la empresa gallega Marcultura,S.A, y por tanto en una instalación de agua dulce con las características antes mencionadas (ver apartado 4.1.1).

4.1.2.1. Eficacia del método y supervivencia de la progenie

Los datos relacionados con la supervivencia y crecimiento de los ejemplares en experimentación se anotaron periódicamente incluyendo la etapa de esmoltificación, momento crítico desde el punto de vista biológico para casi todas las especies de salmón. Los resultados obtenidos en esta experiencia, en lo que respecta a la eficacia del choque térmico como agente inductor de triploidía y a las tasas de supervivencia, se resumen en la Tabla IX:

Lo primero que llama la atención de tales resultados es la pobre supervivencia que presenta esta especie, no alcanzándose en ninguno de los controles

establecidos valores del 50%. Con ello, las tasas de supervivencia de cualquiera de las progenies sometidas a choque térmico fueron aún más bajas, aunque sin embargo, en algunos casos no difieren significativamente de dichos controles.

Al igual que en la trucha, también en el salmón se quiso analizar, mediante tres tipos de experiencias (1, 2 y 3, Tabla IX), la incidencia de la intensidad del choque térmico (temperatura y duración) y del tiempo de incubación, sobre los dos parámetros que nos ocupan. Así, en la experiencia 1 se aplicaron choques de distinto nivel térmico (28, 30 y 32°C) durante 10 minutos, una vez que los huevos fertilizados habían permanecido por espacio de 10 minutos en el sistema de incubación. En ella se puede observar que el nivel 28 no causa mortalidades adicionales respecto al control, obteniéndose un porcentaje de triploides no demasiado bueno (64.87%). Tal porcentaje aumenta considerablemente cuando las temperaturas del tratamiento son de 30 o 32°C (85.29 y 93.94% respectivamente) pero las tasas de supervivencia descienden de manera significativa (26.01 y 18.32% respectivamente y en relación al control).

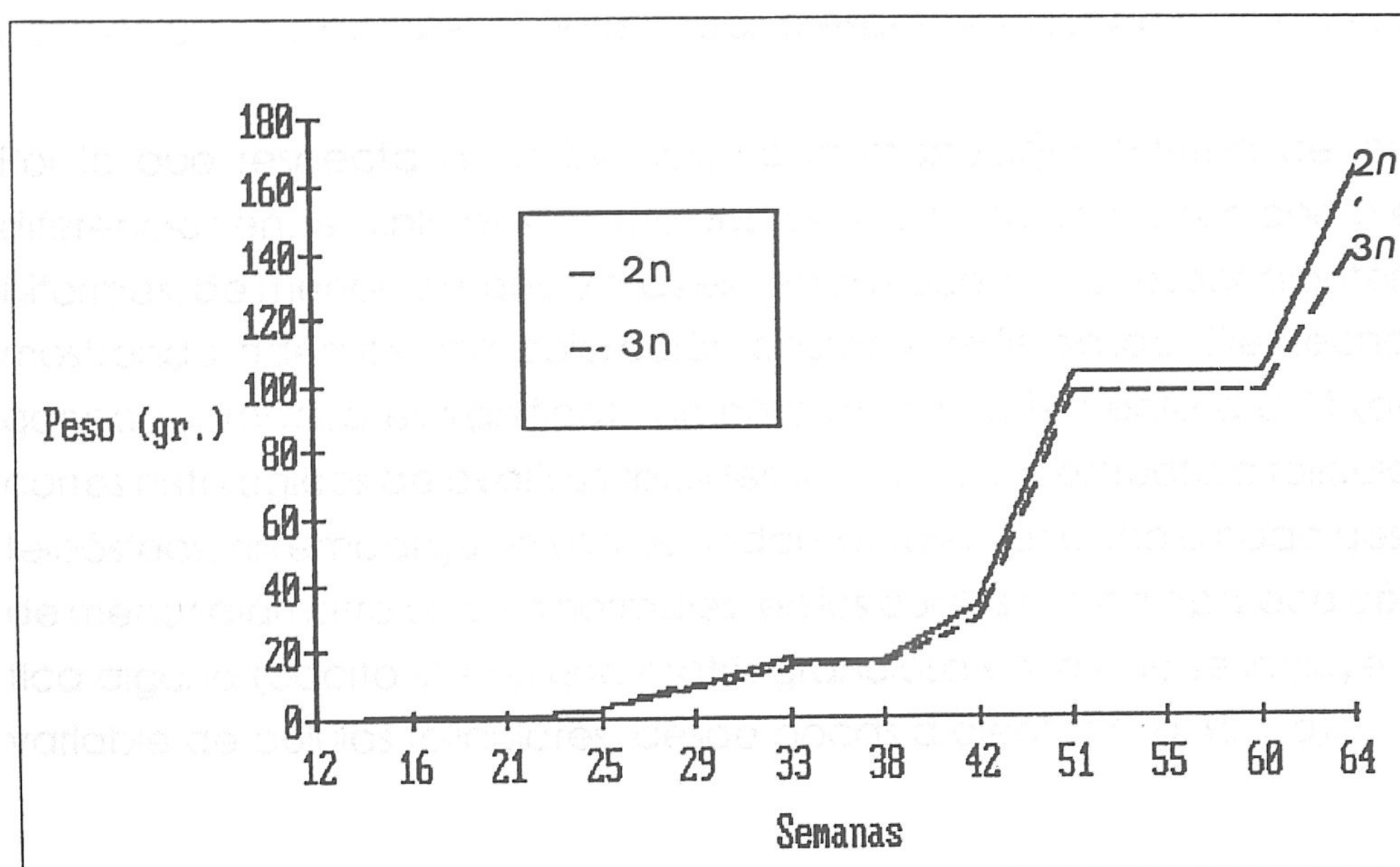
Siguiendo algunas sugerencias indicadas por Johnstone (1985) en el salmón atlántico, administramos choques de 32°C de duración variable a los huevos de varias hembras de salmón coho (experiencia 2). En este caso, se comprueba que los tratamientos cortos pero a alta temperatura provocan mortalidades excesivas, y más aún cuando se trata de una especie que, como *O. kisutch*, presenta problemas de supervivencia en condiciones naturales durante las primeras etapas del ciclo de desarrollo. Además, la eficacia del método, excepto para duraciones superiores a los 7' donde se alcanza un valor de 93.94%, dista bastante de ser aceptable llegando incluso a ser nula para duraciones de 2'.

La experiencia 3 fue diseñada para tratar de averiguar si el tiempo de incubación, al igual que en la trucha arco-iris, influye en los resultados del proceso. Y aunque no ensayamos tiempos superiores a 25 minutos, sí que se observa claramente como en esta especie, cuando aumenta el tiempo de incubación disminuye la eficacia del choque térmico, no apareciendo diferencias significativas entre los distintos tiempos utilizados entre sí (5, 15 y 25 minutos) ni de estos con el control. Ello siempre y cuando la temperatura del choque sea 28°C y la duración del mismo 10'.

4.1.2.2. Crecimiento y desarrollo gonadal

Al igual que para la anterior especie, se realizaron controles periódicos, a lo largo de 16 meses (Tabla X), acerca de la evolución del crecimiento en dos lotes de salmones, uno control (diploide) y otro triploide (en él se mezclaron todos los individuos procedentes de huevos sometidos a los distintos choques térmicos). Asimismo, sobre una muestra más pequeña se hizo un análisis comparativo entre diploides y triploides de los valores de K y GSI mostrados por una y otra clase de individuos respectivamente (Tabla XI).

Los datos de longitud y peso (Tabla X) mostrados a distintas edades por individuos diploides y triploides son indicativos de un crecimiento paralelo de unos y otros, hecho que coincide con los similares valores de la constante de condición ($K=1.25$ y 1.21 para las hembras $2n$ y $3n$, $K=1.18$ y 1.17 para los machos $2n$ y $3n$ respectivamente, Tabla XI). Únicamente se observaron claras diferencias en favor de los controles (Gráfica 5) en la primera medida que se hizo después de que ambos lotes esmoltificaran (35 gr. de media pesaban los diploides y 29.46 los triploides), si bien tales diferencias no alcanzan significación estadística. Y lo mismo sucedió con la última de las muestras tomadas a los 16 meses del nacimiento.



Sin embargo, sí que llama la atención el menor porcentaje de individuos triploides (43.23 %) que pasó la etapa de esmoltificación en relación con los diploides (58.27%). Aparentemente no se observaron tasas de mortalidad diferentes en uno u otro lote asociadas a este momento del ciclo biológico, el cual, como ya se dijo en la Introducción, supone una etapa de grandes cambios fisiológicos, hormonales y bioquímicos, encaminada a la adaptación de los salmones a la vida marítima.

Como también se observa en la Tabla X el periodo considerado estuvo sometido a algún que otro desastre climatológico, en concreto tres riadas tuvieron lugar durante el mismo y ello dificultó la estandarización de los lotes y el control en la toma de datos.

En lo que se refiere al desarrollo gonadal, el aspecto morfológico externo de los testículos procedentes de salmones diploides muestra un tamaño bastante mayor ($GSI=0.087$) que el presentado por los triploides ($GSI=0.047$, $p<0.001$, Tabla XI). Sin embargo, cuando se analizan a nivel histológico (Fig.3a y b) se observa que realmente existen pocas diferencias entre uno y otro tipo. Ambos presentan gran cantidad de células en estadios tempranos de desarrollo sin que en ningún caso aparezcan visibles espermatidas o espermatozoides bien conformados.

Por lo que respecta a los ovarios, ya la morfología externa denota algunas diferencias entre diploides y triploides. Estos últimos aparecen como estructuras filiformes, de menor tamaño y más estilizadas que los correspondientes controles, mostrando además una coloración bastante más pálida. De hecho, el índice gónado-somático es significativamente menor, 0.14 frente a 0.74 ($p<0.001$). En cortes histológicos de ovarios triploides se observa la estructura folicular típica de teleósteos, sin embargo en ella abundan los folículos poco o nada desarrollados, de menor diámetro que los normales, en los cuales nunca aparece célula gamética alguna (oocito II) sino una matriz granulosa en la que se incluye un número variable de células foliculares, desde pocas a cientos (Fig.3c y d).

4.2.- Análisis citogenéticos

4.2.1.- Análisis citogenéticos en la trucha arco-iris

Antes de describir los resultados obtenidos tras los análisis citogenéticos llevados a cabo en individuos diploides y triploides de esta especie, diremos que el orden a seguir en la exposición de los mismos comienza con la descripción del cariotipo de *Salmo gairdneri*, a lo cual seguirá un estudio detallado del polimorfismo que, relativo al número cromosómico, se encuentra presente en la misma, y concluirá con los datos surgidos de la aplicación de distintas técnicas de bandeo cromosómico que permiten la diferenciación longitudinal de dicho cariotipo, a saber, tinción argéntica, bandeo C, tinción con fluorocromos y bandeo con endonucleasas de restricción.

4.2.1.1. Descripción del cariotipo

El complemento diploide estándar de la trucha arco-iris (Fig.4a) está constituido por 60 cromosomas (este es el número más frecuente en la mayoría de las poblaciones estudiadas) ordenados de la siguiente forma (según Levan y col., 1964):

* 44 metacéntricos y submetacéntricos de tamaños grande, mediano y pequeño (M+SM), de los cuales dos de mediano tamaño poseen regiones satelitíferas

* 1 ó 2 cromosomas subtlocéntricos de pequeño tamaño (ST)

* 15 ó 14 cromosomas telocéntricos pequeños (T)

A pesar de ser ésta la fórmula estándar ($2n=60: 44 M+SM + 1-2 ST + 15-14 T$), se sabe desde hace bastante tiempo (Ohno et al., 1965, 1969) que este número cromosómico no permanece constante, sino que por el contrario varía tanto de unas células a otras de un mismo individuo (nivel intraindividual) como entre individuos distintos (nivel interindividual) y que generalmente lo hace entre valores de $2n=58$ y $2n=65$, si bien es cierto que la mayoría de las poblaciones estudiadas, sean éstas naturales o cultivadas, no abarcan todo el rango de variación. En nuestro caso,

tanto en la población de Benamahoma como en la de Orol, ambas cultivadas, sólo se han detectado variaciones en los dos niveles, comprendidas entre $2n=58$ y $2n=63$ (Figs.4b-4e).

El cariotipo de los individuos triploides (Fig.5a) lo componen normalmente 90 cromosomas, aunque este número también varía de unos individuos a otros, e incluso a nivel intraindividual, entre valores de $3n=88$ y $3n=94$ en la población de Orol y entre 89 y 95 en la de Benamahoma (Fig.5b-5e). De los 90 cromosomas del cariotipo más común, 66 son metacéntricos y submetacéntricos de tamaño mediano y grande, de 3 a 6 son subtlocéntricos medianos, y los restantes son telocéntricos de pequeño tamaño.

4.2.1.2. Características de la variabilidad cromosómica intra e interindividual

Es importante señalar que aunque varíe el número cromosómico entre células de un mismo individuo o entre individuos distintos, el número fundamental o número de brazos cromosómicos se mantiene constante en todos ellos, siendo su valor de $NF=104$ en los diploides y $NF=156$ en los triploides. También se han observado, aunque en baja frecuencia (entre 3.84% y 48.15%), metafases con valores menores en el número fundamental en casi todos los individuos analizados. Sin embargo éstas no se han incluido en los análisis efectuados por desconocer las causas que los originaron (reordenaciones cromosómicas o errores del conteo o consecuencias de la técnica).

En relación con la variabilidad cromosómica, hemos observado que al aumentar el número cromosómico, lo que generalmente suele ocurrir es un descenso en el número de cromosomas metacéntricos o submetacéntricos (M+SM) acompañado de un incremento en el número de telocéntricos. Así, a nivel diploide, las células con $2n=58$ están integradas por 46 M+SM + 1-2 ST + 13-12 T, aquellas con $2n=59$ tienen como fórmula cariotípica 45 M+SM + 1-2 ST + 13-12 T, las que tienen 60 cromosomas presentan 44 M+SM + 1-2 ST + 15-14 T, cuando $2n=61$ la constitución de dichas células es 43 M+SM + 1-2 ST + 17-16 T, y así sucesivamente.

Atendiendo a la clásica definición de Ford (1940), tal fenómeno de variabilidad cromosómica, al menos a nivel interindividual, dentro de una población y en poblaciones distintas, puede ser considerado un caso de polimorfismo cromosómico. Es por lo que a partir de este instante hablaremos de variabilidad cromosó-

mica al referirnos a variabilidad intraindividual y polimorfismo cromosómico cuando lo hagamos a nivel interindividual.

Pues bien, una vez sentadas estas premisas, diremos que el estudio acerca de las características genéticas de estos fenómenos de variabilidad ha sido realizado en la población de Orol (Lugo), para lo cual se han realizado 27 cruzamientos controlados de los cuales sólo tendremos en cuenta 25 por cuanto en dos de ellos no pudieron ser caracterizados correctamente alguno de los progenitores. Para este análisis se ha contado exclusivamente con aquellas células cuyo NF fuese 104 en cada cruce, determinándose los siguientes parámetros (Tabla XII):

- 1.H = número cromosómico del parental femenino
- 2.HA = tasa de variabilidad intraindividual de la hembra
- 3.HA+ = valor de HA por exceso
- 4.HA- = valor de HA por defecto
- 5.M = número cromosómico del parental masculino
- 6.MA = tasa de variabilidad intraindividual del macho
- 7.MA+ = valor de MA por exceso
- 8.MA- = valor de MA por defecto
- 9.DDA = tasa media de variabilidad intraindividual de la descendencia diploide
- 10.DDA+ = valor de DDA por exceso
- 11.DDA- = valor de DDA por defecto
- 12.DTA = tasa media de variabilidad intraindividual de la descendencia triploide
- 13.DTA+ = valor de DTA por exceso
- 14.DTA- = valor de DTA por defecto
- 15.VID = tasa de variabilidad interindividual no esperada o de polimorfismo cromosómico no esperado en la progenie diploide
- 16.VIT = lo mismo en la progenie triploide
- 17.S_{2n} = tasa de supervivencia de la descendencia diploide de un cruzamiento
- 18.S_{3n} = tasa de supervivencia de la descendencia triploide de un cruzamiento
- 19.E = eficacia del choque térmico en la inducción de triploidía

Cualquier tasa de variabilidad intraindividual ha sido calculada como el cociente entre el número de células con números cromosómicos distintos del modal y el total de células analizadas en un individuo, pudiendo ser números cromosómicos mayores que el modal (HA+, MA+, DDA+, DTA+) o menores que éste (HA-, MA-

DDA-, DTA-). Los valores de DDA y DTA son valores medios de una progenie calculados a partir de los presentados por cada uno de los individuos que componen tales progenes. Del mismo modo las tasas de variabilidad interindividual o polimorfismo cromosómico no esperado representan la proporción relativa de individuos con número cromosómico distinto del esperado en cada cruzamiento suponiendo que los procesos meióticos ocurren de forma normal en sus progenitores. El cálculo de los porcentajes de supervivencia y eficacia del choque térmico ya fue descrito con anterioridad.

En términos generales, hemos llevado a cabo dos tipos de análisis; el primero a nivel familiar, cuantificando los parámetros indicados en cada uno de los cruces (incluidos progenitores y descendientes), y otro a nivel generacional-poblacional, tratando de establecer posibles relaciones entre la generación parental (considerando el grupo de los padres y de las madres por separado) y la generación filial (diploide y triploide), en lo referente a determinadas variables de interés. Para el primer tipo de análisis se han empleado estadísticos descriptivos (medias, errores estándar, t-Student, distribución de frecuencias) mientras que el segundo se ha llevado a cabo mediante un análisis de correlación-regresión.

Ambos tipos de análisis se han utilizado para el estudio de la variabilidad intra e interindividual, estudio que haremos por separado tratando de describir los resultados en función de la naturaleza, herencia y posibles influencias de tales fenómenos.

4.2.1.3. Análisis de la variabilidad intraindividual

a) Naturaleza

En cada cruzamiento, la variabilidad que, para el número cromosómico, está presente a nivel intraindividual viene determinada por la presencia de células con más o con menos cromosomas que el modal para un individuo concreto. Esta posible bipolaridad de la variabilidad intraindividual no es sin embargo tan evidente en la trucha arco-iris (*Salmo gairdneri*). Al menos, los valores que pueden tomar ambas direcciones no son de similar magnitud. Se puede afirmar, pues así ocurre en 24 de los 25 cruzamientos, que la variabilidad intraindividual presente en esta especie, tal y como aquí ha sido cuantificada, ocurre mayoritariamente

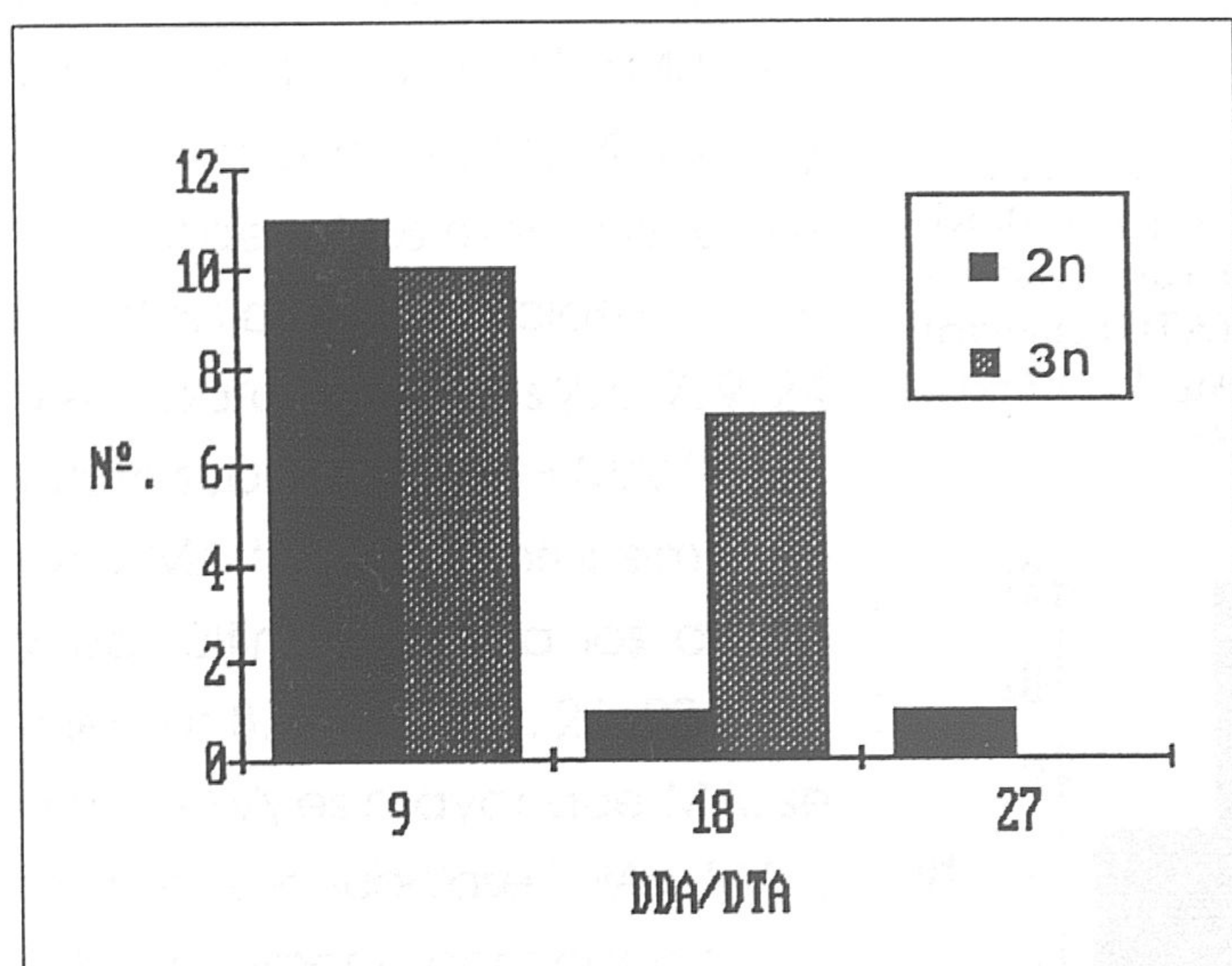
por la presencia de células con un número cromosómico menor que el característico para un individuo concreto, o lo que es lo mismo, se puede hablar de variabilidad intraindividual "por defecto" en términos generales. No obstante, hay que tener presente que en casi todos los cruzamientos existe una cierta tasa de variabilidad intraindividual "por exceso", la cual varía de unos cruces a otros: entre 0 y el 40.91% (media = 29.24%) de la variabilidad total en las progenies diploides es debida a variabilidad "por exceso" (con dos casos, los cruces 6 y 20, donde DDA+ es mayor que DDA-), entre 7.41% y 49.24% (media = 33.74%) en las triploides (con tres casos, los cruces 4, 8 y 9, donde DTA+ es mayor que DTA-), y entre el 0 y el 50% (media = 15.30% para las hembras y 26.14% para los machos) de la variabilidad intraindividual total de los parentales es también por exceso (entre los cuales hay un caso, el cruce 1, donde HA+ es mayor que HA- y cuatro casos, los cruces 2, 5, 8 y 18, en los que MA+ es mayor que MA-). A pesar de ello, en la mayoría de los cruces, la variabilidad intraindividual está determinada, al menos en muy alta proporción (84.70% en los progenitores femeninos, 73.86% en los masculinos, 70.76% en las descendencias diploides y 66.26% en las triploides) por la existencia de metafases con números cromosómicos inferiores al modal para cada individuo.

b) Herencia

Independientemente del número cromosómico mostrado por cada uno de los progenitores, los distintos tipos de cruzamientos realizados se pueden agrupar en tres clases bien definidas en base a las tasas de variabilidad intraindividual de los parentales. La primera de estas clases la formarían aquellos cruzamientos en los que ninguno de los parentales tiene variabilidad intraindividual ($HA = 0 = MA$, cruces 3 y 4, Tabla XII), la segunda sería aquella donde sólo la presenta uno de ellos, bien sea la madre ($HA > 0 = MA$, cruces 1, 6 y 13, Tabla XII) o el padre ($MA > 0 = HA$ cruce 12, Tabla XII), y en la tercera se encontrarían los cruces en los que ambos progenitores poseen cierta tasa de variabilidad intraindividual, sea ésta baja, mediana o alta (HA y $MA > 0$, el resto de los cruzamientos, Tabla XII).

Pues bien, en la primera de estas clases ($HA = 0 = MA$) es especialmente significativo el hecho de que parentales con tasa de variabilidad intraindividual nula originen progenies con valores para este parámetro del orden de 8.70 y 5.88 para los hijos diploides y 8.28 y 5.93 para los triploides (cruces 3 y 4 respectivamente,

Gráfica 6). El fenómeno contrario, es decir, que a partir de padres con cierta tasa de variabilidad intraindividual, ésta desaparezca totalmente en la descendencia, no ha estado presente en nuestro estudio, si bien sí que aparece una determinada proporción de descendientes con $DDA=0$. No obstante, el número de hijos que no presentan variabilidad intraindividual, en cada cruzamiento, no está relacionado con ninguna característica de los progenitores ya sea ésta el número cromosómico o su propia tasa de variabilidad intraindividual, como



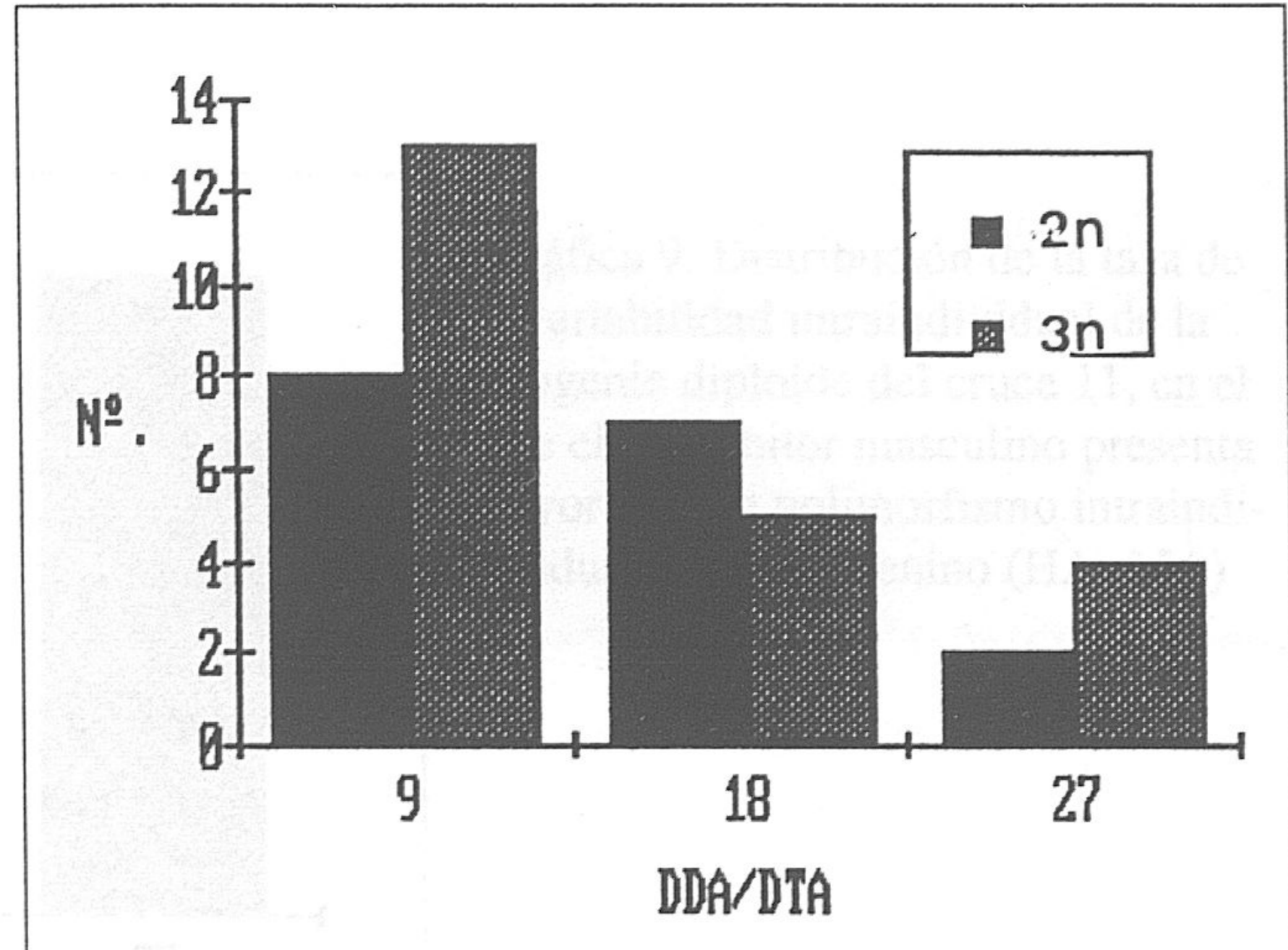
Gráfica 6. Distribución de frecuencias de la tasa de variabilidad intraindividual que presentan las progenies diploide (2n) y triploide (3n) del cruce 4 (H60 x M60) cuyos progenitores no presentan tasa de variabilidad intraindividual ($HA=0=MA$).

veremos más adelante.

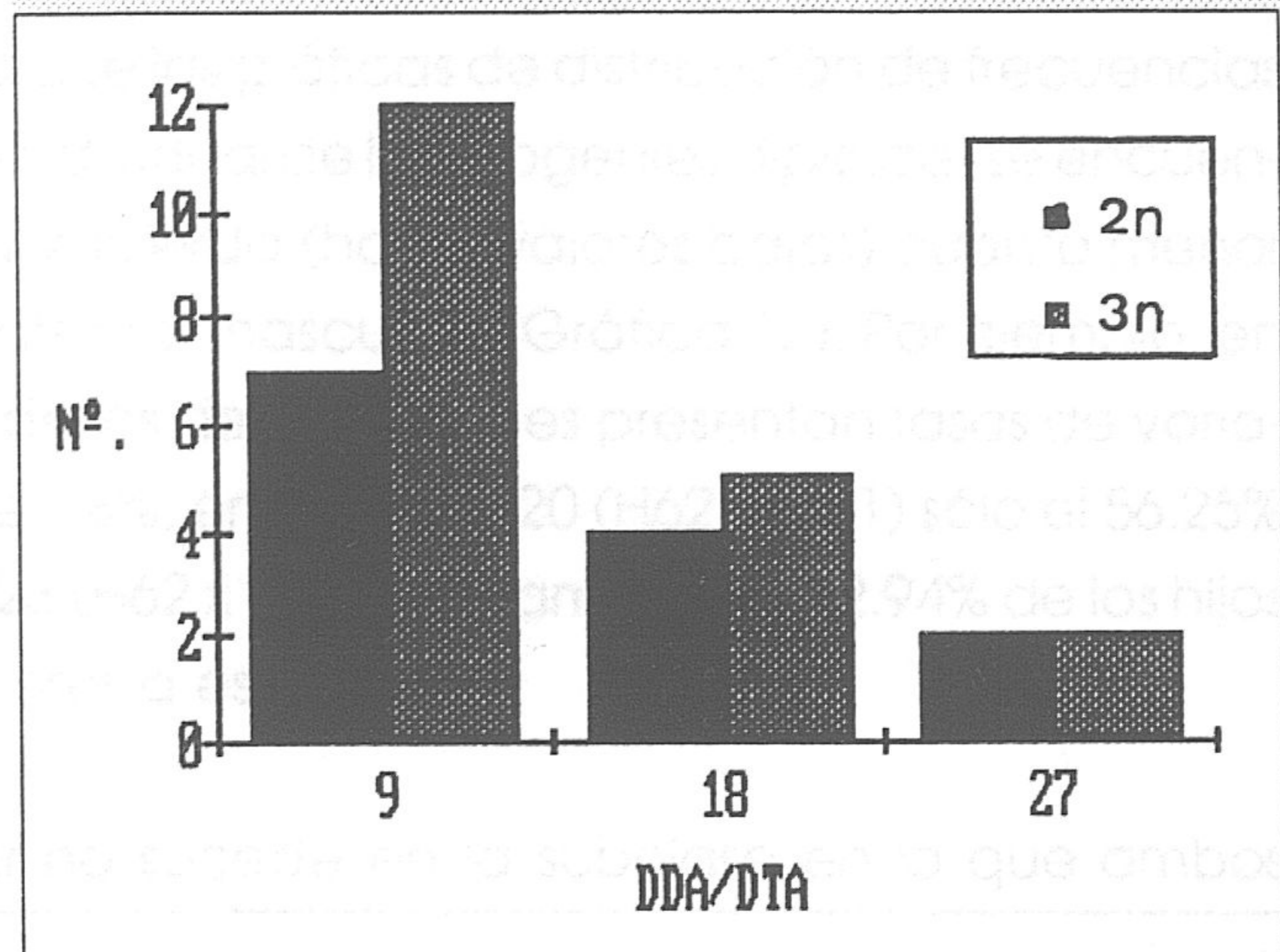
En la segunda clase de cruzamientos, la representada por aquellos en los que uno de los parentales no posee variabilidad intraindividual y el otro sí (clase "HA ó MA = 0"), el valor medio que presenta esta variable en la descendencia diploide es similar al del parental con variabilidad intraindividual; sin embargo, en la descendencia triploide dicho valor es bastante inferior, del orden del 20% menor cuando $MA=0$ y del 15% si $HA=0$. Una diferencia a hacer notar en relación al sexo del progenitor con valor cero de variabilidad intraindividual es que cuando éste es el macho (Gráfica 7), prácticamente el 100% de los descendientes presentan valores medios o bajos (menores del 18%) de variabilidad intraindividual mientras que cuando lo es la hembra (Gráfica 8), estas valores bajos de variabilidad están representados por algo más de la mitad de la descendencia (69.23%). A excepción de lo comentado, no parece existir ninguna otra diferencia importante entre los dos tipos de cruzamientos de esta clase.

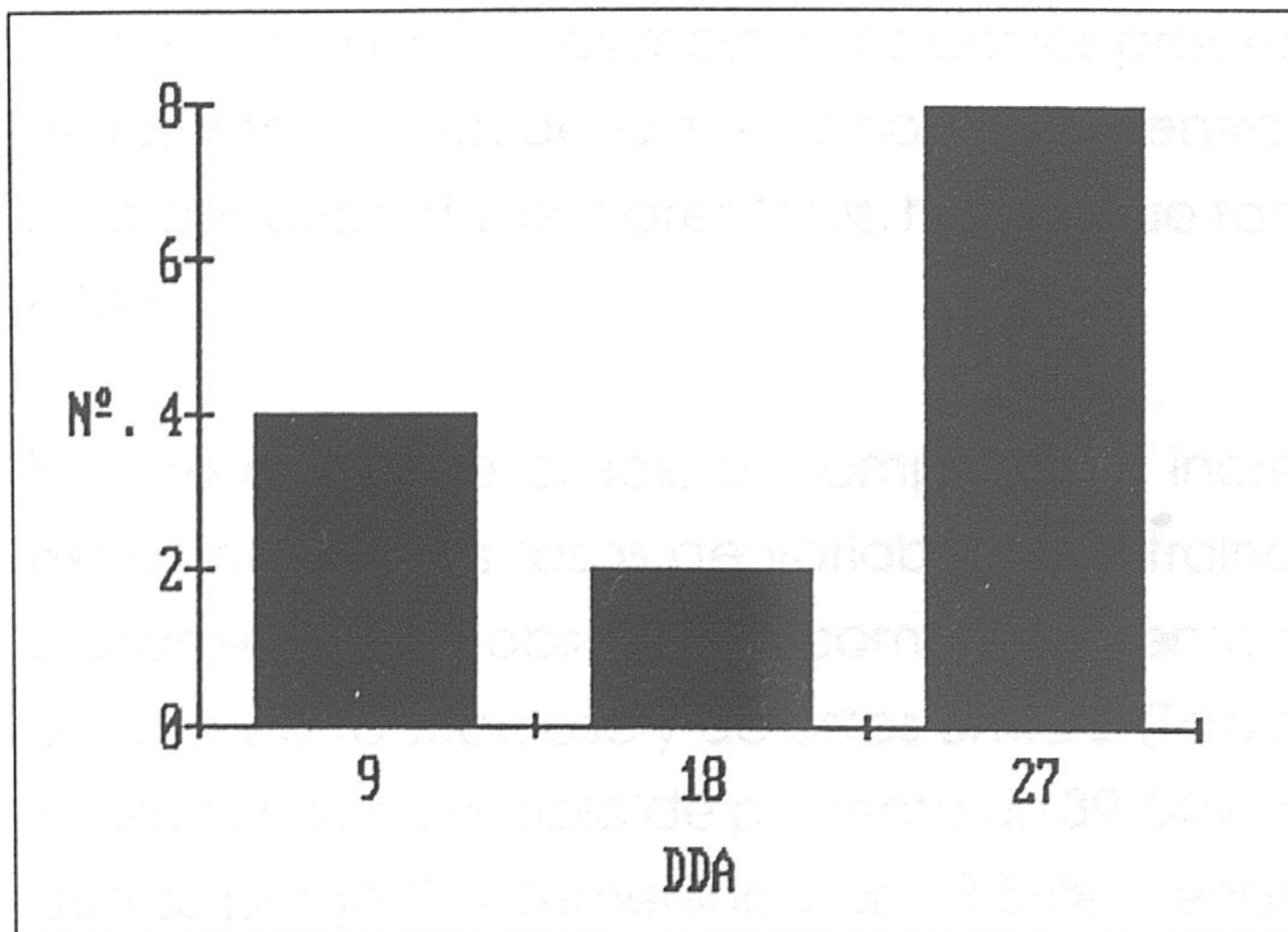
Al estar formada la tercera clase por aquellos cruzamientos en los que ambos progenitores presentan un determinado valor de variabilidad Intraindividual (clase "HA y MA > 0"), ésto nos obliga a subdividir a ésta en tres subclases, dependiendo de los valores relativos de HA y MA. Así, para los cruces 10, 11, 14, 15, 16 y 17; donde HA es menor que MA se establece la subclase "HA < MA", para los cruces 2, 5, 7, 9, 24 y 25 la subclase "HA = MA" pues HA y MA tienen valores similares y por último, y para los cruzamientos 8, 18, 19, 20, 21, 22 y 23, donde HA es mayor que MA, se establece la subclase "HA > MA". Describiremos a continuación las características propias y diferenciadoras de cada subclase.

Prácticamente todos los números cromosómicos están presentes en los progenitores de los cruces donde HA es mayor o similar a MA; sin embargo, en la subclase caracterizada por la superior tasa de variabilidad intraindividual del macho sólo aparecen representados los cruces en los que el genotipo de la madre es $2n < 61$ y el del padre $2n > 61$ (Tabla XII). Este tipo de relación no se mantiene, en ninguno de los sentidos, en las otras dos subclases. Además, es precisamente en este grupo de cruzamientos caracterizados por la superior tasa de variabilidad del progenitor masculino donde se encuentran los únicos apareamientos en los que los valores altos de este parámetro, en la descendencia



Gráficas 7 y 8. Distribución de la tasa de variabilidad intraindividual en las descendencias diploide (DDA) y triploide (DTA) del cruce 13 en el que $HA > 0$ y $MA = 0$ (gráfica 7, arriba) y del cruce 12 en el que $HA = 0$ y $MA > 0$ (gráfica 8, abajo).





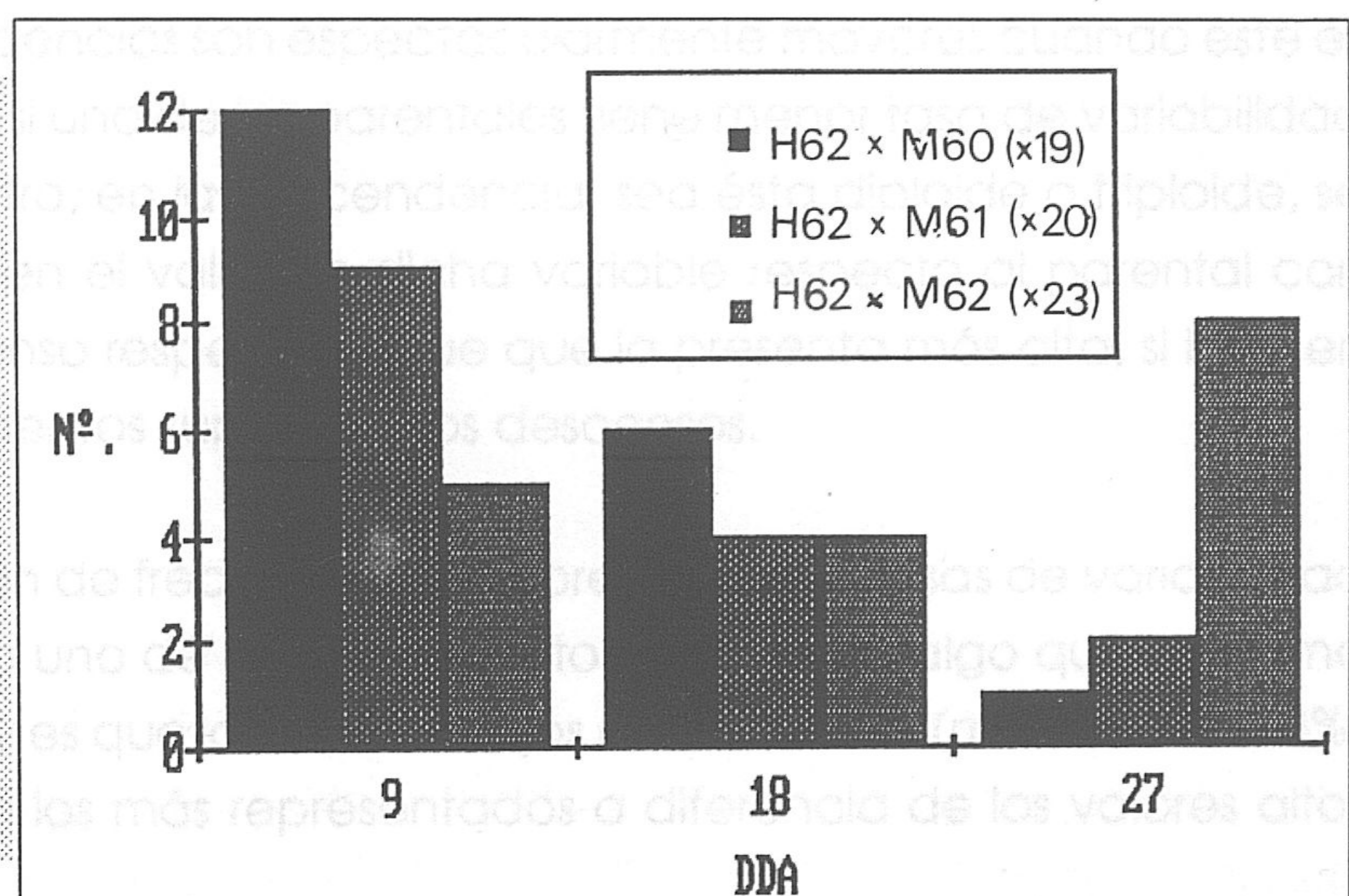
Gráfica 9. Distribución de la tasa de variabilidad intraindividual de la progenie diploide del cruce 11, en el que el progenitor masculino presenta mayor tasa de polimorfismo intraindividual que el femenino ($HA < MA$)

cia $2n$, son los más frecuentes (cruces 11 y 17, Gráfica 9).

En la subclase $HA > MA$ se observa que las gráficas de distribución de frecuencias de los valores de variabilidad intraindividual de las progenes diploides se encuentran tanto más sesgadas hacia la izquierda (hacia valores bajos) cuanto menor es el número cromosómico del parental masculino (Gráfica 10). Por ejemplo, en el cruce 19 (H62 x M60) el 94.74% de los descendientes presentan tasas de variabilidad intraindividual menores del 18%, en el cruce 20 (H62 x M61) sólo el 56.25% presenta este valor y en el cruce 23 (H62 x M62) únicamente el 52.94% de los hijos tienen tasas de variabilidad inferiores a este 18%.

Lo que acabamos de comentar no sucede en la subclase en la que ambos

Gráfica 10. Distribución de las tasas de variabilidad intraindividual de las progenes diploides (DDA) de distintos cruzamientos en los que la madre presenta un cariotipo con $2n=62$ cromosomas y el del padre varía desde $2n=60$ (cruce 19), $2n=61$ (cruce 20) y $2n=62$ (cruce 23)



progenitores poseen similares tasas de variabilidad intraindividual ($HA = MA$). En ésta, tal variable presenta, en ambas descendencias, valores cercanos o ligeramente superiores a los mostrados por los progenitores y por tanto, la distribución de las frecuencias de la misma no se encuentra asociada al número cromosómico o genotipo de los parentales, hecho que también es común a la subclase $HA < MA$.

En otro orden de cosas, al comparar los incrementos que, de padres a hijos, experimentan las tasas de variabilidad intraindividual en esta tercera clase de cruzamientos, se observa un comportamiento diferente de las progenes $2n$ y $3n$ de una y otra subclase y de éstas entre sí (Tabla XIII). Así, en la subclase $HA < MA$ la descendencia diploide presenta un 39.64% más de variabilidad intraindividual que su progenitor femenino y un 13.54% menos que el masculino; la misma tónica sigue la descendencia triploide sólo que con distintos porcentajes (19.20% más variabilidad que la madre y 26.20% menos que el padre). En la subclase $HA = MA$, y tanto en las progenes diploides como triploides, hemos detectado incrementos en dicha tasa de variabilidad, si bien éstos son de menor cuantía en las últimas. En ambas descendencias sin embargo, parece significativo el hecho de que se produzcan mayores incrementos respecto al parental masculino (31.33% y 26.04% respectivamente) que respecto al femenino (20.46% y 15.60% respectivamente). Por último, en la subclase $HA > MA$ las dos progenes siguen pautas contrarias a la primera subclase, es decir, se producen incrementos negativos en relación a la madre y positivos respecto al padre. A pesar de ello, se observa una diferencia significativa entre estas dos últimas subclases, a saber, los aumentos que, con respecto al progenitor con menor tasa de variabilidad intraindividual, presentan las respectivas descendencias son espectacularmente mayores cuando éste es el macho. En resumen, si uno de los parentales tiene menor tasa de variabilidad intraindividual que el otro, en la descendencia, sea ésta diploide o triploide, se produce un aumento en el valor de dicha variable respecto al parental con menor tasa y un descenso respecto al que que la presenta más alta, si bien en todos los casos los aumentos superan a los descensos.

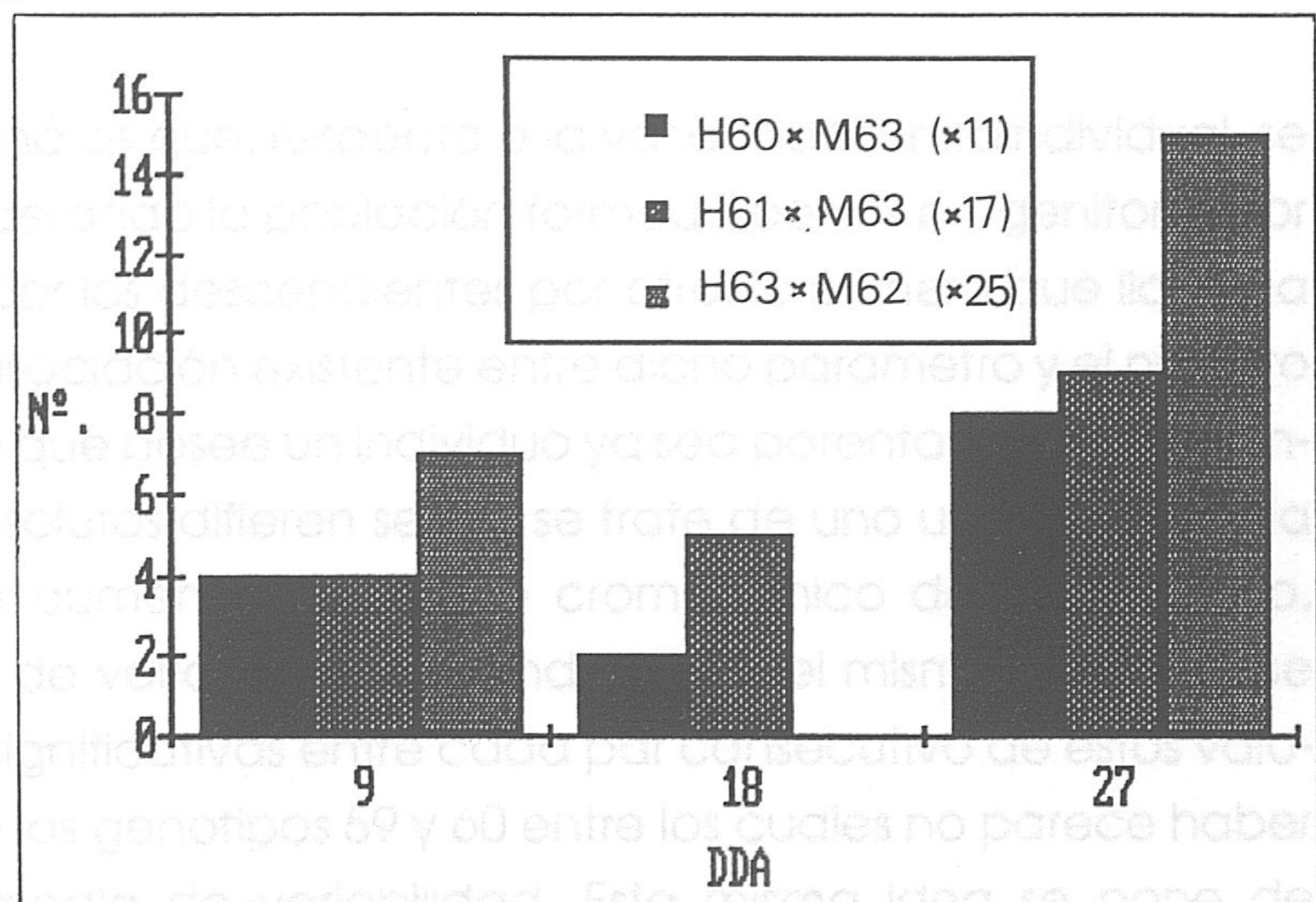
Al analizar la distribución de frecuencias que presentan las tasas de variabilidad intraindividual de cada uno de los cruzamientos se observa algo que es norma general en todos ellos y es que los valores bajos e intermedios (menores del 18%) de este parámetro son los más representados a diferencia de los valores altos

(superiores al 18%), poco o nada frecuentes. De hecho, y con la excepción de aquellos apareamientos en los que el genotipo de alguno de los progenitores es $2n=63$, de los que después hablaremos, tasas bajas o intermedias de variabilidad intraindividual las presentan entre el 55.56% y el 92.31% de los descendientes, dependiendo del cruzamiento en cuestión.

En relación con lo anterior, cabría esperar que en aquellos casos en los que ambos progenitores carecen de variabilidad intraindividual, la proporción de descendientes con valores bajos de dicho parámetro y principalmente de aquellos con valor 0, fuese significativamente más alta que en el resto de los cruzamientos. Sin embargo, en nuestra experiencia tal correlación no ha sido observada; aún más, en todos los cruces practicados aparecen descendientes con valores nulos de variabilidad intraindividual en distinta frecuencia, pero en ningún caso ésta se encuentra asociada al número cromosómico o a la tasa de variabilidad de los progenitores.

Como se comentó anteriormente, hay tres cruces en los que los valores de variabilidad intraindividual que aparecen con mayor frecuencia en las descendencias no son los correspondientes a valores bajos o intermedios sino los representados por los valores altos. Y son precisamente aquellos cruzamientos en los que uno de los progenitores presenta un cariotipo de $2n=63$ cromosomas. Así,

en los cruces 11 (H60 x M63), 17 (H61 x M63) y 25 (H63 x M62) más del 50% de los descendientes diploides presentan tasas de variabilidad intraindividual superiores al 18% (Gráfica 11), en concreto, el 57.14% de los hijos en el cruce 11, el 50.00% en el 17 y el 68.18% en el cruce 25. A este tipo de apareamientos pues, les sucede justo lo contrario que a los del tipo H60 x M60 donde la minoría de los des-



Gráfica 11. Distribución de las tasas de variabilidad intraindividual de las descendencias diploides (DDA) de los cruces 11, 17 y 25, en los que el cariotipo de uno de los progenitores es $2n=63$.

de los descendientes diploides presentan tasas de variabilidad intraindividual superiores al 18% (Gráfica 11), en concreto, el 57.14% de los hijos en el cruce 11, el 50.00% en el 17 y el 68.18% en el cruce 25. A este tipo de apareamientos pues, les sucede justo lo contrario que a los del tipo H60 x M60 donde la minoría de los des-

descendientes presentan valores altos de variabilidad, e incluso en dos de ellos (cruces 2 y 4) no aparece ningún hijo con dicho valor.

Otro aspecto interesante de señalar en este análisis es que las progenies triploides, en las tres clases consideradas, siguen pautas similares a las descritas para los diploides hasta el momento. Sin embargo, convendría destacar el hecho de que en la mayoría de los cruzamientos (Tabla XII) la tasa de variabilidad intraindividual de la descendencia triploide (DTA) es menor que la de la diploide (DDA). Esta observación general encuentra su excepción en los cruces 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24, en los que el genotipo materno es $2n=62$, ya que en todos ellos el valor de DTA es superior al de DDA aunque únicamente alcance significación estadística en el cruce 23.

De la comparación entre las progenies diploides y triploides pertenecientes a un mismo cruzamiento se puede concluir que, salvo en dos de ellos, la proporción de individuos que no presentan variabilidad intraindividual es mayor en las descendencias triploides que en las diploides si bien hay algunos cruces (7 de 25) donde dicha proporción es similar.

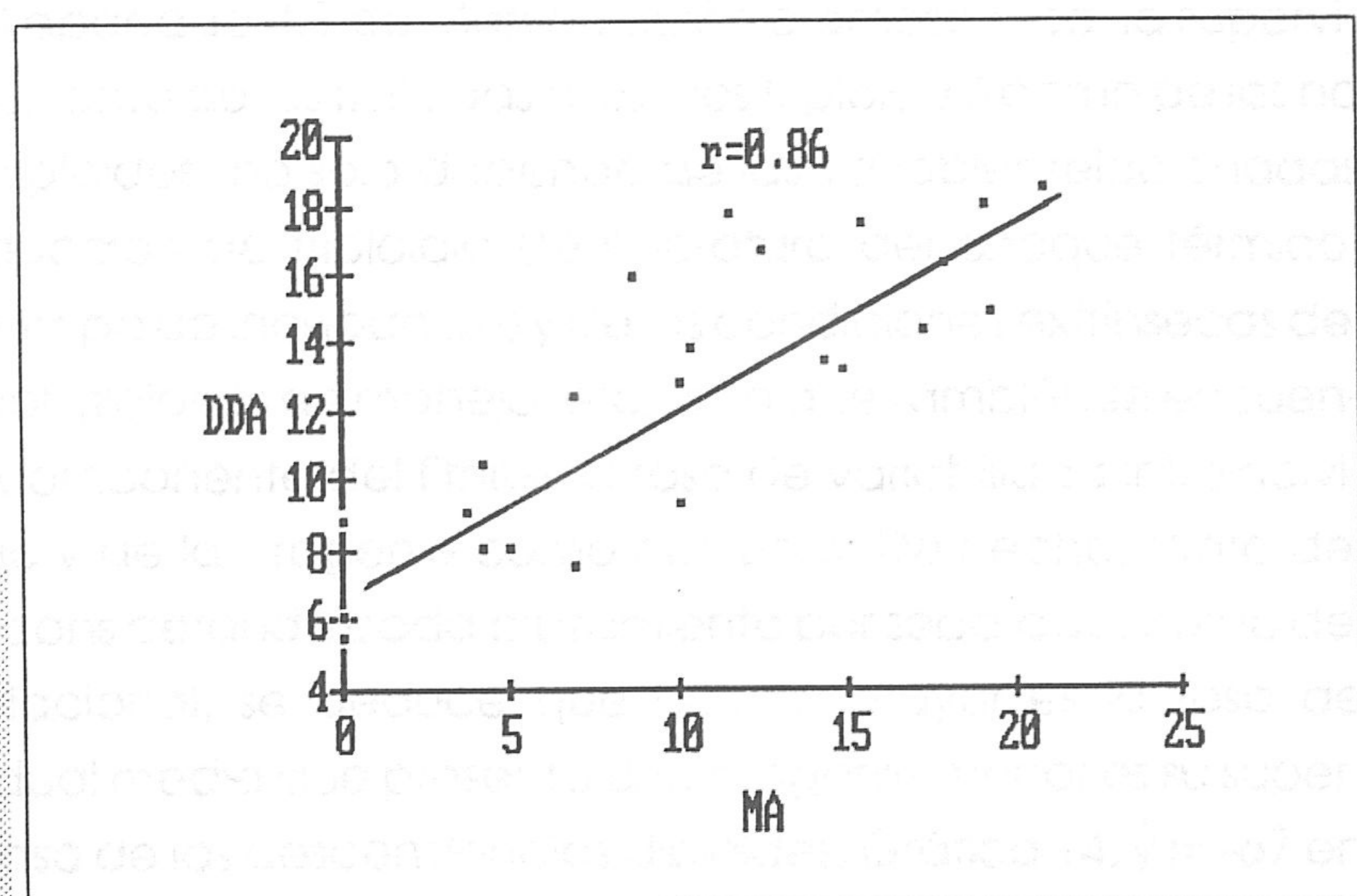
Por lo que concierne al análisis que, respecto a la variabilidad intraindividual, se ha llevado a cabo considerando la población formada por los progenitores por un lado y la constituida por los descendientes por otro, lo primero que llama la atención es la estrecha asociación existente entre dicho parámetro y el número cromosómico (genotipo) que posee un individuo ya sea parental o descendiente aunque los valores absolutos difieren según se trate de uno u otro (ver Tabla XIV). Así, a medida que aumenta el número cromosómico de un individuo, también lo hace la tasa de variabilidad intraindividual del mismo, habiéndose encontrado diferencias significativas entre cada par consecutivo de estos valores, con la excepción de los genotipos 59 y 60 entre los cuales no parece haber diferencias en la tasa media de variabilidad. Esta misma idea se pone de manifiesto tras el análisis de correlación (Tabla XV) y la recta de regresión efectuadas, pudiéndose observar el significativo valor de r que se obtiene al tratar de relacionar el número cromosómico de los parentales (H y M) con sus tasas de variabilidad intraindividual respectivas (HA y MA): 0.75 y 0.77 respectivamente.

Aunque es cierto, tal y como hemos comentado, que la tasa de variabilidad intraindividual de una determinada trucha es tanto más elevada cuanto mayor es su número cromosómico, ésta no deja de ser una apreciación general. Y es que realmente no existe un valor más o menos concreto de este parámetro asociado a cada número cromosómico; antes bien, la magnitud que la tasa de variabilidad toma en cada genotipo depende en gran medida de los valores que presentan los progenitores que la originaron. Es decir, que para un mismo número cromosómico, las variaciones en la tasa de variabilidad intraindividual vienen determinadas por los valores que ésta tiene en los parentales.

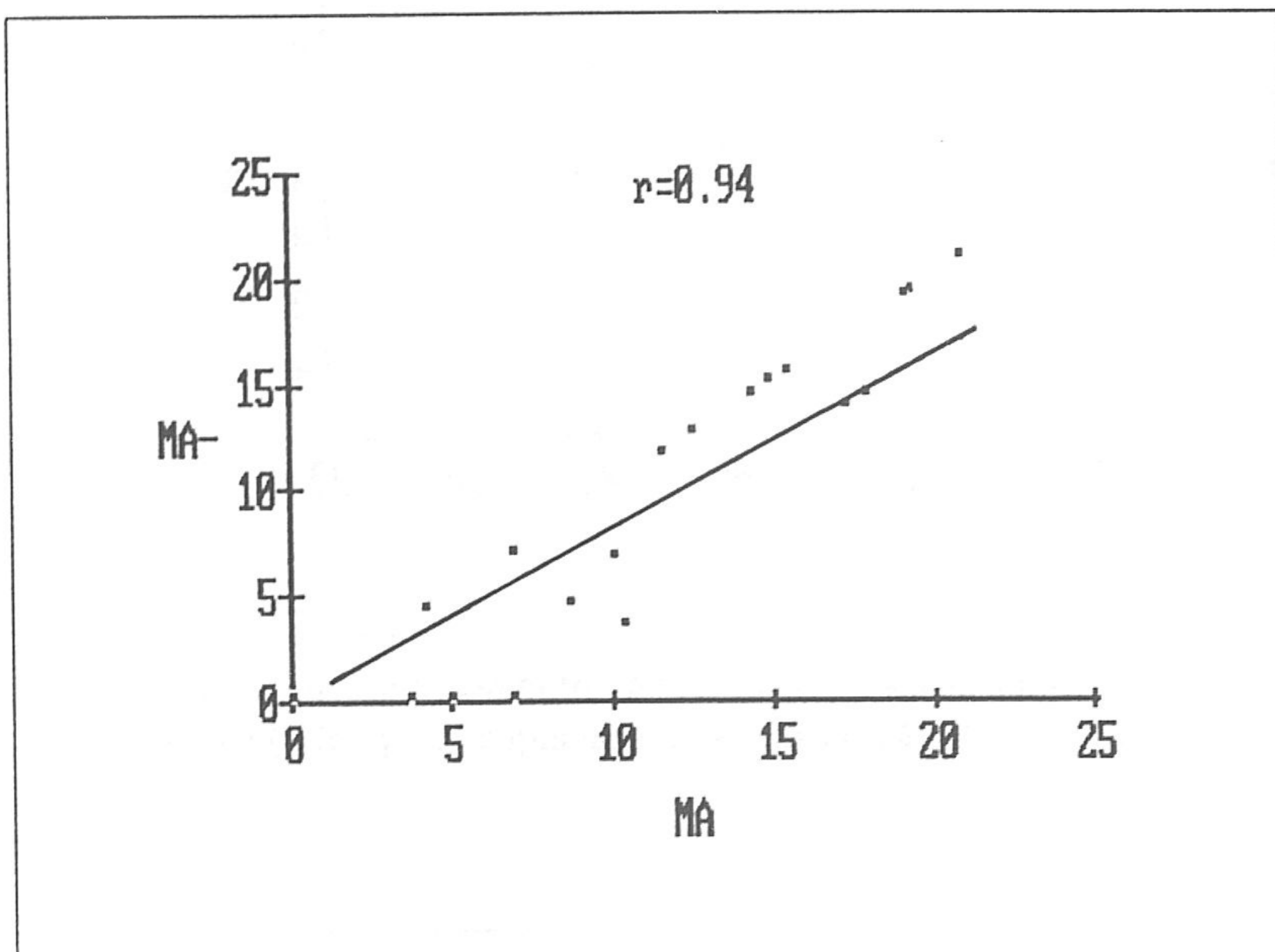
Por otra parte, al comparar los valores de padres e hijos correspondientes a cada uno de los números cromosómicos (59, 60, 61, 62 y 63) se observa (Tabla XIV) que las progenes presentan mayores tasas de variabilidad intraindividual que los progenitores que las originaron, y esto para cualquiera de los genotipos, si bien el único de los cinco en el que se aprecian incrementos significativos de una a otra generación es $2n=60$. Este último, por otra parte, coincide con el número cromosómico más frecuente en la población de estudio presentándolo el 40% de la generación parental y el 47.39% de la generación filial.

Este tipo de análisis también pone de manifiesto la alta correlación existente entre la tasa de variabilidad intraindividual del progenitor masculino (MA) y la de la descendencia, ya sea esta diploide (DDA, $r=0.86$) o triploide (DTA, $r=0.64$), correlación que aún mostrándose significativa en ambos parentales, es de menor magnitud en el femenino (0.45 y 0.54 respectivamente) tal y como puede observarse en la Gráfica 12.

Gráfica 12. Correlación entre la tasa de variabilidad intraindividual del progenitor masculino (MA) y la descendencia diploide (DDA).



Aunque desde otra perspectiva estadística quizás, este segundo tipo de análisis confirma el hecho de que la variabilidad intraindividual, tal y como la hemos definido en este trabajo, es un fenómeno unidireccional donde los números cromosómicos inferiores al modal son los más frecuentes. Se puede observar en este sentido (Tabla XV, Gráfica 13), el alto valor del coeficiente de correlación que aparece cuando se comparan las variables HA y HA- (0.94), MA y MA- (0.94), DDA y DDA- (0.91) y DTA y DTA- (0.96).

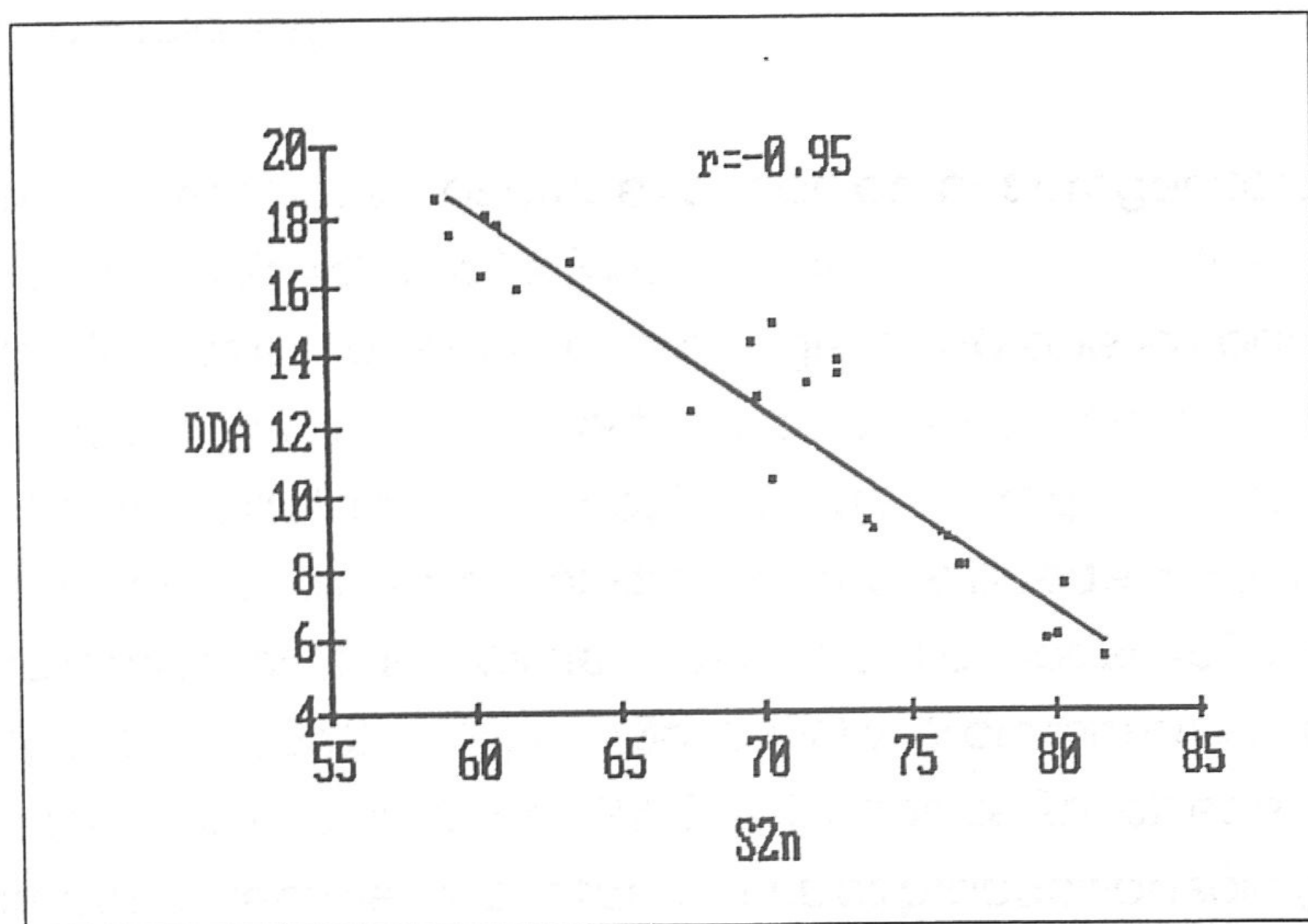


Gráfica 13.
Correlación entre la tasa de variabilidad intraindividual (HA, p.e.) y su existencia mayoritaria por defecto (HA-, p.e.) en la población de Orol (Lugo)

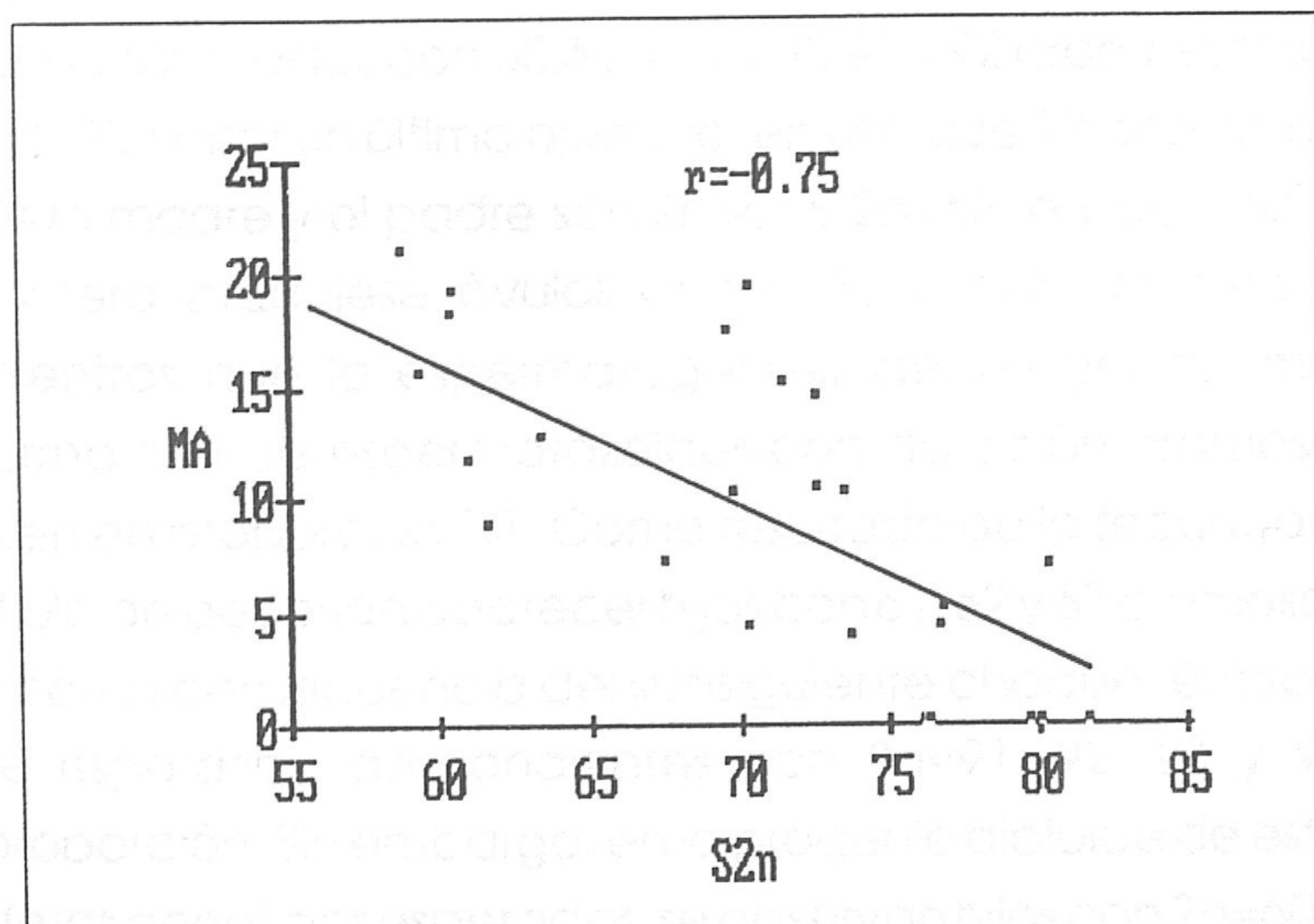
c) Influencia de la variabilidad intraindividual sobre la supervivencia

Tal y como se dijo en el apartado 4.1 de Manipulación cromosómica, la supervivencia de las progenies, tanto de las tratadas (posibles triploides) como de las no tratadas o controles (diploides) no sólo depende de las variables relacionadas con el método de inducción de triploidía (temperatura del choque térmico, duración del mismo y tiempo de incubación) y de las condiciones extrínsecas del cultivo (climatología, condiciones de manejo, etc), sino que también se encuentra implicada en esta componente del fitness la tasa de variabilidad intraindividual de cada individuo y de la progenie como conjunto. De hecho, tanto del análisis a nivel familiar, considerando cada cruzamiento por separado, como del realizado a nivel poblacional, se deduce que cuanto mayor es la tasa de variabilidad intraindividual media que presenta una progenie menor es su supervivencia ($r=-95$ en el caso de las descendencias diploides, Gráfica 14, y $r=-67$ en

el de las triploides). De igual manera, la tasa de variabilidad intraindividual de los progenitores incide directamente sobre la supervivencia de sus hijos; en este sentido se puede observar la negativa correlación existente entre HA y MA y la supervivencia de sus progenies diploides y triploides (Gráfica 15), si bien es más



Gráfica 14. Relación entre la tasa de supervivencia de una progenie (S2n) y su propia tasa de variabilidad intraindividual.



Gráfica 15. Relación entre la tasa de variabilidad intraindividual de los progenitores (MA) y la supervivencia de sus hijos (DDA).

significativa la relación del padre que de la madre.

4.2.1.4. Análisis de la variabilidad interindividual no esperada

a) Naturaleza y herencia

Por lo que respecta al polimorfismo cromosómico presente a nivel interindividual en esta especie, los resultados obtenidos acerca de su herencia figuran en la Tabla XVI. En ella se puede advertir que en cuatro de los cruces, los n^{os} 3, 6, 8 y 14 en las progenies diploides, y 3, 12, 14 y 15 en las triploides (todos ellos no marcados) los descendientes muestran los números cromosómicos esperados bajo la suposición de una meiosis regular en sus progenitores. Así por ejemplo, en el cruce 3, en el que ambos progenitores tienen un complemento diploide $2n=60$, todos los

descendientes diploides muestran 60 cromosomas y los triploides 90, tal y como se deduciría si dichos progenitores produjesen gametos con $n=30$ cromosomas. En cambio, en todos los demás cruzamientos aparecen descendientes con números cromosómicos no esperados según la misma hipótesis (marcados con círculo en la tabla XVI).

Así por ejemplo, en los cruces donde ambos progenitores poseen un número cromosómico $2n=60$ (H60 x M60: cruces n^{os} 2, 3, 4, 5, 6 y 7), toda la descendencia diploide debería tener el mismo genotipo que los parentales, suponiendo que todos los gametos que éstos produce poseen $n=30$ cromosomas; y de igual manera, la dotación cromosómica de la progenie triploide tendría que ser $3n=90$ en todos los casos. Sin embargo, como se puede apreciar en la Tabla XVI, en estos cruzamientos, además de hijos con cariotipos $2n=60$ y $3n=90$, aparecen otros no esperados con $2n=59$ y 61 y $3n=89$, 91 y 92 cromosomas respectivamente. De igual manera, en los cruces n^{os} 22, 23 y 24 donde $2n=62$ es el número cromosómico de ambos parentales, y por tanto ambos producirían sólo gametos con 31 cromosomas, se esperaría que la progenie diploide tuviese toda ella 62 cromosomas, y la triploide 93, ya que esta última se produce por la fusión del material hereditario procedente del oocito II y el 2^o corpúsculo polar en la hembra. Aunque en tales apareamientos se observan estos complementos, también surgen descendientes no esperados con 60, 61, y 63 y 90, 91 y 92 cromosomas respectivamente (Tabla XVI). Por citar un último ejemplo, en el cruce 17 donde los números cromosómicos de la madre y el padre son $2n=61$ y $2n=63$ respectivamente, se esperaría que la primera produjese óvulos con $n=30$ y $n=31$ cromosomas, en proporción 1:1 mientras que la espermatogénesis del progenitor masculino conduciría a la formación de espermatozoides con dotación cromosómica $n=31$ y $n=32$, también en proporción 1:1. Como resultado de la fecundación, en la descendencia diploide deberían aparecer hijos con 61, 62 y 63 cromosomas, en proporción 1:2:1, y como consecuencia del subsiguiente choque térmico, en la progenie triploide se esperarían descendientes con $3n=91$, 92, 93 y 94 cromosomas en igual proporción. Sin embargo, en la progenie diploide de este cruce, junto con alguno de los genotipos esperados, se observan hijos con $2n=60$ y $3n=90$ cromosomas, que no se esperarían de tales cruces (Tabla XVI). Este mismo razonamiento se debería seguir, y así lo hemos hecho, para cada uno de los 25 cruzamientos estudiados.

A nivel diploide, de los 21 cruzamientos que muestran variabilidad interindividual

no esperada en la descendencia, 14 de ellos (66.67% de los casos) la presentan total o mayoritariamente "por defecto", es decir, que en ellos tal polimorfismo está causado por la presencia de individuos con números cromosómicos menores que los esperados. En 2 de tales cruces (9.52%) la tasa de variabilidad interindividual por defecto es parecida a la que tiene lugar por exceso, y en los 5 restantes (23.81% de los casos) se puede hablar de polimorfismo "por exceso". Y un comportamiento igual sigue el nivel triploide.

Cuando se analiza cada cruzamiento por separado se observa que, en ambos niveles de ploidía, el polimorfismo cromosómico interindividual es tanto más por defecto cuanto mayor es el número cromosómico de los progenitores, especialmente el de la madre (Tabla XVI). En concreto cuando este último es 61 o mayor, se puede hablar con total evidencia de polimorfismo cromosómico por defecto, cosa que no siempre sucede cuando esta característica la presenta el macho. Además, en estos casos, los números cromosómicos hacia los que tienden los hijos son siempre $2n=60$ para el nivel diploide y $3n=90$ para el triploide, con la posibilidad de que puedan existir, junto a ésta, otras tendencias en algún cruzamiento concreto, pero no en general. Por el contrario, en los casos de polimorfismo cromosómico por exceso, e incluso en los que los valores por defecto y por exceso son similares, no existe una tendencia clara de los números cromosómicos polimórficos.

Por otra parte, cabría preguntarse si los números cromosómicos observados que coinciden con los esperados se ajustan a las previsiones mendelianas. En torno a esto se observa que realmente es así sólo en los cruces H60 x M60 (6/25=24%) en los que todos los hijos diploides presentan 60 cromosomas y los triploides 90. La mayoría (16/25=64%) incumple las previsiones hechas sobre la hipótesis de una segregación meiótica regular y sólo en tres de ellos (cruces 11, 12 y 25) los resultados observados se asemejan a los esperados.

En resumen, que además de las variantes esperadas en cada cruzamiento sobre la hipótesis de que la gametogénesis ocurre de forma regular en los progenitores, aparecen otras no esperadas según este supuesto y cuya frecuencia figura en la Tabla XVI (rodeados por circunferencia). Esta última es la que hemos denominado como variabilidad interindividual o polimorfismo cromosómico no esperado.

Además, las variantes esperadas que sí se observan no lo hacen en las proporciones mendelianas que cabría esperar.

Pero hay más, y es que bajo el mismo supuesto, cabría esperar la presencia de individuos con determinados números cromosómicos que, por el contrario, no han sido detectados en alguna de las genealogías (rodeados con un rombo en la Tabla XVI). Se trata pues de individuos que deberían aparecer y no lo hacen, tal y como sucede en el cruce nº 17 en el que no figura ningún descendiente triploide con 94 cromosomas, o en el cruce nº 12 donde no se observó ningún hijo con $2n=59$ cromosomas como sería de esperar. Algo similar también sucede en los cruces nºs 1, 8, 14, 15, 20 y 25, sobre todo en las progenies triploides.

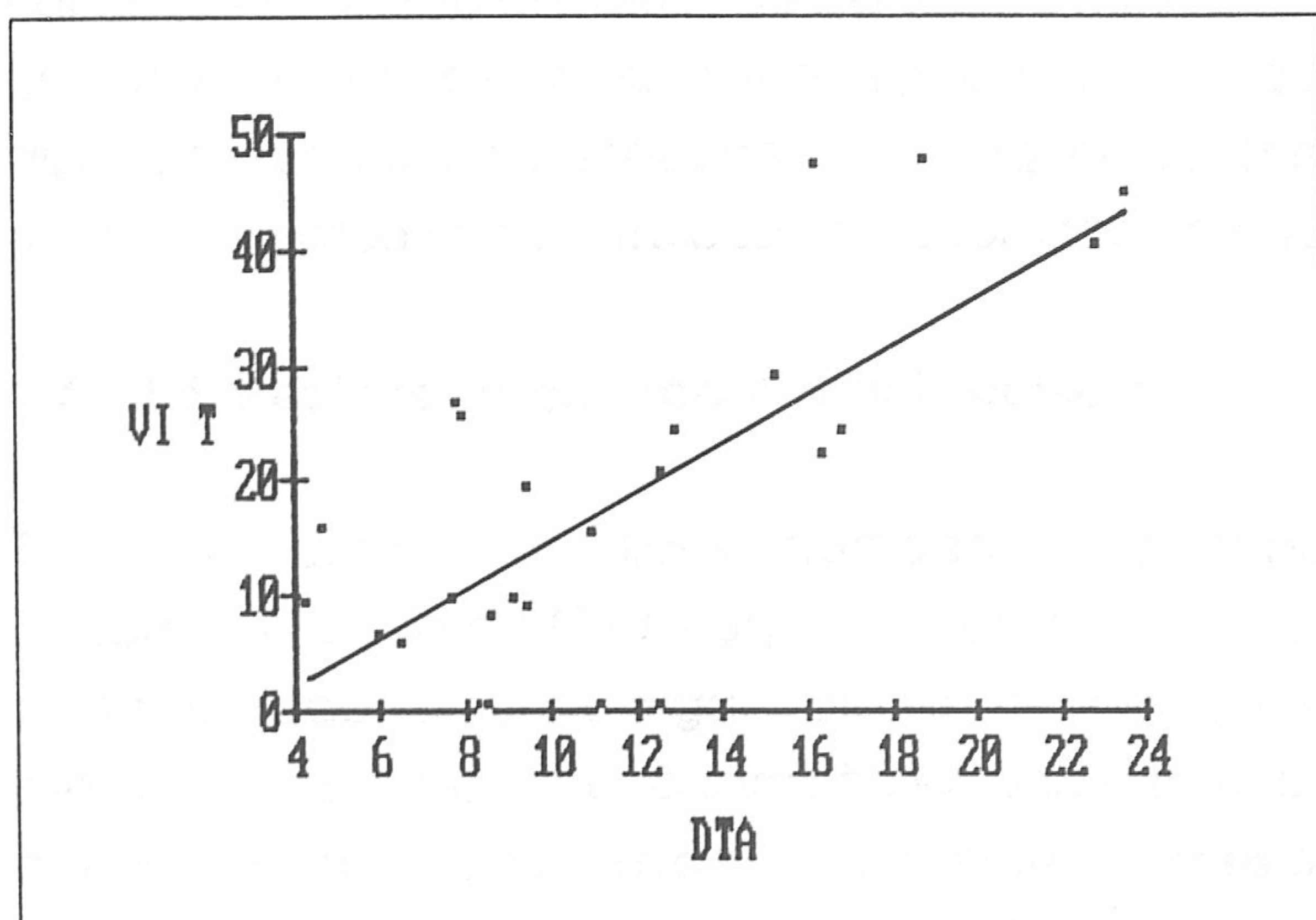
Habría por último que constatar que, en términos generales, las progenies triploides siguen pautas similares a las descritas para las diploides en lo que se refiere a la herencia del polimorfismo cromosómico a nivel interindividual. A pesar de ello, dos diferencias entre ambas merecen ser citadas: 1) algunos cruzamientos, concretamente los nºs 12 y 15, presentan variabilidad interindividual a nivel diploide que luego no se observa a nivel triploide, y a la inversa, algunas progenies diploides tienen un valor nulo de VID que sin embargo no se manifiesta en sus hermanos triploides (cruces nºs 6 y 8), y 2) en otras familias el sentido del polimorfismo se invierte total o parcialmente al pasar de uno a otro estado poliploide, pudiendo ser por defecto en la progenie diploide y por exceso en la triploide (cruces nºs 2, 5 y 10) o a la inversa (cruces nºs 1, 16, 18, 19, 21 y 24).

c) Influencias y relaciones de la variabilidad interindividual

En relación a la tasa de polimorfismo cromosómico no esperada (variabilidad interindividual) presente en una determinada genealogía, se deduce, a partir del análisis de correlación simple llevado a cabo, que cuanto mayor es ésta menor es la supervivencia, si bien el valor del coeficiente de correlación sólo es estadísticamente significativo para las progenies diploides ($r = -0.46$).

De igual forma, es apreciable la estrecha asociación existente entre ambas tasas de variabilidad cromosómica, la que se manifiesta a nivel intraindividual (DDA y DTA) y la presente a nivel interindividual (VID y VIT), siendo los valores de r de 0.50

para las progenies diploides y 0.74 para las triploides (Gráfica 16).



Gráfica 16. Correlación entre las tasas de variabilidad cromosómica intraindividual e interindividual a nivel triploide, por ejemplo (DTA/VIT).

4.2.1.5. Bando C

La técnica de bandas C no permite el correcto emparejamiento de todo el complemento diploide de la trucha arco-iris. No obstante, algunas características peculiares se pueden detectar con esta técnica, todas ellas relacionadas con la presencia de regiones heteroploicóticas positivas constituidas por heterocromatina. Como se observa en la Fig. 6a, la mayoría de los cromosomas metacéntricos presentan una banda C centromérica, especialmente visible en uno de los pares pequeños (par M). Además de éste, otros dos pares cromosómicos destacan sobre el resto, el satelitífero (S), en el cual se observa una banda oscura cerca de la constricción secundaria, que abarca a casi todo el brazo cromosómico, y el par subtlocéntrico (ST) en el que aparecen bastante nítidas dos bandas pericentroméricas, si bien en ocasiones, de esta pareja, sólo se encuentra presente uno de sus componentes. En cuanto a las zonas teloméricas, en pocas placas metafásicas se han podido observar zonas heterocromáticas en esta posición en cromosomas metacéntricos, sí en algún par telocéntrico.

Este patrón de bandas C que acabamos de describir es común a todos los números cromosómicos analizados, concretamente 58, 60, 61 y 63, no habiéndose observado ninguna diferencia entre ellos atribuible a diferencias en el número de cromosomas.

Por lo que se refiere al patrón de bandas C mostrado por los individuos triploides únicamente mencionar que éste sigue el mismo comportamiento que en los diploides aunque en ciertas ocasiones, alguno de los miembros de los pares antes mencionados se encuentra ausente, sobre todo el relativo al par subtlocéntrico.

4.2.1.6. Regiones organizadoras del nucleolo

Todos los individuos diploides estudiados, 23 de la población de Benamahoma (Cádiz) y 19 de la de Orol (Lugo), presentaron una sólo pareja de cromosomas portadores de regiones organizadoras del nucleolo (NOR). Se trata de un par metacéntrico de pequeño tamaño en uno de cuyos brazos se sitúa la constricción secundaria con afinidad para retener los iones de plata, y por tanto mostrar tinción positiva con esta técnica (Fig.6b). Aunque dicha constricción es intersticial, los NORs suelen observarse en la mayoría de las ocasiones en posición terminal debido probablemente a que los depósitos de plata se solapan con las regiones satelitíferas.

Estas mismas regiones organizadoras del nucleolo se corresponden con las bandas C que tan claramente aparecían en uno de los brazos de la pareja satelitífera (par S), aunque no hemos podido comprobar si tales bandas C se encuentran a ambos lados de los NORs, como cabría esperar, o si por el contrario ocupan tanto la constricción secundaria como las propias zonas adyacentes.

En lo referente a los triploides (Fig.7), los 25 individuos analizados (15 de Benamahoma y 10 de Orol) muestran un alto grado de polimorfismo relacionado tanto con el número como con la morfología de los cromosomas portadores de NORs, llegándose a manifestar incluso esta variabilidad a nivel intercelular dentro de un mismo individuo. En cualquier caso, aparecen tres tipos cromosómicos distintos relacionados con la actividad NOR: el que llamamos tipo M_1 , que coincide con la pareja observada en los ejemplares diploides, es un cromosoma metacéntrico con el NOR en posición terminal; el tipo M_2 es también metacéntrico, de menor tamaño y en él esta región se sitúa terminalmente, mientras que el tipo M_3 es un cromosoma más grande que los anteriores, también metacéntrico, pero a diferencia de los tipos M_1 y M_2 presenta el NOR en posición intersticial. Si bien los tipos M_1 y M_2 están también presentes en los cariotipos diploides de esta especie,

no sucede lo mismo con el tipo M_3 , el cual sólo ha sido puesto de manifiesto en individuos triploides de la misma.

El número de NORs por célula triploide varía entre 2 y 4, siendo este último es el más frecuente (Tabla XVII). Sin embargo, no todas las combinaciones que cabría esperar han sido observadas en nuestro estudio. Así, cuando son 2 el número de NORs/célula, éstos siempre pertenecen uno al tipo M_1 y otro al M_2 (Fig.7a); en cambio, si son tres, pueden observarse dos combinaciones, $2 M_1 + 1 M_2$ (Fig.7b), $2 M_1 + 1 M_3$ (Fig.8c) o bien $3 M_1$ (Fig.7c), y en el caso de metafases con 4 NORs, éstos presentan la combinación $2 M_1 + 1 M_2 + 1 M_3$ (Fig.7d). Las distintas variantes junto con sus frecuencias en ambas poblaciones figuran en la Tabla XVII. Como se puede observar en la misma tabla, el número de nucleolos/célula aumenta significativamente conforme lo hace el número de NORs, e incluso en el caso concreto de existir 3 NORs, el número de nucleolos es significativamente mayor en la primera que en la segunda de las combinaciones descritas.

4.2.1.7. Fluorescencia

a) Cromomicina A_3 /distamicina A

Al contrario de lo que sucede en otras especies animales, la cromomicina A_3 (CMA) no produce un patrón diferenciado de bandeo cromosómico. Únicamente dos clusters brillantes CMA/DA⁺ se observan en la mayoría de las metafases diploides coincidiendo con las regiones organizadoras del nucleolo y con las mismas bandas de heterocromatina constitutiva del par satelitífero (Fig.6c). Los demás cromosomas o no son portadores de bandas CMA⁺ o si las poseen, apenas son perceptibles, y siempre en alguno de los centrómeros correspondientes a cromosomas metacéntricos de gran tamaño. Esto pone de manifiesto que casi todas las bandas centroméricas heterocromáticas detectadas con bandeo C no se tiñen positivamente con CMA debiéndose suponer que en ellas no abundan los pares de bases CG.

b) DAPI/actinomicina D

En cambio, el tratamiento con este otro fluorocromo sí que demuestra la existencia de regiones ricas en pares adenina-timina. En los ejemplares diploides (Fig.6d)

se observan con nitidez bandas DAPI/AMD⁺ en dos pares de cromosomas metacéntricos, uno mediano y otro pequeño, lo que los hace perfectamente reconocibles. De igual manera, una banda brillante se circunscribe al centrómero del par subtelocéntrico. Además, entre ocho y doce cromosomas (dependiendo del estado de condensación de la metafase), todos ellos metacéntricos, muestran tinción DAPI⁺ en las regiones centroméricas, las cuales podrían coincidir con las bandas de heterocromatina detectadas mediante bandeo C. El resto de los cromosomas tienen un comportamiento neutro para este fluorocromo.

Tras el tratamiento secuencial Ag-NOR + DAPI/AMD hemos podido comprobar que los NORs de la trucha arco-iris, tal y como se esperaba, son DAPI⁺ en el caso de los cariotipos estándar (diploides). En los triploides sin embargo, la tinción con este fluorocromo depende del citotipo NOR en cada caso. Así, cuando sólo hay dos NORs, éstas se muestran DAPI negativas; los individuos con tres NORs, presentan tinción negativa si son de citotipo 3 M₁ (Figs.8a y b), pero si la combinación para dichas regiones incluye al cromosoma metacéntrico que aparece de nuevo con actividad NOR (M₃), éste no presenta un comportamiento DAPI⁺, como los otros dos portadores de NORs, sino que es neutro para este tipo de tinción (Figs.8c y d). El resto de cromosomas siguen pautas similares a los del cariotipo diploide.

4.2.1.8. Bando mediante enzimas de restricción

Distintas preparaciones de cromosomas mitóticos fueron sometidas a la acción de varias endonucleasas con diferentes dianas de reconocimiento. Tales endonucleasas, la concentración empleada para cada una de ellas, así como la respuesta al bandeo cromosómico figuran en la Tabla III. De los siete enzimas ensayados, la digestión con cuatro de ellas, Alu I, Hinf I, Hae III y Mbo I, mostró un patrón de bandeo bastante similar (Fig.9a,b y c). Por el contrario, el tratamiento con Rsa I y Dra I, ambas con dianas A/T, no produjo diferenciación longitudinal alguna de los cromosomas tratados (Fig.9d), a pesar de que en ocasiones es apreciable cierto bandeo causado probablemente por el tampón ya que la misma observación estaba presente en las preparaciones control. Por último, la acción de la Bgl II apenas si se traduce en bandeo alguno, tan sólo y no de manera reproducible pudimos observar 4 ó 5 cromosomas metacéntricos en los que el centrómero destaca ligeramente sobre el resto del cromosoma.

En cuanto al patrón de bandeo generado por dichos enzimas, en general, éste se asemeja bastante al bandeo C descrito anteriormente. Sin embargo, tres diferencias merecen ser destacadas. Por un lado, mientras que el tratamiento con hidróxido de bario evidencia claramente bandas heterocromáticas situadas principalmente en los centrómeros, la digestión con algunas endonucleasas de restricción, concretamente Alu I, Hinf I, Hae III y Mbo I, origina un patrón en el cual tales regiones centroméricas aparecen más difusas mientras que son nítidamente visibles bandas teloméricas resistentes a la acción enzimática (heteropictóticas positivas) en casi todos los cromosomas (Figs.9a). En segundo lugar, la mayor de las bandas C⁺ del cariotipo de la trucha arco-iris, situada en la pareja NOR (par S), no está presente tras la digestión con los cuatro enzimas mencionados anteriormente (Fig.9). Sí se mantiene sin embargo la banda heterocromática centromérica del par M. La tercera diferencia entre ambos tipos de bandeos reside en el hecho de que la digestión con determinadas restrictasas permite detectar algunas bandas centroméricas que no son observables mediante bandeo C.

En otro orden de cosas, el empleo de endonucleasas de restricción pone de manifiesto la existencia de algunos polimorfismos cromosómicos posiblemente relacionados con las frecuentes reordenaciones cromosómicas de tipo robertsonianas presentes en *Salmo gairdneri*. Así por ejemplo, el par de cromosomas submetacéntricos grandes suele presentar en ocasiones un banda centromérica resistente a la digestión, pero no en otras, e incluso puede faltar uno de los miembros del par (Figs.9b,c y d). De igual forma, ésta y otras variaciones estructurales también afectan a los ejemplares triploides. En ellos por ejemplo, el número de cromosomas metacéntricos pequeños que poseen una banda centromérica nítida (par M) puede variar entre 2 (Fig.9a) y 3, e igual sucede con la pareja subtelo-céntrica (par T).

4.2.2.- Caracterización citogenética del salmón coho

4.2.2.1. Descripción del cariotipo

El cariotipo diploide del salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) se compone de 60 cromosomas (Figs. 10 y 12), de los cuales las 10 primeras parejas son metacéntricas

o submetacéntricas de gran tamaño, del par 11 al 20 son metacéntricas y submetacéntricas pero de tamaño mediano, mientras que las 10 restantes (21-30) son de pequeño tamaño. De entre estas últimas, las nº 21, 22 y 30 son submetacéntricas y el resto (23-29) subtlocéntricas y telocéntricas. El número de brazos cromosómicos es de 106 en todas las células estudiadas. La tinción convencional de Giemsa sólo puede distinguir fiablemente los pares subtlocéntricos 5, 9, 21 y 22, pudiendo existir cierta confusión incluso entre los dos últimos. En una de las parejas metacéntricas medianas, que nosotros hemos numerado como par 15, se percibe en ocasiones la presencia de una constricción secundaria o duplicaciones de ésta, pudiendo existir cierta heterocigosidad para el tamaño de tales discontinuidades.

Si bien el cariotipo que acabamos de describir se puede considerar como el estándar para esta especie, hemos de mencionar que entre los individuos analizados aparecen dos variantes respecto al mismo. Por un lado, algunos especímenes presentan un sólo cromosoma submetacéntrico de gran tamaño que no tiene su homólogo entre los restantes del complemento, además de 19 cromosomas pequeños en lugar de 20. La segunda variante cariotípica viene determinada por la presencia de individuos con un cariotipo semejante al estándar pero que a diferencia de este contiene 21 cromosomas pequeños en vez de los 20 esperados (véanse los resultados y figuras de bandeo C, apartado 4.2.2.2)

El complemento triploide lo componen 90 cromosomas (NF=159), 69 metacéntricos y submetacéntricos y 21 subtlocéntricos y telocéntricos de pequeño tamaño, como era de esperar (Fig. 11).

4.2.2.2. Bando C

En el genoma del salmón coho, las zonas heterocromáticas se encuentran localizadas esencialmente en las regiones centroméricas de todos los pares cromosómicos del complemento (Figs. 13a y b y 14a y b). No obstante, la intensidad con que las bandas se colorean tras la tinción con Giemsa varía de unos cromosomas a otros, destacando por su tamaño y nitidez las correspondientes a las parejas 7, 16 y 18 (Fig. 13b). Asimismo se observan algunas bandas teloméricas muy tenues a excepción del par 27, portador de una región telomérica C⁺ fuertemente heteropicnótica. Pero es el par 15, metacéntrico, el que se muestra

con mayor claridad en el cariotipo de bandas C (Fig.13b). Dicha pareja, de manera análoga a como sucedía en la trucha arco-iris, presenta una gran región heterocromática ocupando casi todo un brazo cromosómico si bien ésta nunca incluye al centrómero. Es más, tal marcador se encuentra presente en estado polimórfico en la población de Orol (Lugo). Concretamente, el 30.56% de los individuos poseen dos cromosomas homólogos portadores de sendas regiones heterocromáticas, mientras (Figs. 13a y b) que el resto son heterocigotos para dicha región ya que en ellos se observa un cromosoma metacéntrico como el descrito y otro, de menor tamaño y submetacéntrico/subtelocéntrico en el que prácticamente todo el brazo corto es heterocromático (Figs. 14a y b). En ambos tipos cromosómicos, la banda C heterocromática nunca llega a alcanzar a la región centromérica. Es importante hacer notar que, junto a la homología que acabamos de señalar entre ambos cromosomas, existe otra, y es la gran similitud en tamaño y forma del brazo eucromático de ambos cromosomas. Hemos observado además, que los individuos que caracterizan las dos variantes cariotípicas descritas anteriormente son siempre precisamente heterocigóticos para este polimorfismo (Figs. 14a y b).

Por lo que respecta a los triploides obtenidos mediante choque térmico, éstos son portadores de una similar heterocigosidad estructural para dichas bandas C si bien ésta no parece constituir un polimorfismo cromosómico por cuanto todos los individuos analizados presentan idéntico citotipo. En el complemento cromosómico de tales salmones triploides se observan tres cromosomas metacéntricos portadores de una amplia región heterocromática positiva que se extiende por casi todo un brazo cromosómico. Los tres tienen en común el poseer un brazo eucromático de idéntico tamaño y morfología así como el hecho de que la región heterocromática del otro brazo comienza después del centrómero y en el mismo lugar, y se prolonga hasta la zona telomérica terminal de los tres cromosomas. No obstante, este brazo heterocromático es de mayor longitud en uno de ellos, no habiéndose observado por tanto, ejemplares triploides que llevasen algún cromosoma submetacéntrico similar al descrito para los diploides heterocigotos, si bien la muestra analizada quizás haya sido insuficiente ($n=11$ individuos) y no permita afirmar que dicho cromosoma esté ausente en la población muestreada.

4.2.2.3. Regiones organizadoras del nucleolo

Todos los individuos diploides analizados mostraron un cariotipo con dos cromosomas portadores de sendas regiones de organizador nucleolar. Sin embargo, y a diferencia de la trucha arco-iris, no siempre parecían pertenecer al mismo par cromosómico, observación que nos permite hablar de polimorfismo cromosómico para la posición y tamaño de los NORs en *Oncorhynchus kisutch*. En este sentido, se encontró que en un 30.56% de los individuos estudiados con esta técnica, las regiones teñidas con plata se sitúan en una pareja de cromosomas metacéntricos de tamaño mediano, justamente en el par 15 (Figs.15 y 17) a diferencia del resto de individuos (69.44%) en los que dichas zonas se encuentran sobre cromosomas distintos, uno metacéntrico similar a los anteriores y otro submetacéntrico/subtelocéntrico en el que el NOR ocupa una región proximal del brazo corto (Fig.16). Parece probable por tanto que las regiones organizadoras del nucleolo estén situadas en los mismos cromosomas, y en la misma posición, en los que se observan los bloques heterocromáticos descritos con anterioridad. En este sentido, el 30.56% correspondería a individuos homocigóticos mientras que el porcentaje restante sería heterocigoto para la posición y tamaño de los NORs.

Por otra parte, aún en el caso de que los NORs se encuentren en estado homocigótico, éstos no se localizan en la misma posición en ambos cromosomas metacéntricos, pudiéndose observar cómo uno de ellos se sitúa intercaladamente, dejando una pequeña región satelitífera distal mientras que el otro lo hace en posición claramente terminal (Fig.15 y 17). Mas aún, el NOR intersticial se suele manifestar como un NOR una o varias veces duplicado, razón por la cual el brazo cromosómico portador adquiere en ocasiones un aspecto escaleriforme tras la impregnación argéntica (Fig.16).

Es importante dejar claro que ninguna de las heterocigosis descritas se haya relacionada con el sexo del animal que las porta, presentándolas indistintamente machos y hembras de la misma población lo cual permite descartar la idea de que tales anomalías fueran consecuencia de un posible heteromorfismo que afectara a los cromosomas sexuales del salmón coho, cromosomas que, por otra parte, no han sido identificados en esta especie.

En lo que concierne a los ejemplares triploides, los cistrones ribosómicos se encuentran normalmente en tres cromosomas metacéntricos pero con distinta localización en cada uno de ellos (Figs. 18a y 19a). Dos de estos son los mismos metacéntricos descritos para los diploides y en los que las regiones NOR se encuentran en posiciones intersticial y terminal respectivamente. Pero quizás lo más llamativo sea la aparición en estos poliploides artificiales de un tercer cromosoma NOR no detectado en los individuos normales. Se trata de un cromosoma metacéntrico de gran tamaño, mayor que los anteriores, con el NOR siempre en posición pericentromérica (Fig. 18a y 19a).

El número medio de nucleolos por célula es 1.63 ± 0.07 en los diploides y 2.75 ± 0.10 en los triploides ($t_s = 9.175$, $p < 0.005$).

4.2.2.4. Fluorescencia

a) Cromomicina A3/distamicina A

El tratamiento con esta combinación de antibióticos fluorescentes permite la identificación exacta de dos cromosomas en el complemento diploide, por presentar éstos la práctica totalidad de uno de los brazos, el pequeño en el caso de ser submetacéntrico o uno de mayor longitud si se trata de un cromosoma metacéntrico, con tinción fluorescente positiva respecto al resto del cariotipo. Tras la tinción con CMA de metafases previamente tratadas con nitrato de plata se puede comprobar que tales regiones CMA_3/DA^+ se sitúan en los mismos brazos cromosómicos que portan los NORs; exactamente se disponen a ambos lados de la constricción secundaria flanqueando así los depósitos de plata, si bien esta última observación sólo aparece clara cuando la constricción se encuentra poco condensada.

En los salmones triploides, la diferencia más significativa respecto al cariotipo estándar es la aparición de un cromosoma metacéntrico que muestra uno de los brazos CMA^+ . Este cromosoma, que no aparece en los ejemplares diploides, se corresponde con el portador de un nuevo NOR activo en los triploides, tal y como se deduce tras la tinción secuencial NOR/CMA (Figs. 18a y b), la cual también pone de manifiesto que en este brazo existen realmente dos regiones CMA^+ rodeando a la constricción secundaria con actividad NOR (Figs. 18a y b).

b) DAPI/actinomicina D

Por el contrario, este tipo de tinción no permite la identificación de ninguno de los pares cromosómicos que componen el cariotipo del salmón por cuanto todos ellos presentan un comportamiento neutro al ser teñidos con esta técnica. Y ello incluye a los cromosomas NOR, ya que en metafases en las que con anterioridad se habían localizado dichos cromosomas no se visualiza ninguna pareja que fluoresca diferencialmente respecto a los demás (Figs. 19a y b).

4.2.2.5. Bando mediante enzimas de restricción

Con objeto de comprobar si las endonucleasas de restricción aportan la información necesaria para la caracterización citogenética del cariotipo de *Oncorhynchus kisutch* se sometieron distintas metafases de 36 salmones diploides y 11 triploides a la acción de distintas enzimas, a saber, Alu I, Hinf I, Hae III, Mbo I, Pvu II, Rsa I, Dra I, Bgl II y Hind III, tal y como figura en la Tabla III. En la misma también se indican las concentraciones ensayadas en cada una de ellas así como la respuesta al bandeo que su tratamiento ofrece.

Los resultados obtenidos tras la digestión con cada una de estas endonucleasas nos permite dividir las en tres grupos diferentes dependiendo del patrón de bandeo proporcionado por cada una de ellas. Así, el tratamiento con Alu I, Mbo I, Rsa I y Pvu II (Figs. 20, 21 y 22) muestra un patrón muy similar al bandeo C si bien hay que hacer constar que con las dos primeras se obtiene una diferenciación nítida de los cromosomas, mientras que con las otras dos la tinción diferencial de las zonas resistentes y digerida apenas es perceptible debido al poco contraste entre unas y otras. Un segundo grupo estaría constituido por Hinf I, Hae III y Dra I (Fig. 23), las cuales digieren de manera homogénea todo el cariotipo, a excepción de dos brazos pertenecientes a sendos cromosomas que son digeridos totalmente quedando una especie de grandes "gaps" en ellos que los hacen distinguibles del resto de cromosomas homogénea aunque débilmente teñidos. Los cromosomas afectados son metacéntricos ambos en unos casos, y metacéntrico uno de ellos y submetacéntrico/ subtelocéntrico el otro, en otras células (Fig. 23). Conviene señalar que Hae III tiene como diana un tetrámero rico en pares de bases G/C mientras que Dra I reconoce una secuencia hexamérica rica

en A/T (ver Tabla III). Por último, las metafases sometidas a la acción de Bgl II y Hind III (ambas reconocen un hexámero sin abundancia relativa de un par de bases respecto al otro), no presentan diferenciación longitudinal alguna apreciable en los cromosomas tratados, los cuales presentan una coloración muy tenue indicativa de un proceso de digestión homogénea y espaciada a lo largo de cada uno de ellos.

Cuando tras la digestión con endonucleasas del primer grupo, Alu I por ejemplo, se tiñe con un fluorocromo como la CMA₃ con afinidad por las regiones ricas en pares CG, se observa que los brazos cromosómicos resistentes a la acción enzimática son también CMA⁺ (Figs.24a y b)), y por tanto se corresponden con los portadores de las regiones de organizador nucleolar, cosa que no sucede, al menos con tanta claridad, con las zonas teloméricas. Si la misma tinción secuencial se realiza después de tratar los cromosomas con alguna de las endonucleasas del segundo grupo, Hae III por ejemplo, se comprueba que ninguno de estos segmentos cromosómicos fluoresce presentando incluso tinción negativa en relación al resto del cariotipo (Figs.25a y b). Esta última observación pone de manifiesto que la digestión del ADN_r presente en estos brazos ha sido absoluta. En cambio, la tinción CMA₃/DA después de la digestión con Bgl II o Hind III muestra metafases en las que todos los cromosomas presentan el mismo grado de fluorescencia sin que se puedan apreciar zonas más o menos brillantes.

El comportamiento de los triploides es similar al que acabamos de señalar. Tanto Alu I como Mbo, Pvu II y Rsa I son capaces de inducir un bandeo de restricción similar al bandeo C y homólogo al descrito para los diploides, en el que se observan claramente tres cromosomas metacéntricos portadores de un brazo heteropicnótico positivo resistente a la digestión enzimática (Fig.26). Sin embargo, estos tres cromosomas no parecen ser homólogos, sino que hay dos homólogos y un tercero, también metacéntrico pero de mayor tamaño, portador también de un brazo heterocromático (Figs.21 y 26). Asimismo, es significativo el hecho de que éstas tres mismas regiones, incluida la perteneciente al cromosoma metacéntrico de gran tamaño (que posiblemente coincida con el portador de la nueva actividad NOR), sean digeridas totalmente con endonucleasas del segundo grupo (Hae III, Hinf I o Dra I), mostrando una tinción claramente diferencial en relación al otro brazo y al resto de cromosomas (Fig.27).

Como ya indicamos, el bandeo producido por las endonucleasas de restricción, especialmente Alu I y Mbo I, se asemeja bastante al patrón de bandas C descrito con anterioridad, sobre todo en lo que se refiere a los cromosomas portadores de los NORs. Sin embargo, una diferencia aparece muy clara entre ambos tipos de marcado cromosómico: mientras que el bandeo C pone de manifiesto las regiones heterocromáticas circunscritas a los centrómeros principalmente, las restrictasas evidencian, junto con algunas de estas regiones centroméricas, la heterocromatina localizada a nivel telomérico. A pesar de ello, el grado de condensación de los cromosomas influye a la hora de observar la tinción de unas y otras zonas.

4.2.2.6. Tinción secuencial: endonucleasas/ CMA₃ ó Giemsa/ Ag-NOR

Una vez demostrado que son los fragmentos cromosómicos donde se encuentran las regiones organizadoras del nucleolo los mismos que se muestran heterocromáticos tras el bandeo C, CMA⁺, resistentes a la digestión con Alu I, Mbo I, Pvu II o Rsa I, y que asimismo son digeridos totalmente por otras endonucleasas como Hinf I, Hae III o Dra I, cabría preguntarse si la actividad NOR desaparece o por el contrario persiste tras la digestión enzimática del ADN_r presente en dichas zonas. Para tratar de aclarar esta cuestión sometimos a las mismas metafases a un tratamiento secuencial con endonucleasas de restricción seguido de tinción con nitrato de plata para visualizar los NORs. Para la observación de la actividad endonucleásica, las metafases se colorearon con Giemsa o CMA₃ indistintamente.

Pues bien, tras este tipo de análisis pudimos corroborar que la actividad NOR persiste después de la digestión con enzimas del primer grupo que, como Alu I, no son capaces de cortar y extraer el ADN_r de las zonas NOR, lo cual no dejaba de ser un resultado esperado (Fig.27). Lo que no parecía tan probable era que tras la digestión con endonucleasas del segundo grupo (Hae III por ejemplo) que extraen prácticamente todo el ADN de estas regiones, la actividad NOR permaneciera inalterada. Como se puede observar en la Figura 28, tras la actuación de los enzimas del segundo grupo y la digestión de la heterocromatina asociada a los NORs, es posible visualizar posteriormente dicha zona con plata.

DISCUSIÓN

1.1. El choque térmico como método de inducción de...

El choque térmico se ha utilizado como método de inducción de...

En el presente trabajo se ha demostrado que el choque térmico...

Por otro lado, si bien es cierto que el choque térmico...

DISCUSION

5. DISCUSION

5.1.- Manipulación cromosómica

5.1.1. *Eficacia del choque térmico como método de inducción de triploidía en salmónidos*

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede confirmar que la aplicación de un choque térmico caliente tras la fecundación es un método eficaz para inducir triploidía en la trucha arco-iris y en el salmón coho, siempre y cuando, claro está, éste se produzca en las condiciones adecuadas de las cuales hablaremos posteriormente. Más aún, se ha llegado a afirmar que se trata del más exitoso de los métodos empleados con este fin (Utter y col., 1983) y sin duda, nuestros resultados estarían de acuerdo con esta conclusión. Dicho tratamiento, cuando se aplica tempranamente (no después de una hora de haberse producido la fecundación), actúa bloqueando la segunda división meiótica e inhibiendo la extrusión del 2º corpúsculo polar; se origina así un óvulo diploide que, fecundado por un espermatozoide normal, dará como resultado un cigoto triploide (ver revisiones de Purdom, 1983; Thorgaard, 1983b).

Recientemente sin embargo, se ha podido inducir triploidía sin necesidad de interrumpir el ciclo de división celular del huevo. Así, Ueda y col. (1986) han conseguido individuos triploides de trucha arco-iris mediante dispermia inducida con polietilén glicol, si bien nada se indica acerca de la viabilidad de tales individuos ni de las posibles anomalías que, como consecuencia del método de inducción, se puedan producir durante el desarrollo embrionario. Además, la eficacia de tal procedimiento, amén de poco significativa (sólo estudiaron 21 individuos), es realmente baja (33.33%). Asimismo, se ha tratado de explicar la aparición de triploides en poblaciones naturales como consecuencia de la fecundación de un óvulo normal con un espermatozoide $2n$. A este respecto habría que decir que, a pesar de haberse observado células germinales tetraploides en trucha arco-iris (Cuellar y Uyeno, 1972), no se ha podido comprobar que éstas puedan originar espermatozoides diploides fértiles, ni tan siquiera que haya existido realmente esta forma peculiar de fertilización.

A pesar de ello, los datos al respecto son algo confusos. De hecho, Benfey y

5.1.1.1. Eficacia del método en la trucha arco-iris

Respecto a los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos diseñados en la Piscifactoría de Benamahoma, se puede comprobar que un choque térmico de 26°C y 20' de duración administrado 10' después de la fecundación (experiencia B), produce un alto porcentaje de triploides (94.3%) y una tasa de supervivencia más que aceptable (61.8%) en este tipo de experiencias de manipulación cromosómica. Tales resultados coinciden plenamente con los conseguidos por otros autores, especialmente Chourrout (1980) en la misma especie si bien su estudio no incluye un diseño multivariante como el nuestro. Porcentajes de triploidía similares se originan cuando el tratamiento ocurre a 28°C y durante 5, 10 o 15 minutos; sin embargo, en este caso la supervivencia se reduce aproximadamente a la mitad (experiencias A y C) e incluso a valores cercanos a 0 (experiencia C) lo cual le resta interés desde un punto de vista comercial.

El primer parámetro variable, la temperatura del choque térmico a una temperatura (26°C) y largo

El tercer parámetro variable, el tiempo de incubación, también parece tener importancia en los resultados finales. De hecho, se puede observar (experiencias D y E) que, cuando este valor es de 5, 15 o 30 minutos e independientemente de que la temperatura del shock sea de 26 o 28°C, las tasas de supervivencia y eficacia del método no son significativamente diferentes, cosa que sí ocurre, y de forma bastante clara, cuando los huevos se someten a choques térmicos a los 45' de haber sido fecundados. En este último caso, la supervivencia es inferior al 10% y el porcentaje de triploides que se obtiene es realmente bajo (23.8%). Parece pues como si hubiese un umbral en el tiempo de incubación pasado el cual, el choque térmico apenas si surte efecto en lo que se refiere a la tasa de activación, sin embargo, sí que causa una elevada mortalidad. Este aspecto no concuerda con lo expuesto por Thorgaard y col. (1981) o Lincoln y Scott (1983) quienes aseguran que el tiempo de incubación no es un parámetro crítico dentro de la primera hora después de haber transcurrido la fecundación. Nuestras observaciones sí coinciden, sin embargo, con las hechas, en la misma especie por Chourrout (1980), en la trucha común (*Salmo trutta*) por Arai y Wilkins (1987) y en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) por Johnstone (1985). Tales autores detectaron descensos acusados en los porcentajes de triploides cuando éstos se obtenían mediante choques térmicos iniciados a los 45' después de la fecundación. A pesar de ello, los datos al respecto son algo confusos; de hecho, Benfey y

Sutterlin (1984b) ofrecen resultados que bien podrían asemejarse a uno y otro grupo de autores.

Por otra parte, en las experiencias D y E se puede observar cómo para un valor fijo de temperatura, la proporción de triploides es ligeramente mayor cuanto más tardíamente tiene lugar el choque térmico, siempre y cuando este tiempo no sea superior a 45'. Esto está de acuerdo con lo estimado también en la trucha arcoiris por Solar y col. (1984), si bien no es así en otras especies de salmónidos (Benfey y Sutterlin, 1984a).

En lo que concierne a la experiencia llevada a cabo en la Piscifactoría de Orol (Lugo), los resultados vienen a coincidir, en términos generales, con la experiencia A descrita con anterioridad. Sin embargo, existen dos diferencias, a nuestro juicio importantes de destacar. En primer lugar, mientras que en la instalación gaditana las condiciones del tratamiento que ofrecían resultados más favorables eran aquellas que suponían choques térmicos a baja temperatura (26°C) y larga duración (20'), en el caso de la piscifactoría lucense parecen bastante adecuadas las condiciones de temperatura más elevada (28°C) y duraciones menores (10'). Es evidente que choques térmicos de 28°C causan mayores tasas de mortalidad entre las truchas gaditanas que entre sus congéneres gallegas ($t_s=8.13$, $P<0.1$), pudiéndose observar valores muy bajos de supervivencia (entorno al 33%) entre las primeras.

En segundo lugar, es curioso el hecho de que las diferencias en los valores de supervivencia entre los dos momentos en que ésta fue determinada son significativamente mayores en el caso de la experiencia desarrollada en Benamahoma. Esta, junto con la diferencia antes mencionada entre ambas experiencias, podrían ser atribuibles a tres tipos de causas, unas relacionadas con el ambiente de cultivo, las intrínsecas de los ejemplares existentes en cada instalación (diferencias entre dos poblaciones distintas), y las derivadas del estado triploide *per se*, aunque esta última se podría considerar más bien como una consecuencia de las dos anteriores.

Entre las causas de tipo ambiental recordemos que tanto el período de maduración de los reproductores como de desarrollo embrionario y alevinaje transcurrieron a temperaturas siempre constantes y algo elevadas (13.5°C) para las etapas

consideradas, en la instalación gaditana, cosa que no sucedió en la piscifactoría lucense donde la temperatura fue oscilante en todo momento, incluso a lo largo de un mismo día, si bien ésta nunca fue superior a 8°C durante los períodos mencionados y en los cuales se calculó la tasa de supervivencia. En este sentido, las condiciones óptimas pasarían por una solución híbrida entre ambas, es decir, lo ideal sería contar con una instalación donde dicha temperatura se mantuviese inalterable, al menos durante los períodos de maduración sexual de los reproductores, desarrollo embrionario de los huevos fertilizados, eclosión y primeros estadios de alevinaje, pero con un valor de $10 \pm 0.5^\circ\text{C}$. De hecho éstas son las condiciones en las que han tenido lugar la mayoría de las experiencias de inducción de triploidía en trucha arco-iris realizadas por algunos de los autores ya mencionados, razón por la que, en alguna de ellas, las tasas de inducción de triploides y sobre todo las tasas de supervivencia son algo superiores.

Es importante señalar como en cada una de las piscifactorías, las condiciones que mejores resultados aportaron en el proceso de inducción son cualitativa y cuantitativamente diferentes; mientras en Benamahoma fueron los choques térmicos largos (20') y de niveles bajos (26°C) los que mejor equilibrio eficacia-supervivencia ofrecieron, en Orol fueron los de más corta duración (10') pero de mayor nivel térmico (28°C). Esta diferencia entre uno y otro experimento podría también estar determinada, amén de por el factor ambiental, por las características propias (genéticas principalmente) de cada una de las poblaciones cultivadas. Como refleja la Tabla I, aunque en ambas sus antepasados son de procedencia danesa, en el caso de las truchas gaditanas se trata de una "variedad" de otoño (la freza ocurre entre agosto y noviembre) mientras que las truchas gallegas pertenecen a una "variedad" de invierno (la freza tiene lugar entre diciembre y marzo). No sólo entre variedades, sino incluso dentro de cada una de ellas, es especialmente importante la calidad de los huevos y el grado de sincronía que, respecto a la maduración, éstos poseen. Este factor influye de forma decisiva en los resultados obtenidos.

Nuestros datos en este contexto coinciden con los pocos que, ofreciendo un análisis comparativo similar, existen en la bibliografía. Así, Lincoln y Scott (1983) encontraron tasas superiores de triploidía en la variedad Caribou (freza en otoño) respecto a la variedad invernal Mount Lassen. De forma parecida, Solar y Donaldson (1985) estimaron perfectamente las diferencias existentes entre dos

poblaciones de *Salmo gairdneri* de Canadá en parámetros relacionados con el crecimiento. Es más, en una de dichas poblaciones (Spring Valley) observaron que diploides y triploides tenían patrones de crecimiento muy similares mientras que en la otra (Pennask Lake), los triploides crecían tres veces menos que los controles. Tal diferencia también podría ser atribuible a que la primera de ellas era una población cultivada y no natural como era el caso de la segunda.

En nuestro análisis hemos podido poner de manifiesto que otros componentes genéticos inciden notoriamente en la tasa de supervivencia de cualquier progenie. Así, el polimorfismo cromosómico presente en la trucha arco-iris tanto a nivel intra como interindividual se encuentra estrechamente ligado a la mortalidad observada en cada uno de los cruzamientos realizados. Como se puede observar en la Tabla XV, cuanto mayor es la tasa de variabilidad intraindividual (proporción de células con números cromosómicos distintos del modal para cada individuo) de los componentes de una progenie, menor es la supervivencia que presenta, ya sea diploide ($r=-0.95$, Gráfica 14) o triploide ($r=-0.67$, Gráfica 15). E igual sucede para la tasa de variabilidad interindividual (porcentaje de individuos con números cromosómicos distintos de los esperados).

Dado que tal polimorfismo cromosómico se hereda de padres a hijos, cabría esperar, tal y como sucede, una correlación negativa entre la tasa de variabilidad intraindividual de los padres y la de supervivencia de la descendencia engendrada. Y así lo demuestran los valores del coeficiente de correlación (ver Tabla XV), si bien parece ser el componente genético materno el que más influye.

Bajo el supuesto de que tal polimorfismo cromosómico está causado por translocaciones de tipo robertsoniano junto a otro tipo de reordenaciones cromosómicas menos frecuentes, su relación con la supervivencia parece obvia por cuanto tales anomalías pueden conducir a la formación de gametos aberrantes y la consiguiente aparición de cigotos aneuploides, la mayoría de ellos inviables. Esta sería la explicación al hecho observado por nosotros en la piscifactoría de Orol: aquellas progenes que, o bien proceden de parentales con altas tasas de variabilidad intraindividual, o bien ellas mismas presentan valores considerables de polimorfismo cromosómico, tienen menor viabilidad relativa.

Por lo comentado, se podría asegurar que la variabilidad genética intraespecí-

fica, junto a las diferencias interpoblacionales y a las características propias de los reproductores, influyen de forma notable en los resultados de una experiencia como la aquí relatada.

5.1.1.2 Eficacia del método en el salmón coho

Parece claro, a partir de los resultados conseguidos, que las mejores tasas de supervivencia que llevan aparejadas mayores porcentajes de triploidía son aquellas que se obtienen administrando, durante 10 minutos, choques térmicos de 28°C a los 5' de la fecundación (experiencia 3). En las experiencias 1 y 2 los valores de supervivencia y eficacia permanecen en extremos opuestos, excepto en el caso del nivel 28 de la experiencia 1 donde, con una tasa de supervivencia aceptable (79.4% respecto al control), se obtiene un valor intermedio de eficacia (64.87%).

El que el nivel 32 aplicado durante muy poco tiempo (2') sea insuficiente para inducir triploidía en el salmón plateado (experiencia 2) es algo que coincide con las observaciones ya hechas por Utter y col. (1983). Sin embargo, Thorgaard y col. (1981) obtuvieron triploides de trucha arco-iris con choques de 34 a 36°C durante 1 minuto, si bien es cierto que el porcentaje de triploides inducido no fue muy alto. Esta diferencia entre trucha y salmón podría deberse al mayor tamaño de los huevos de salmón respecto a la trucha (5-6 mm frente a 3-4 mm), precisando los primeros intensidades de choque superiores para que éste fuese efectivo. Y es que, si el shock térmico actúa inhibiendo la salida del huevo del 2º corpúsculo polar, debe existir un umbral mínimo de actuación de dicho agente físico sobre el ciclo meiótico celular para que este fenómeno tenga lugar; en caso contrario, el aumento de temperatura significará un descenso en los valores de supervivencia de los huevos pero no el bloqueo de la oogénesis ya que quizás no haya transcurrido el tiempo necesario para que el material hereditario del 2º corpúsculo polar se incorpore al genoma del embrión que se está gestando. Pero es que, además, deben de existir factores de distinta naturaleza, posiblemente relacionados con las aptitudes genéticas de cada especie, que junto a los ya mencionados, decidan las condiciones que debe reunir una experiencia de inducción de triploidía para que esta tenga efecto. Las diferencias de aptitud para la inducción de triploidía, ya sean éstas intra o interespecíficas, explicarían de alguna forma las diferencias encontradas entre distintos lotes respecto a su

susceptibilidad al choque térmico (nótese los valores relativamente altos de los errores estándar en la columna de supervivencia de la Tabla IX), si bien a ello también podría contribuir la variabilidad genética existente en las poblaciones cultivadas.

A pesar de lo dicho, sorprende bastante la gran similitud existente entre nuestros resultados y los conseguidos por Benfey y Sutterlin (1984b) en otra especie, el salmón atlántico (*Salmo salar*), bajo similares condiciones en el proceso de inducción (la única diferencia es que ellos aplicaron choques de 5' de duración). Esto viene a confirmar, al igual que sucede en la trucha arco-iris, la importancia que tiene el disponer de un adecuado sistema de control de la temperatura que haga de éste un parámetro regulable dependiendo del tipo de experimento a realizar.

5.1.1.3. Consideraciones comunes a trucha y salmón

De lo comentado hasta ahora se desprende que hay dos factores fundamentales que inciden directamente tanto sobre la eficacia del tratamiento térmico como sobre la viabilidad de la progenie. Estos son la intensidad del choque por un lado, la cual a su vez tiene dos componentes, la temperatura a la que éste tiene lugar (T) y la duración del mismo (D), y por otro lado, el tiempo que dista desde la fertilización de los huevos hasta el comienzo del proceso de triploidización (tiempo de incubación, t). Parece además, como si el primero de dichos factores, la intensidad del choque térmico, influyera tanto sobre la supervivencia como sobre la eficacia, mientras que el segundo de ellos, el tiempo de incubación, sólo lo hiciera sobre el último.

Algo en lo que coinciden todos los trabajos de inducción de triploidía en salmónidos, incluido el nuestro, es que a medida que aumenta la intensidad del tratamiento también lo hace la tasa de inducción de triploidía pero a costa de incrementos en la mortalidad, de ahí la necesidad de buscar las condiciones que conduzcan a un equilibrio razonable e interesante desde el punto de vista aplicado entre eficacia y supervivencia. Tales condiciones, en nuestra opinión, pasan por ensayos adecuados para cada una de las especies en cuestión ya que no sería adecuado considerar estandarizado un método donde inciden tantas variables (especie, raza o variedad, condiciones ambientales y condicio-

nes propias del proceso) por el sólo hecho de haber sido puesto a punto en una especie concreta y en una instalación determinada.

En otro orden de cosas, habría que mencionar que en ninguna de las dos experiencias hemos detectado individuos triploides entre los controles analizados (triploides ocasionales) ni tampoco casos de mosaicismo (diploide/poliploide) entre los individuos pertenecientes a lotes tratados. Si bien tales observaciones sí que han sido hechas en la trucha arco-iris (Cuellar y Uyeno, 1972; Thorgaard y col., 1981; Solar y col., 1984) y en otras especies de salmónidos (Refstie y col., 1977; Allen y Stanley, 1979; Smith y Lemoine, 1979; Lemoine y Smith, 1980; Utter y col., 1983), la ausencia de las mismas en nuestros resultados carece de explicación al no conocerse con seguridad las causas que originan tales anomalías. Lo que sí es cierto es que para la determinación de los niveles de ploidía se han utilizado distintos métodos, algunos de los cuales, como por ejemplo la estimación del volumen nuclear a partir preparaciones citológicas de eritrocitos, no son del todo fiables al tratarse de métodos morfométricos dependientes en cada momento del estado celular. Esta posible fuente de error ha estado ausente en nuestros análisis ya que todos ellos han sido realizados mediante conteos cromosómicos que si bien son bastante laboriosos, también son de total fiabilidad para este propósito. Otra posible explicación a la presencia de mosaicismo entre los individuos sometidos a tratamientos triploidizantes es la aportada, en base a sus propios resultados y a los obtenidos por Thorgaard y col. (1982), por Utter y col. (1983) según la cual este fenómeno se encontraría asociado a los diferentes métodos de inducción de triploidía (choques fríos, choques de presión, tratamiento con citocalasina B), cuestión difícil de creer desde nuestro punto de vista.

Por último, señalar que la retención del 2º corpúsculo polar en los triploides origina cierto grado de "inbreeding" el cual, unido a otras posibles consecuencias del estado triploide *per se* (adquirido de forma artificial), podrían considerarse como factores causantes de la reducida supervivencia que se observa en grupos con altos porcentajes de triploides. Como señalan Solar y col. (1984), esta idea viene apoyada por los datos aportados por algunos autores referidos al incremento del número de embriones abortivos y deformaciones en los alevines, que se produce en los lotes sometidos a tratamientos triploidizantes. Sin embargo, en nuestros experimentos no se han observado proporciones significativamente mayores de abortos o malformaciones entre los huevos tratados respecto a los controles. Es

más, en ocasiones estos abortos no se les puede considerar como una consecuencia del estado $3n$ sino que por el contrario, se trata de embriones haploides incapacitados para continuar normalmente su ciclo de desarrollo. Y es este número de embriones haploides el que incide negativamente sobre las tasas de supervivencia (Refstie, 1983).

5.1.2. Desarrollo gonadal y crecimiento

La primera consecuencia derivada de la triploidía es la esterilidad, por cuanto dicho estado supone el incorrecto emparejamiento de los cromosomas homólogos durante el proceso meiótico que conduce a la formación de los gametos. Pues bien, el interés de los métodos de manipulación cromosómica aplicados a salmónidos, especialmente la inducción de triploidía, reside precisamente en el hecho de los triploides obtenidos pueden ser estériles y por tanto no padecerían los efectos negativos que conlleva la maduración sexual.

Como se deduce de los valores del índice gónado-somático obtenidos en la trucha arco-iris en la población de Benamahoma, el desarrollo gonadal, especialmente el de las hembras, se encuentra total o parcialmente inhibido lo cual lleva a la formación de ovarios minúsculos e incluso a veces inexistentes. El escaso o nulo desarrollo gonadal parece ser realmente el causante de los incrementos en el peso medio mostrados por los individuos triploides respecto a los diploides durante el periodo de madurez sexual. En la Gráfica 4 se puede observar cómo efectivamente la trayectoria en el crecimiento de las truchas triploides diverge de la seguida por el grupo control al llegar a dicho periodo. Sin embargo, no parece que tales diferencias sean claras en las restantes etapas de su vida, durante las cuales los pesos medios no difieren significativamente unos de otros. Por otra parte, la no existencia de diferencias significativas entre ambos lotes en el factor K indica que tanto en uno como en otro la longitud y el peso aumentan de manera proporcional. Es curioso como tales valores de K se invierten a partir de la primera maduración sexual momento en el cual los triploides crecen algo más a lo ancho que a lo largo, hecho que podría tener relación con la presencia de acúmulos de grasas en torno a distintos órganos (hígado, páncreas, digestivo, etc) observada por algunos autores (Lincoln y Scott, 1984).

Los resultados de peso y longitud obtenidos por Lincoln y Scott (1984) en la misma

especie demuestran por el contrario que las truchas triploides no crecen comparativamente más que las diploides a pesar de que no hayan madurado sexualmente y de presentar valores superiores de K, peso visceral y peso hepático. Estos datos coinciden además con los recogidos tanto en triploides espontáneos de la naturaleza (Thorgaard y Gall, 1979; Solar y col., 1984), como en otros pertenecientes a lotes experimentales (Thorgaard y col., 1982). Habría que señalar que ninguno de ellos hace específica referencia al momento de la maduración sexual que es precisamente en el cual nosotros hemos podido comprobar que las truchas triploides presentan mejores tasas de crecimiento. Al igual que en nuestro estudio, Thorgaard, en una experiencia posterior (1986) pudo comprobar este hecho en una variedad de trucha que madura a los dos años; desde este momento hasta los tres años y medio, los controles habían incrementado su peso en una media de 60 gr. (± 31 gr.) mientras que los triploides lo habían hecho en 307 gr (± 82 gr.), es decir, unas cinco veces más. En nuestro caso, las diferencias no son tan abismales pero sí que alcanzan un valor del 16.64% por encima del peso de los diploides. Este porcentaje es bastante parecido al encontrado por Chevassus y col. (1984) quienes señalan que los ejemplares triploides de trucha arco-iris muestran un crecimiento ligeramente inferior al de las diploides (de un 10 a un 20%) durante los primeros 100 días. Desde este momento hasta los 18 meses las tasas de crecimiento y los índices de conversión del alimento son similares, y es a partir de los 18 meses (pocos meses después de la primera maduración sexual) cuando las truchas triploides comienzan a mostrar valores superiores de estos parámetros, entre un 10 y un 20% más.

El superior crecimiento mostrado por los triploides durante la época reproductora probablemente sea debido al diferente camino que sigue la energía metabólica en ellos respecto a los diploides. Mientras que en estos últimos dicha energía se dirige al desarrollo de las estructuras gonadales y a la maduración de los futuros gametos, en los primeros se destina completamente al crecimiento (ver revisiones de Purdom, 1983; y Thorgaard, 1986).

Lo que acabamos de relatar para la población de Benamahoma se cumple igualmente en la población gallega de Orol, en cuyas instalaciones los ejemplares triploides de trucha arco-iris crecieron un 16.25% más que los controles, según los últimos datos tomados. Sin embargo, en etapas previas a la segunda maduración sexual las tasas de crecimiento de unos y otros no fueron significativamen-

te diferentes, pudiendo esta observación encontrarse relacionada con las frecuentes riadas que alteraron los ritmos de crecimiento de dichos animales.

Donde la triploidía no parece tener efectos positivos sobre los patrones de crecimiento es en el salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*) cultivado en agua dulce. El seguimiento de tales patrones (Tabla X) muestra una similitud total entre los lotes control y diploide. Es más, en la última valoración efectuada los ejemplares diploides tenían mayor peso que los triploides si bien es verdad que en éstos últimos abundaban los machos (que crecen menos). Esta similar, o a veces inferior, tasa de crecimiento de los triploides podría quizás ser la consecuencia de una interacción entre genotipo y factores ambientales. Es decir, puede que dicho comportamiento no sea efecto de la triploidía como un hecho aislado sino que más bien este estado triploide, sometido a situaciones ambientales adversas (riadas), sea el que origine este retraso en el crecimiento.

Dicho retraso también se deduce del menor porcentaje de salmones triploides que llegan a esmoltificar durante el primer año. Tal y como sugieren Johnson y col. (1986) parece que los factores ambientales pueden jugar un papel decisivo en la aclimatación de estos salmones triploides al agua salada, por el hecho de ser más susceptibles al stress que provoca el cambio drástico en los niveles de salinidad del agua.

Nuestros datos de crecimiento respecto al salmón coho coinciden con los obtenidos recientemente por Johnson y col (1986). Estos autores observaron un crecimiento equivalente entre lotes diploides y triploides, contradiciendo de esta forma sus propios resultados previamente obtenidos (Utter y col., 1983). Ellos atribuyen las diferencias entre ambos estudios a las deficientes condiciones en las que transcurrió la primera de las experiencias realizadas, especialmente las referidas a una alta densidad de cultivo y al poco rigor en el programa alimentario. Estas mismas condiciones se han dado en nuestra instalación, con el agravante de que ésta además sufrió, en tres ocasiones, los destrozos producidos por las riadas, lo cual, como ya hemos comentado, dificultó en gran medida el poder regular convenientemente los parámetros antes descritos como deficientes.

Conviene señalar que en otras especies como son los peces planos, la tilapia o el pez gato, Purdom (1972), Valenti (1975) y Wolters y col. (1982), respectivamente,

observaron mejores crecimientos en los animales triploides que en los diploides, y ello a distintas edades. En el salmón coho podría suceder lo mismo si bien, en nuestra opinión, debería de conseguirse que esta especie, con enorme interés para la acuicultura española, alcanzara mejores niveles de adaptación a su cría en cautividad (conviene recordar que la instalación donde se llevó a cabo esta experiencia es la única de España donde se cultiva esta especie).

Lo que sí es cierto es que, aún en el supuesto de que los animales obtenidos por manipulación cromosómica (triploides), mostraran tasas de crecimiento similares a los controles, éstos tendrían un enorme interés desde el punto de vista aplicado. De hecho, se ha podido comprobar que los triploides de trucha arco-iris y salmón presentan una mejor calidad de carne durante el periodo reproductor, que a menudo suele coincidir con el de mayor demanda en el mercado, además de ofrecer un aspecto externo mucho más comercial (Lincoln y Bye, 1984a). Asimismo, los triploides muestran menores tasas de mortalidad tanto en el periodo de la freza como durante la adaptación a agua salada (Lincoln y Bye, 1984a; Johnson y col., 1986).

El control sobre la maduración sexual ejercido por la triploidía es mucho más eficaz en las hembras de los salmónidos que en los respectivos machos, de ahí el auge que en los últimos años ha adquirido la producción de poblaciones todo-hembras. Para ello se ha de iniciar previamente la reversión del sexo en individuos que genotípicamente sean hembras XX pero que tras la reversión adquieran fenotipo de macho. Son los llamados neomachos o hembras de sexo revertido aptas para producir semen, el cual posteriormente fecundará una cierta cantidad de huevos originándose así una población de individuos todos de genotipo XX (todo-hembras). Dicha población puede ser posteriormente sometida a algún tipo de tratamiento esterilizante (choque térmico por ejemplo) lo cual comporta ventajas significativas en la cría de salmónidos (ver Introducción). Una forma fácil de obtener neomachos es mediante la administración oral de un esteroide como la 17-alfa-metiltestosterona durante las etapas previas a la diferenciación sexual.

Reversión del sexo o choque térmico

Nosotros ya hemos inducido la reversión del sexo en la trucha arco-iris habiéndose obtenido un alto porcentaje de neomachos sexualmente maduros (Fig. 1a y b) que posteriormente han sido utilizados para la producción de poblaciones todo hembras. Esta experiencia fue realizada también en la Piscifactoría de Orol y los

resultados han sido presentados en el Satellite Symposium on Applications of Comparative Endocrinology to Fish Culture que ha tenido lugar recientemente en Almuñécar.

5.1.3. Viabilidad de los triploides

En el grupo de los salmónidos, la triploidía no sólo se ha conseguido inducir de manera artificial sino que se trata también de un fenómeno presente de forma natural en las poblaciones de esta familia de peces (Cuellar y Uyeno, 1972; Grammeltvedt, 1974; Allen y Stanley, 1978), e incluso entre híbridos intergenéricos de la misma (Capanna y col., 1974). Además, no es algo exclusivo de peces; de igual forma se han encontrado casos de triploides ocasionales en poblaciones naturales de anfibios (Fankhauser y col., 1942), reptiles (Darevsky y Kulikova, 1964) y aves (Bloom, 1972; Mong y col., 1974).

Por otra parte, desde hace aproximadamente 50 años se han venido aplicando técnicas de inducción de triploidía, mediante diversos métodos, en una gran variedad de organismos ya sean estos moluscos (p.e. Stanley y col., 1981; Allen y col., 1982; Tabarini, 1984; Quillet y Panelay, 1986; Komaru y col., 1988), anfibios (Fankhauser y Griffiths, 1939; Tompkins, 1978) o peces (p.e. Purdom, 1972; Valenti, 1975; Gervai y col., 1980 y las referencias indicadas hasta el momento).

Pues bien, la presencia de tales triploides espontáneos en las poblaciones naturales unida a la posibilidad de inducirlos de manera artificial en un gran número de especies, hace pensar que la viabilidad de estos se encuentra dentro de los límites permitidos desde los puntos de vista adaptativo y selectivo. De hecho, en nuestras experiencias no hemos observado diferencias significativas de supervivencia entre individuos diploides y triploides después de que ambos se adaptaran bien a la alimentación. El descenso de supervivencia queda por tanto restringido a las primeras etapas del desarrollo embrionario razón por la cual llega a eclosionar un menor número de huevos en los lotes tratados que en los que no fueron sometidos a choque térmico.

Es más, autores como Lincoln y Bye (1984b) encontraron una mayor mortalidad entre los individuos diploides de trucha arco-iris que entre sus hermanos triploides, durante la época de freza, cuando ambos eran cultivados en agua salada, lo

cual parece estar asociado con el aumento de osmolaridad en el plasma sanguíneo que padecen los individuos diploides durante la maduración sexual.

Especial mención en lo que a viabilidad se refiere merecen los híbridos que se obtienen cruzando artificialmente distintos géneros y especies de peces. Autores como Allen y Stanley (1981), Chevassus y col. (1983) o Scheerer y Thorgaard (1983) han aportado claros resultados todos ellos indicativos de la superior supervivencia que presentan las descendencias triploides respecto a las diploides, cuando ambas proceden de hibridación. Esto es especialmente significativo en la trucha tigre, un híbrido entre la trucha común (*Salmo trutta*) y la trucha de fuente (*Salvelinus fontinalis*) o en los híbridos entre distintas especies de carpas (Beck y col., 1980), donde además de una viabilidad incrementada, los triploides no presentan deformaciones tan frecuentemente como los diploides.

Este fenómeno (la superior supervivencia de los híbridos triploides respecto a los diploides) que no sólo tiene lugar en el grupo de los peces, sino que también se presenta en anfibios (Elinson y Briedis, 1981) y que además de en progenies procedentes de hibridación artificial, también aparece en las poblaciones naturales (Capanna y col., 1974), podría estar relacionado con la desaparición de las barreras de desarrollo que supondría la presencia de dos complementos cromosómicos maternos en los individuos $3n$. Al no existir tales impedimentos, se posibilitaría la producción, por parte de éstos, de la cantidad necesaria de moléculas esenciales para proseguir el desarrollo (Elinson y Briedis, 1981). Ello, de alguna forma, vendría a demostrar, tal y como afirma Thorgaard (1983b), el papel amortiguador que ejerce la triploidía *per se* sobre las posibles incompatibilidades genéticas entre los complementos de las dos especies que hibridan.

La hipótesis de la triploidía como mecanismo de aislamiento reproductivo que ha afectado y afecta a los salmonidos. Las pruebas que corroboran dicha hipótesis, además de haber sido obtenidas únicamente de los estudios de meiosis, en varios salmonidos, en esta especie (cuadrado o metafase I), se han podido observar con claridad en el material de *Salmo trutta* y *Salmo gairdneri* y la nuestra opinión no en absoluto sólo las fusiones y fisiones céntricas sino también otro tipo de reordenamientos cromosómicos. En el caso de *Salmo gairdneri* jugó un papel decisivo en la evolución de este grupo de especies el hecho de haber existido alguna para pensar que tan sólo este tipo de reordenamientos cromosómicos, las trisomías, un genoma tan elevado como el de los salmonidos, y el hecho, aunque en nuestro análisis no se ha podido demostrar, de que

5.2.- Análisis citogenéticos

5.2.1.- **Características del polimorfismo cromosómico presente en la trucha arco-iris**

5.2.1.1. **Naturaleza de la variabilidad cromosómica intra e interindividual**

La variabilidad en el número cromosómico observada en las poblaciones de trucha arco-iris analizadas por nosotros, tanto a nivel intraindividual como interindividual, coincide con las detectadas por otros autores (Ohno, 1965; Heckman y col., 1971, Thorgaard, 1976, 1983; Hartley y Horne, 1982; Ueda y col., 1983; Bolla, 1987), si bien en cada caso el rango de variación es distinto. Tal variabilidad cromosómica se traduce en la coexistencia de diferentes números cromosómicos, desde $2n=58$ hasta $2n=63$ en el nivel diploide (Fig.4, Tabla XVI) y entre $3n=89$ y $3n=95$ en el nivel triploide (Fig.5, Tabla XVI), dentro y entre individuos, permaneciendo invariable el número de brazos cromosómicos o número fundamental, cuyo valor es de $NF=104$ en los individuos diploides y $NF=156$ en los triploides. A pesar de ello sin embargo, en casi todos los individuos hemos detectado un cierto porcentaje de metafases con valores de NF inferiores a 104 y 156 respectivamente.

Esta constancia en el número de brazos cromosómicos en los distintos cariotipos es la que ha llevado a distintos autores, los primeros de ellos Ohno y colaboradores (1969), a deducir que tales variaciones en el número cromosómico son debidas a translocaciones de tipo robertsoniano, fusiones y fisiones céntricas, que además están jugando un papel importante en el proceso de diploidización que ha afectado y afecta a los salmónidos. Las pruebas que corroboran dicha hipótesis, además de la constancia de NF , proceden únicamente de los estudios de meiosis, en varias de cuyas etapas, desde paquitene a metafase I, se han podido observar configuraciones multivalentes junto a las bivalentes normales. En nuestra opinión sin embargo, **no sólo las fusiones y fisiones céntricas, sino también otro tipo de reordenaciones cromosómicas deberían haber jugado un papel decisivo en la evolución de este grupo.** En primer lugar porque no hay razón alguna para pensar que tan sólo este tipo de reordenaciones estuviesen favorecidas; un genoma tan plástico y moldeable lo debe ser en varias direcciones. De hecho, aunque en nuestro análisis no lo hemos tenido en cuenta, lo cierto es que

un cierto número de metafases en cada individuo poseen menos de 104 brazos cromosómicos, las cuales no siempre tendrían que ser consecuencia de errores de conteo o de pérdidas cromosómicas derivadas de la técnica. Podrían también estar causadas por inversiones pericéntricas o deleciones de brazos completos. Estas últimas serían totalmente factibles si tenemos presente que en el proceso de diploidización del genoma pueden haberse eliminado o estar eliminándose aquellos fragmentos cromosómicos que no han sido capaz de divergir en sus funciones y que por tanto suponen una tara genética al ser material repetido sin utilidad aparente para el organismo que lo porta. Las diferencias cariotípicas observadas entre poblaciones apoyarían de alguna forma esta idea. De hecho, Thorgaard (1976) encontró que los individuos con 58, 59 y 60 cromosomas poseían en su cariotipo 2, 3 y 4 cromosomas subtelocéntricos respectivamente. En base a esta observación dicho autor consideró a los individuos con $2n=59$ heterocigotos para una translocación robertsoniana en la que estarían implicados un cromosoma subtelocéntrico y otro acrocéntrico, y a los portadores de 58 y 60 cromosomas como los respectivos homocigotos. Tales resultados no concuerdan con los obtenidos en ninguna de las restantes poblaciones estudiadas ya sean estas europeas (Hartley y Horne, 1982; Bolla, 1987 y las nuestras aquí descritas), japonesas (Ueda y col., 1983; Ueda y Ojima, 1984a) o otras también norteamericanas (Heckman y col., 1971; Thorgaard, 1983a). Podría suceder por tanto, que las observaciones de Thorgaard no fueran generales para toda la especie sino que estuviesen ligadas a una población concreta o bien que se tratara de diferentes tipos de reordenaciones cromosómicas.

Por otra parte, los datos electroforéticos concuerdan con la idea propuesta. Así, si sólo las fusiones céntricas hubiesen operado durante el proceso de diploidización cabría esperar que los loci duplicados presentaran un tipo de ligamiento "relajado" (Allendorf y Thorgaard, 1984), y sin embargo, los resultados actuales sugieren que tales loci no muestran un ligamiento clásico (May y col., 1979, 1980, 1982; Wright y col., 1983).

En conclusión, junto a las fusiones y fisiones céntricas, otras reordenaciones cromosómicas podrían haber operado durante el proceso de diploidización a que se ha visto sometido el grupo de los salmónidos desde hace bastantes millones de años, si bien las primeras de ellas tendrían mayor protagonismo.

De todas formas, **el importante papel jugado por las fusiones céntricas se pone de manifiesto en nuestro estudio** cuando se averigua la frecuencia con que se presentan estos polimorfismos tanto por defecto como por exceso. Este tipo de análisis revela que tales fenómenos de variabilidad cromosómica se encuentran mayoritariamente polarizados hacia un sentido, aquel que justamente coincide con la disminución del número cromosómico respecto al modal en el caso de la variabilidad intraindividual, o respecto al esperado en el caso de la variabilidad interindividual. Es decir, de alguna manera las fusiones céntricas se encuentran favorecidas frente a las fisiones. Variabilidad por exceso aparece no obstante, aunque con menor frecuencia, en alguno de los individuos y cruzamientos analizados.

La existencia en tan alta frecuencia de variabilidad cromosómica por defecto está en consonancia, y por tanto se podría considerar una prueba más, con el proceso de diploidización que, como discutiremos más adelante, aún no ha concluido sino que más bien prosigue en este grupo de teleósteos. Y en el mismo sentido podría explicarse la permanencia de variabilidad cromosómica por exceso; no sólo se trataría de fisiones céntricas en mayor o menor cuantía, sino como genotipos ancestrales en proceso de reducción de su número cromosómico, al menos a nivel interindividual. Así, un individuo con un cariotipo $2n=62$ no necesariamente debe de proceder de un ancestral con $2n=60$, por ejemplo, en el que hayan producido dos fisiones céntricas distintas, sino que también podría haber surgido de otro ancestral con $2n=65$, por ejemplo, en el cual hubiesen tenido lugar varias reordenaciones cromosómicas. Incluso en el supuesto de que la variabilidad cromosómica por exceso estuviera causada por fenómenos de fisión, ésta no sería más que una consecuencia de otras reordenaciones cromosómicas. Hay que tener presente que las fusiones de cromosomas homólogos (brazos homólogos) podrían originar gametos descompensados, unos con el cromosoma (brazo) por duplicado y otros deficientes para el mismo. Por ello, si por algún motivo tal reordenación se produjese, se tendería a que ésta fuese eliminada. De otra forma, la fusión de brazos o cromosomas homeólogos cambiaría los grupos de ligamiento y con ello alteraría ciertas características (síntesis de enzimas, regulación de genes estructurales, etc). Tales anomalías traerían graves consecuencias para los individuos portadores y por tanto estarían seleccionadas en contra. frecuente es $2n=60$

En esta línea, Ohno y col. (1965) encontraron que en las células hematopoyéticas del bazo del riñón predominaba el número cromosómico $2n=59$ mientras que las de naturaleza parenquimática propias del hígado presentaban 61 o 62 cromosomas. Es decir, que la diferenciación somática en las primeras etapas del desarrollo embrionario se encuentra relacionada con este fenómeno de variabilidad cromosómica. Y como bien argumentan los autores, esta diferenciación no es otra cosa que la activación o inactivación de grupos de genes encaminadas a la adquisición de funciones concretas; por ello la hemoglobina únicamente es sintetizada por las células eritropoyéticas mientras que la insulina sólo la producen en los islotes de Langerhans.

En definitiva, una fusión robertsoniana que afecte a dos cromosomas acrocéntricos originaría un nuevo cromosoma metacéntrico, pero este nuevo "status" cromosómico, tal y como hemos señalado, podría no ser funcional para la célula o el individuo portador, pasando a ser deletéreo y por tanto, tendería a ser eliminado por la selección natural. Desde el punto de vista genético, una forma fácil de eliminar tal situación es deshacer dicha fusión mediante el proceso inverso, una fisión céntrica que afectase al mismo cromosoma metacéntrico.

También Ohno en 1970, propuso que el proceso de diploidización de los salmónidos pretende alcanzar un complemento diploide compuesto por 52 cromosomas todos ellos metacéntricos. Lógicamente, cuando esto ocurra dejaremos de hablar de polimorfismo cromosómico en la trucha arco-iris y otros salmónidos relacionados. En relación con esto, el hecho de que el rango de variación presente en cada una de las poblaciones analizadas no coincida podría estar relacionado con el grado de evolución de dichas poblaciones, el cual a su vez depende en gran medida de la procedencia de las mismas así como de las prácticas de manejo que en ellas se hayan llevado a cabo (selección, inbreeding, etc). En este sentido, las poblaciones de la costa noreste del Pacífico estudiadas por Thorgaard (1976, 1983), en las que el rango de variación va de 57 a 60 y el cariotipo predominante es $2n=58$, podrían considerarse de las más evolucionadas ya que el proceso de diploidización en ellas se encontraría en una fase más avanzada que en las estudiadas por Hartley y Horne (1982) o por nosotros mismos, en las cuales dicho rango va de 58 a 63 y el número cromosómico más frecuente es $2n=60$.

En algunas de las poblaciones estudiadas en las células somáticas (todas ellas presentaban $2n=64$ y $Xn=100$), los multivalentes

En las poblaciones norteamericanas antes mencionadas Thorgaard no encontró números modales mayores de 60, lo cual no significa forzosamente que en ellas no se produjeran fisiones céntricas. Algunos complementos con 60 cromosomas podrían ser descendientes de otros con 61 en los que ancestralmente tuvo lugar una fusión, pero otros podrían muy bien haber surgido más recientemente como consecuencia de una o más fisiones en individuos con 59, 58 o menos cromosomas, en los que tal constitución genética no fuese la más favorable. Por tanto, fusiones y fisiones céntricas se encuentran presentes en las poblaciones si bien éstas evolucionan en el sentido de las primeras. Desde el momento en que individuos con idéntico número cromosómico pueden tener mayor o menor tasa de variabilidad intraindividual, e incluso no tener, cualquiera de los números cromosómicos observados puede ser heterocigoto u homocigoto para uno u otro tipo de translocación robertsoniana. Como Hartley y Horne (1982) señalan, un animal con número modal $2n=60$ bien podría ser homocigoto estándar si consideramos $2n=61$ el heterocigoto para la ordenación translocada y $2n=62$ el otro homocigoto (para la translocación), o bien heterocigoto para dicha ordenación si se considera $2n=59$ y $2n=61$ los respectivos homocigotos.

La existencia de diferentes grados de evolución en las distintas poblaciones analizadas de *Salmo gairdneri* aporta una prueba más acerca de la controversia surgida sobre si el proceso de diploidización en los salmónidos es tarea concluida por las distintas fuerzas evolutivas o si por el contrario, este proceso continúa. La primera de las hipótesis se sustenta sobre la base de que bastantes loci duplicados presentan sin embargo herencia disómica (Allendorf y May, 1975; Engel y col., 1975; May y col., 1979, 1980), y por tanto, la presencia de multivalentes en meiosis y pseudoligamiento (segregación conjunta, no al azar, de loci duplicados) se explicarían por la ocurrencia de fusiones céntricas espontáneas (de novo) tal y como propusieron Ohno y col. (1965) y Gold y Gall (1975). Los datos de los que se disponen actualmente no están de acuerdo sin embargo con dicha hipótesis. Así, recientes trabajos de Wright y col. (1980) y May y col. (1982) demuestran que algunos pares de loci duplicados de la trucha de fuente (*Salvelinus fontinalis*) aún no han desarrollado completamente un tipo de herencia disómica. En la misma especie, Lee y Wright (1981) han observado la presencia de configuraciones tetravalentes en todos los machos estudiados y en cada una de las metafases I analizadas, sin que aparezca tasa alguna de variabilidad intraindividual en las células somáticas (todas ellas presentaban $2n=84$ y $NF=100$). Los multivalentes

observados serían, según estos autores, el reflejo de homologías ancestrales; dos de los cuatro cromosomas acrocéntricos homólogos se habrían fusionados con otros dos formando dos cromosomas metacéntricos manteniendo estos últimos ciertas homologías con los primeros restantes. Tales homologías se traducen actualmente en apareamientos heterobraquiales durante la meiosis y la consiguiente visualización de configuraciones tetravalentes en diplotene y metafase I. El mismo Ohno reconoció posteriormente (1974) que la cantidad de variabilidad observada era insuficiente para explicar la frecuente presencia de multivalentes en la trucha arco-iris, y que por tanto, el apareamiento homeólogo, reflejo de una diploidización incompleta también podría ser considerado. En conclusión, el distinto grado de evolución de las poblaciones de trucha arco-iris, al que ya hemos hecho mención, viene a corroborar de alguna manera, que el proceso de diploidización prosigue en un estado dinámico y que por tanto, no se puede hablar de que éste haya concluido.

5.2.1.2. Herencia de la variabilidad cromosómica intraindividual

La variabilidad intraindividual encontrada por Ohno y col. (1965) en poblaciones cultivadas de trucha arco-iris fue atribuida por ellos a reordenaciones post-cigóticas que tenían lugar durante las primeras etapas de la embriogénesis, o sea, a fusiones y fisiones producidas *de novo* en cada individuo. Si esto fuese cierto habría que esperar que todos los individuos presentaran variabilidad intraindividual tal y como argumentaron Beçak y col. (1966), y ello no ocurre en la trucha arco-iris. Estos últimos autores prefirieron explicar dicho fenómeno como la tendencia de los individuos heterocigotos, que serían la mayoría, a adquirir de nuevo el estado homocigoto, basándose en la observación de que en otro teleósteo, *Lepomis cyanellus*, sólo los heterocigotos para translocación poseían variabilidad a nivel intraindividual. En nuestro caso, no se ha puesto de manifiesto este tipo de relación, si bien Hartley y Horne (1982) aseguran que un modelo de segregación somática similar al propuesto por Beçak y col. sería factible en la trucha arco-iris siempre y cuando individuos con el mismo complemento diploide pudieran provenir de diferentes tipos de polimorfismos. Y en base a los datos ya referidos con anterioridad, esto es lo que debe haber ocurrido y estar ocurriendo con los salmónidos.

De nuestros resultados (los cuales constituyen el primer estudio detallado llevado

a cabo sobre la herencia del polimorfismo cromosómico de la trucha arco-iris) parece deducirse una observación general, y es, que la tasa de variabilidad intraindividual de las progenies diploides es superior a la observada en los parentales, al menos en uno de ellos. Pero aún más significativo es el hecho de que padres sin variabilidad cromosómica engendren descendencias con valores considerables de este parámetro genético. Ambas consideraciones fundamentan nuestra hipótesis acerca de **la existencia, en cada progenie y por ende en cada individuo, de una cierta tasa de variabilidad cromosómica intraindividual, de la cual, una parte (quizás la mayoría) ha sido heredada de sus progenitores, pero que aparece también otra fracción de variabilidad intraindividual no esperada.** Esta última, originada de manera espontánea, muy probablemente es debida a reordenaciones cromosómicas que, como indican Ohno y col. (1965) se producen *de novo* en etapas embrionarias tempranas. Desde esta perspectiva sin embargo, sería difícil de explicar la aparición de descendientes sin variabilidad intraindividual siendo sus progenitores portadores de cierto valor de ésta, a no ser, que en estos hijos la tasa de variabilidad intraindividual sólo se manifieste en células con un número de brazos cromosómicos inferior a 104 y que por tanto no han sido tenidas en cuenta en nuestro análisis. Pero podría suceder asimismo que estos descendientes se hayan formado a partir de gametos totalmente compensados, no portadores de ningún tipo de reordenación cromosómica, y que además tras la fecundación, en el cigoto no se hayan producido mutaciones cromosómicas espontáneas.

En otro contexto, el hecho de que la tasa de variabilidad intraindividual asociada a un determinado número cromosómico no presente un valor fijo sino que este dependa en gran medida de la tasa de variabilidad de sus progenitores, constituye una prueba más para confirmar que tal fenómeno se transmite a la descendencia via sexual. Sin embargo, en el apartado dedicado a "Resultados" hemos puesto de manifiesto la estrecha relación existente entre el número cromosómico que presenta un individuo y su propia tasa de variabilidad, de forma que cuando aumenta el primero también lo hace la segunda, siendo las diferencias entre cada dos números cromosómicos consecutivos estadísticamente significativas (excepto para la comparación entre $2n=59$ y $2n=60$, ver Tabla XIV). En bases a estos resultados no sería difícil suponer que individuos con $2n=61$, $2n=62$ o $2n=63$ fuesen portadores de mayor cantidad de reordenaciones cromosómicas que aquellos con $2n=60$. Si tenemos presente que esto sucede entre los

descendientes de un mismo cruzamiento, tales diferencias entre hermanos podrían ser consecuencia de la tasa de variabilidad intraindividual originada *de novo* en cada uno de ellos. Resultados bastante similares, aunque con valores absolutos inferiores fueron obtenidos Hartley y Horne (1982) en una población escocesa, si bien en este caso no se trataba de un estudio a nivel familiar sino de un conjunto de individuos tomados al azar. Un análisis familiar sobre la herencia y transmisión de la variabilidad intraindividual, similar al aquí expuesto no ha sido llevado a cabo con anterioridad, razón por la cual nuestros resultados no pueden ser confrontados a este nivel.

En cualquiera de las situaciones establecidas para la discusión de los resultados se han podido observar los incrementos en la tasa de variabilidad intraindividual que tienen lugar de una a otra generación, si bien éstos son especialmente claros en la clase "HA y MA > 0" en la que ambos progenitores presentan valores considerables para este parámetro. En dicha clase, y dependiendo de la subclase considerada, se producen incrementos positivos en las descendencias respecto a los parentales del orden del 20 al 30% en las diploides y del 15 al 26 % en las triploides si ambos parentales presentan tasas similares. En caso contrario, se producen aumentos respecto al parental con menor tasa de variabilidad y descensos respecto a la mostrada por el parental con mayor variabilidad, pero en cualquier caso los primeros superan a los segundos. Este aumento neto de la tasa de variabilidad intraindividual entre dos generaciones consecutivas no debe ser mas que el camino que viene siguiendo el proceso de diploidización en que se encuentra inmerso el grupo de los salmónidos desde hace millones de años. Este incremento positivo se dirige además, tal y como hemos señalado anteriormente, hacia la consecución de un número cromosómico estable alcanzado el cual, dicho proceso podría darse por finalizado. Si se estima este número como $2n=52$, en la evolución cariológica del grupo estarían favorecidas las fusiones céntricas frente a las fisiones y por tanto en cada generación, además de la tasa de variabilidad heredada, tendría lugar un ligero aumento de la misma y ello llevaría consigo la aparición de números cromosómicos cada vez menores, $2n=59$, $2n=58$ y así sucesivamente hasta $2n=52$. En el caso de que alguna de estas fusiones no fuesen realmente eficaces, tendría que ocurrir una fisión céntrica que deshiciera la fusión anterior y con ello se abriría la posibilidad de que otros dos cromosomas acrocéntricos se fusionaran para formar un metacéntrico funcional. De ahí la tasa de variabilidad intraindividual por exceso observada en algunos in-

dividuos.

La variabilidad que surge espontáneamente en cada generación tendría valores bajos pues ya la variabilidad total los presenta como se observa en los histogramas de frecuencias. Este incremento que se produce en cada generación se heredaría en la siguiente, y a la vez en esta última aparecería un nuevo incremento neto en dicha tasa, que de nuevo se transmitiría a la generación siguiente y así sucesivamente.

En otro orden de cosas, al calcular los incrementos de variabilidad intraindividual que se producen entre una y otra generación en cada uno de los números cromosómicos, se observa que tales incrementos son estadísticamente significativos sólo para $2n=60$. Este significaría pues el punto más estable en el que se encuentra la población lucense que, además, es el más frecuente. Otras poblaciones sin embargo se hayan en otro nivel del proceso evolutivo cual es $2n=58$ en el caso de las poblaciones americanas estudiadas por Thorgaard (1983).

Una vez comprobado que la variabilidad cromosómica es una característica propia de la especie *Salmo gairneri*, y que ésta se hereda con el transcurso de las generaciones, cabría preguntarse si ambos parentales influyen por igual en dicho proceso o si por el contrario, uno de ellos lo hace en mayor proporción que el otro, o lo que es lo mismo, si este polimorfismo se transmite preferencialmente por alguna de las dos vías parentales. En este sentido, tanto el análisis de familias como el realizado a nivel poblacional demuestran que en la herencia de dicho fenómeno el progenitor masculino influye de manera decisoria y en mayor escala que el femenino. Tal afirmación se fundamenta en los siguientes resultados:

1) cuando la tasa de variabilidad del padre es 0 ($HA=0$), prácticamente toda la descendencia presenta valores medios o bajos (inferiores al 18%) de variabilidad intraindividual, a diferencia de cuando lo es la madre, entonces sólo el 69% de los hijos presentan tales valores,

2) los únicos cruces en los cuales la progenie se caracteriza por los altos valores de variabilidad intraindividual son aquellos en los que el parental masculino presenta tasas de variabilidad cromosómica sensiblemente superiores a las de la hembra (subclase $HA < MA$, cruces 11 y 17),

3) en cambio, cuando sucede a la inversa, es decir, $HA > MA$, las gráficas de distribución de frecuencias de los valores de variabilidad intraindividual de la descendencia se encuentran sesgadas hacia los valores bajos y tanto más cuanto menor es el número cromosómico del padre y por tanto su tasa de variabilidad,

4) el coeficiente de correlación (r) observado entre la tasa de polimorfismo intraindividual de las progenies (DDA y DTA) y la de los progenitores (HA y MA) es bastante más elevado cuando se trata del parental masculino (0.86 para las diploides y 0.64 para las triploides) que cuando se relaciona con el parental femenino (0.54 y 0.45 respectivamente), a pesar de que en ambos casos la correlación es estadísticamente significativa.

Esta menor contribución a la variabilidad intraindividual de la descendencia por parte de la madre, se explicaría como una consecuencia de la forma de llevarse a cabo la ovogénesis. Durante las anafases I y II que en ella tienen lugar, podrían emigrar a los polos correspondientes al primer y segundo corpúsculo polar aquellas dotaciones haploides descompensadas o portadoras de algún tipo de reordenación cromosómica. La formación de ambos corpúsculos polares supondría pues una vía de "drenaje" de aquellas dotaciones cromosómicas anómalas pudiendo constituir así un método eficaz para seleccionar gametos con $n=30$ cromosomas y dosis génicas equilibradas (conviene recordar que $2n=60$ y $3n=90$ son los complementos más frecuentes en la población de estudio). Comprobación experimental de un fenómeno similar la aportaron Sturtevant y Beadle (1936) en *Drosophila melanogaster*. En heterocigotos para inversiones de esta especie, durante la 1ª división meiótica emigra al primer corpúsculo polar una cromátida intacta (normal o invertida) quedando en el oocito II otra cromátida intacta (invertida o normal, respectivamente) y un puente anafásico. En la anafase II, este puente emigra al segundo corpúsculo polar mientras que la cromátida intacta lo hace hacia el polo que dará origen a la futura ovótida. Por consiguiente, todos los gametos producidos serían portadores de una cromátida completa y por tanto viables.

Por lo que se refiere a las progenies triploides, parece ser que estas siguen un comportamiento similar al de las diploides ya que ellas también heredan, y a la

vez engendran, cierta tasa de variabilidad intraindividual y ésta mayoritariamente también es por defecto. Sin embargo, hay tres aspectos diferenciales en dicho comportamiento, a saber, 1) los incrementos netos de variabilidad respecto a los progenitores son de menor magnitud, 2) aparece una mayor proporción de descendientes con valores nulos de variabilidad intraindividual en cada cruzamiento, y 3) las tasas de variabilidad intraindividual de las progenes triploides, con alguna excepción, son considerablemente menores que las de sus hermanos diploides.

Estas tres consideraciones hacen pensar en un posible efecto amortiguador ejercido por el estado triploide *per se* sobre este fenómeno de variabilidad cromosómica, de tal forma que en la descendencia triploide dicha tasa no se heredaría ni se generaría con la misma intensidad que en la diploide. Dado que los triploides surgen a partir de dos dotaciones cromosómicas maternas y una paterna, el hecho comentado encajaría perfectamente con la mayor influencia que tiene el progenitor masculino sobre la variabilidad de la descendencia y que obviamente en los triploides se vería sensiblemente disminuida al aportar éste la mitad del material hereditario que la madre. Como consecuencia, las posibles incompatibilidades genéticas entre los dos gametos parentales después de la fertilización aparecerían subdimensionadas al pasarse de una proporción 1:1 a otra 2:1. Esta posible explicación, basada en el efecto amortiguador de la triploidía, ya fue apuntada por nosotros mismos en una publicación anterior (Lozano y col., 1988).

5.2.1.3.- Herencia del polimorfismo cromosómico interindividual

En cada una de las familias analizadas aparece una determinada tasa de polimorfismo cromosómico interindividual que no se esperaría sobre la base de una gametogénesis regular (Tabla XVI). La explicación a este hecho puede provenir de tres caminos. El primero de ellos sería la no validez de nuestra suposición, es decir, la existencia de una meiosis anormal en los progenitores y como consecuencia la producción de gametos con dosis génicas descompensadas. Esto conduciría inequívocamente a una menor viabilidad de las progenes surgidas de tales reproductores. Esto es realmente lo que se observa cuando se trata de relacionar la tasa de polimorfismo cromosómico no esperado de cada progenie (VID y VIT) con la supervivencia de la misma (S2n y S3n respectivamen-

te). Al aumentar la primera de las variables disminuye la segunda ($r = -0.46$ para la descendencia diploide y -0.36 para la triploide). Y algo similar sucede al comparar las tasas de variabilidad intraindividual de los progenitores y de la descendencia engendrada con la supervivencia de esta última (ver Tabla XV). En definitiva, se observa un descenso en las tasas de supervivencia de las progenes asociado, tanto al incremento en sus propias tasas de variabilidad intra o interindividual, como en las correspondientes a los parentales que las originaron. Dicha conclusión está totalmente de acuerdo con la existencia de segregaciones anormales durante la gametogénesis.

En segundo lugar, podría suceder que los parentales que intervienen en cada cruzamiento fuesen heterocigotos para un número determinado de translocaciones robertsonianas, y no homocigotos como nosotros los hemos considerado. Si ello ocurriese, tras la meiosis se formarían tanto gametos portadores de todas las ordenaciones translocadas o normales como gametos portadores de un cierto número de ordenaciones normales y el resto translocadas. Se originarían así complementos haploides distintos de los esperados para una segregación normal. Así, en la figura 30 se esquematizan las posibles segregaciones anafásicas de dos individuos, uno con cariotipo $2n=60$ heterocigoto para dos fusiones céntricas, y otro con cariotipo $2n=63$ heterocigoto para tres fusiones céntricas. Como se puede observar en el primero de ellos (Fig.30a), además de los gametos esperados con 30 cromosomas pueden aparecer gametos con 29 y 31 cromosomas respectivamente. Algo similar ocurre en el segundo ejemplo (Fig.30b); junto a los gametos esperados con 31 y 32 cromosomas, este individuo puede producir gametos con 30 y 33 cromosomas respectivamente.

Por último, una tercera hipótesis complementaria para explicar la aparición de números cromosómicos no esperados en los distintos cruzamientos podría encontrarse al relacionar los niveles somático y sexual. Si en el nivel somático ya se observa de forma continuada cierta tasa de variabilidad intraindividual, podría suceder que los mismos mecanismos que originan dicho fenómeno fuesen operativos también a nivel germinativo afectando a aquellas células que posteriormente entrarán en meiosis para producir los correspondientes gametos, espermatogonias, espermatoцитos I, oogonias y oocitos I. De esta forma las reordenaciones cromosómicas también estarían presentes en las células madre de los gametos y por tanto se transmitirían a la descendencia.

Al igual que ocurre con la variabilidad cromosómica a nivel intraindividual, el polimorfismo cromosómico interindividual se encuentra mayoritariamente representado (66.67%) por números cromosómicos menores que el esperado, es decir, que el polimorfismo por defecto es más frecuente que el polimorfismo por exceso, si bien este último se encuentra también presente en algunos cruzamientos (23.81%). La mayor parte del polimorfismo por defecto se ha originado por la existencia de complementos cromosómicos con $2n=60$ y $3n=90$ cromosomas respectivamente cuando éstos no serían los realmente esperados bajo la suposición de una segregación meiótica regular. Sobre la base de que $2n=60$ sería el número más estable en nuestra población, la hipótesis más probable sería el que dicho cariotipo se hubiese formado tras la fecundación de un óvulo y un espermatozoide, ambos con $n=30$ cromosomas, y no a partir de otras posibles constituciones gaméticas. Esto de alguna manera vendría a demostrar que tales gametos, teóricamente equilibrados, estarían seleccionados favorablemente, bien porque se produzcan en mayor proporción durante la gametogénesis o bien por ser ellos los que originen descendencias con mayores tasas de viabilidad. Paralelamente también podría tener lugar un fenómeno de apareamiento preferencial por el cual, un óvulo se dejase fecundar preferentemente por aquel espermatozoide que poseyera esta dotación compensada, o a la inversa.

Thorgaard (1976) propone, al igual que nosotros, que la variabilidad interindividual presente en su población es heredada y no somática en base a tres razones: 1) la baja tasa de variabilidad intraindividual observada (en torno al 6%), que él atribuye a errores en el conteo, 2) el diferente número de cromosomas subtelocéntricos (2,3 y 4) presentes en los individuos con 58, 59 y 60 cromosomas, respectivamente, lo que se corresponde con lo esperado si se consideran a los individuos con $2n=59$ heterocigotos para una fusión céntrica que implicase a un cromosoma subtelocéntrico y otro telocéntrico, y 3) las frecuencias de individuos con distintos números cromosómicos en la población analizada se ajustan a las previstas por la ley de Hardy-Weinberg para un polimorfismo heredado.

Nuestros resultados, a pesar de estar de acuerdo con que tal polimorfismo es en parte heredado, no concuerdan con las observaciones de Thorgaard. En primer lugar porque la variabilidad intraindividual no es consecuencia de errores experimentales (independientemente de que en algún caso particular sí lo sean) sino

que es un fenómeno real descrito asimismo por otros autores no sólo en la trucha arco-iris (Ohno y col., 1965; Heckman y col., 1971; Hartley y Horne, 1982; Ueda y col., 1983; Bolla, 1987) sino también en otras especies de salmónidos como la trucha común, *Salmo trutta* (Zenzes y Voiculescu, 1975), la trucha dorada, *Salmo aguabonita* (Gold y Gall, 1975) o salmón atlántico, *Salmo salar* (Roberts, 1968, 1970; Barsiene, 1981; Hartley y Horne, 1984b). Es de señalar que todos estos autores no han empleado las mismas técnicas citogenéticas y que, por otra parte, sería bastante improbable que todos ellos hubiesen cometido los errores de conteo a los que se refiere Thorgaard. En relación al segundo argumento, el trabajo de Thorgaard es el único de los varios existentes en la bibliografía donde se observan más de dos cromosomas subtelocéntricos en el cariotipo de la trucha arco-iris. Todos los trabajos citados en la presente memoria, incluido el nuestro, presentan complementos diploides con 1 ó 2 cromosomas subtelocéntricos, lo cual apunta en favor de las ya mencionadas diferencias cromosómicas entre poblaciones. En último término y aunque nuestro análisis no incluye un ajuste a las predicciones de Hardy-Weinberg, se observa fácilmente que en él los resultados no se ajustan a las proporciones esperadas, lo cual es en cierta medida lógica si, como ya hemos indicado, existe cierta tasa de variabilidad no esperada la cual debe tener un origen *de novo*. En relación con esta última observación, nuestros datos coinciden plenamente con los obtenidos por Ueda y Ojima (1984b) aunque ellos sólo realizaron un cruzamiento controlado y no determinaron ninguno de los parámetros considerados en nuestro análisis.

5.2.1.4. Relación entre variabilidad cromosómica intraindividual y polimorfismo cromosómico interindividual

De lo comentado hasta el momento se deduce un hecho significativo, quizás uno de los más interesantes desde nuestro punto de vista, y es la estrecha relación existente entre el fenómeno de variabilidad cromosómica intraindividual y el polimorfismo cromosómico interindividual no esperado. No se trata de dos procesos que operan independientemente uno del otro, sino que por el contrario están correlacionados entre sí, tanto a nivel diploide ($r=0.50$) como triploide ($r=0.74$). Esta idea viene refrendada por el hecho observado en nuestro análisis de que a medida que aumenta o disminuye la tasa de variabilidad intraindividual de los progenitores de un determinado cruzamiento, también lo hace y de forma paralela la tasa de polimorfismo cromosómico presente en las descendencias

diploide ($r=0.66$ en relación a la madre y $r=0.42$ en relación al padre) y triploide ($r=0.64$ respecto a la madre y $r=0.37$ respecto al padre) de tales progenitores. Incluso podría llegar a pensarse que la variabilidad cromosómica presente a nivel interindividual no es otra cosa que una amplificación de la que tiene lugar intraindividualmente. Esta hipótesis vendría avalada por el hecho de que en cada generación se produce un incremento en la tasa de variabilidad intraindividual. Por tanto no sería erróneo considerar que un individuo con 62 cromosomas y una tasa de variabilidad intraindividual por defecto del 20% por ejemplo (el 20% de las metafases tendrían 61 o 60 cromosomas), en el transcurso de varias generaciones hubiese originado descendientes con cariotipos $2n=60$ y una tasa de variabilidad intraindividual por exceso del 20% por ejemplo (el 20% de sus metafases tendrían más de 60 cromosomas). Esta última sería la tasa heredada de sus progenitores ancestrales mientras que el valor modal podría haberse adquirido en el curso de varias generaciones gracias a esos incrementos ya señalados.

5.2.2.- Sobre los cariotipos de *Salmo gairdneri* y *Oncorhynchus kisutch*

En la bibliografía aparecen abundantes citas relacionadas con la descripción del cariotipo de la trucha arco-iris (*S.gairdneri*), coincidiendo todas ellas con el descrito por nosotros en las dos poblaciones analizadas. Tan sólo ciertas discrepancias en la asignación del par sexual pueden ser observadas entre los distintos autores, incluídos nosotros. Por ejemplo, Thorgaard (1977) afirmó que dicho par cromosómico se correspondía con el único par subtelocéntrico de pequeño tamaño, y ello en base a la existencia de un claro heteromorfismo presente en 23 machos estudiados pero no en las 21 hembras analizadas. En este mismo sentido se han pronunciado Ueda y Ojima (1984a) a partir de análisis cariológicos realizados en poblaciones japonesas. De nuestros resultados en cambio, al igual que de los obtenidos por otros autores (Fukuoka, 1972, Hartley Horne, 1982, 1984a, Phillips y Ihssen, 1985a), no se puede deducir tal conclusión, ya que en ambos sexos se ha podido observar heteromorfismo para el único par subtelocéntrico del cariotipo de esta especie.

Si tenemos presente que la trucha arco-iris es una de las especies de salmónidos con mayor incidencia de polimorfismos cromosómicos, no sería de extrañar que tal heterocigosidad fuese debida a una de las muchas reordenaciones cromosómicas que se producen en esta especie.

sómicas que han tenido lugar durante la evolución cariológica de la trucha arco-iris. Por otra parte, la no coincidencia entre los resultados de Thorgaard y los nuestros podría estar relacionada con la variedad estudiada. El analizó una variedad, la "steelhead" o cabeza de acero, que nunca estuvo presente en nuestro trabajo. Junto a esto, habría que mencionar que los datos de este autor no están exentos de anomalías. Así, tal y como él mismo señala, dos de los machos estudiados eran portadores del mismo "par sexual" que las hembras, pudiéndose atribuir dicha irregularidad, según él, al hecho de que el proceso de diferenciación de los cromosomas X e Y aún se encuentra en una fase muy temprana.

Por lo que respecta al salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), el cariotipo que hemos descrito para la población de Orol (46 M+SM + 14 ST+T; NF=106) coincide con el citado previamente por Uyeno (1972), pero no con el que aportó Ueda (1983) posteriormente. Si bien ambos autores estudiaron poblaciones japonesas de esta especie, el último de ellos señala la existencia de 48 cromosomas metacéntricos (48 M+SM) y 12 acrocéntricos (ST+T) siendo el número de brazos de 108. Esta diferencia puede residir en la denominación de uno de los pares pequeños que Uyeno y nosotros hemos considerado como subtelocéntrico mientras que Ueda lo identificó como submetacéntrico y por tanto con dos brazos cromosómicos.

Tampoco en el cariotipo de *O. kisutch* se han podido reconocer los cromosomas sexuales aunque en un principio nosotros pensamos que éstos pudieran ser los únicos en el complemento diploide que poseen una banda C heterocromática en todo un brazo cromosómico, que además es CMA⁺ y resistente a la digestión con determinadas endonucleasas. Este marcador, que varía de tamaño y posición de unos individuos a otros, se encuentra presente, sin embargo, tanto en machos como en hembras. En la misma zona también se sitúan las regiones organizadoras del nucleolo. Sin embargo, esto no sería un obstáculo para pensar que tal pareja, atípica dentro del cariotipo de esta especie, fuese la sexual, lógicamente en una etapa prematura de diferenciación, ya que algo similar es lo que sucede en la trucha de lago (*Salvelinus namaycush*), única especie de salmónidos donde se han caracterizado claramente los cromosomas sexuales. En ella, Phillips y Ihssen (1985a) identificaron los cromosomas X e Y como una pareja metacéntrica portadora de una banda C positiva y quinacrina positiva en

el extremo de uno de los brazos del cromosoma X pero no en el del Y. Por otra parte, el primero de ellos es el único cromosoma del complemento que presenta ambas características (C⁺ y Q⁺). Como tales autores sugieren, y algo similar podría ocurrir en el salmón coho, el incremento en la cantidad de heterocromatina del cromosoma X podría inhibir el crossing-over entre éste y el Y cumpliéndose así el primer requisito para la diferenciación de los cromosomas sexuales.

5.2.3. Las regiones organizadoras del nucleolo

Como se deduce de los resultados obtenidos, en el salmón coho existe un polimorfismo cromosómico muy interesante en el par 15. Por una parte, las regiones polimórficas constituyen las bandas heterocromáticas más evidentes y de mayor tamaño del cariotipo de la especie; además son CMA⁺ y resistentes a la actividad endonucleásica de ciertas enzimas de restricción. Pero lo que es más importante, en dicha región se hayan ubicadas las regiones organizadoras del nucleolo (NORs), en las cuales también existe un polimorfismo cromosómico por cuanto el tamaño y la localización de las zonas NOR, y la morfología del cromosoma portador de las mismas varía de unos individuos a otros.

A falta de una comprobación experimental más detallada pensamos que dicho polimorfismo podría estar relacionado con un fenómeno de translocación no recíproca que tuviese lugar en uno de los componentes del par 15. Ello explicaría la presencia en nuestra población de individuos con las características cariológicas de la variante primera descrita en el capítulo de resultados. Tales individuos serían heterocigotos para dicha translocación y por tanto son los que presentan, en la pareja NOR, un cromosoma metacéntrico normal en el que la actividad NOR abarca casi la totalidad de uno de los brazos (parece ser un NOR duplicado varias veces) y otro cromosoma submeta/subtelocéntrico por haberse translocado parte del brazo con actividad NOR a otro cromosoma, presumiblemente a uno de los subtelocéntricos pequeños que ahora forma un cromosoma submeta-céntrico de gran tamaño como el observado en algunos individuos. Recordemos que en los heterocigotos existe un número impar de cromosomas pequeños subtelocéntricos. Por efecto de la transposición, parte de la zona NOR permanece activa en el cromosoma 15 translocado, pero la parte que se ha integrado en el cromosoma pequeño no sólo perdería la actividad NOR sino que además se habría eucromatinizado como lo indica la ausencia de una banda C⁺ en el nuevo

cromosoma submetacéntrico formado.

La presencia de individuos donde se mantiene el mismo tipo de heterocigosidad estructural para la zona NOR pero, en los que, por el contrario, no se observa un número impar de cromosomas pequeños ni se encuentra presente este gran cromosoma submetacéntrico requeriría de otro tipo de reordenación cromosómica para su explicación. En este caso, dicho polimorfismo podría estar causado por una deleción en un brazo de uno de los cromosomas del par 15 siendo los individuos heterocigóticos, portadores de un cromosoma metacéntrico normal y otro submeta/subtelocéntrico. Realmente, las dos fenómenos propuestos para explicar el polimorfismo para las regiones organizadoras del nucleolo y la heterocromatina asociada a las mismas, translocación y deleción, vienen a ser uno mismo. Ambos suponen la rotura y separación de un fragmento cromosómico perteneciente a un cromosoma metacéntrico, sólo que un caso dicho fragmento se añadiría a otro cromosoma del complemento y en otro éste se perdería.

Las reordenaciones cromosómicas que afectan a los NORs no son raras entre los salmónidos. Recientemente y en este mismo género, Phillips y Kapuscinski (1987) han descrito una translocación robertsoniana, concretamente una fisión céntrica, que afecta a la pareja NOR de *Oncorhynchus gorbuscha*. Pero en este caso, la naturaleza del polimorfismo era evidente por cuanto en los heterocigotos para dicha fisión, el número cromosómico aumentaba de $2n=52$ a $2n=53$.

Pero, incluso en los individuos homocigóticos estándar de salmón coho analizados por nosotros, con dos cromosomas metacéntricos portadores de NOR, la posición relativa de los NOR cambia de uno respecto a otro. En bastantes metafases además, se observa que uno de estos metacéntricos presenta el NOR una o varias veces duplicado extendiéndose los depósitos de plata por casi todo el brazo. En base a estas observaciones y a la perfecta homología del brazo eucromático de ambos cromosomas podría pensarse que la deleción propuesta anteriormente ha tenido lugar a nivel de una de las constricciones secundarias duplicadas, permaneciendo en el cromosoma delecionado sólo una de ellas con actividad NOR. La existencia de NORs duplicados explicaría la distinta posición de dichas actividades en los individuos homocigóticos; y es que en uno de los cromosomas metacéntricos, los cistrones ribosómicos transcritos en la interfase precedente pudieron haber sido los que ocupan la posición terminal

mientras que en el homólogo lo sería el que se sitúa más intersticialmente, tal y como muestra las Figuras 15 y 16...

En otras especies de salmónidos como *Salvelinus alpinus* se ha encontrado una gran variabilidad en cuanto al número de NORs en diferentes stocks, con variantes que van desde 2 hasta 8 NORs por célula, habiéndose explicado esta variabilidad como consecuencia de fenómenos de transposición (Phillips y col., 1988). En definitiva, tanto por nuestros estudios como por los de otros autores, se llega a la conclusión de que las zonas NOR de algunos salmónidos constituyen regiones especialmente propensas a la existencia de diferentes fenómenos de variabilidad (translocaciones, duplicaciones, deleciones, transposiciones, etc.), algo que también sucede en diferentes grupos animales (insectos, anuros y mamíferos) y vegetales (liliáceas, cereales, etc.).

Es de destacar que, en cualquiera de los casos, nuestros resultados acerca de la localización de las regiones de organizador nucleolar en el salmón coho no coinciden con los obtenidos por Phillips y col. (1986a). Estos autores encontraron que tales regiones se localizan en el brazo corto de una pareja de cromosomas acrocéntricos, sin que hasta el momento podamos explicar esta discrepancia: ¿distintas razas cromosómicas?, ¿existencia de fenómenos de hibridación inter-específica?...

A diferencia de *O. kisutch*, los ejemplares diploides de *S. gairdneri* no presentan variabilidad para la pareja cromosómica portadora de los NORs, coincidiendo nuestros datos acerca de la localización y naturaleza de estas regiones, con los de otros autores como Schmid y col. (1982), Phillips y Ihssen (1985b) y Mayr y col. (1986). Ni tan siquiera en los casos de variabilidad intra o interindividual para el número cromosómico se han detectado cambios en la localización y/o tamaño de los NORs. Parece como si la pareja portadora de éstos no se viera afectada por ningún tipo de reordenación cromosómica capaz de modificar el patrón NOR.

En los triploides artificiales de ambas especies obtenidos por nosotros destacan dos hechos, con respecto a los NORs: 1) el número de regiones NOR y nucleolos no está sometido a ningún mecanismo de compensación de dosis, es decir, que el número de NORs activos y nucleolos corresponde, e incluso en algunas truchas

triploides sobrepasa, al nivel de ploidía, existiendo normalmente tres NORs y tres nucleolos (aunque en la trucha ambos varían de dos a cuatro); 2) tanto en los triploides de trucha arco-iris como en los de salmón coho se encuentran cromosomas con actividad NOR que no se detectan como tales en sus congéneres diploides. Concretamente, en los triploides de las dos especies aparece con actividad NOR un cromosoma metacéntrico grande que no se observa en los diploides. E incluso en *S. gairdneri* aparece también con actividad NOR un cromosoma metacéntrico de menor tamaño que los NOR presentes en el cariotipo diploide.

La primera observación choca aparentemente con la realizada en híbridos animales y vegetales y aloploides vegetales (véase revisión de Flavell, 1986), en los que se establecen mecanismos de compensación de la dosis de los NORs presentes, existiendo NORs dominantes que forman nucleolos y otros inactivos que no lo forman. La ausencia de mecanismos de compensación de dosis para NORs y nucleolos en los triploides de trucha y salmón podría ser debida a su naturaleza autopoliploide. Y es que, como recientemente han preconizado Thompson y Flavell (1988), el fenómeno de dominancia que existe entre NORs en híbridos y aloploides puede estar basado en el hecho de que los diferentes loci ribosómicos de las especies puestas en contacto en estos organismos compiten para acomplejar ciertos factores presentes en las células en concentraciones limitadas (la unión de dichos factores a los genes ribosómicos sería necesaria para que tales genes fuesen activos, se transcribiesen y por tanto, se tiñeran con plata). En el caso de los triploides de trucha y salmón, los cromosomas con actividad NOR repetidos (en este caso triplicados) tendrían todos la misma aptitud para competir por esos factores (cuya síntesis también podría verse incrementada por la triploidía) pues son estrictamente autopoliploides. Por lo tanto, no existirían fenómenos de dominancia (anfiplastia) entre ellos, permaneciendo todos activos y formando todos ellos nucleolos.

Pasando al segundo aspecto, es extraño que en los triploides existan ciertos cromosomas con actividad NOR que no están presentes en los diploides. Pensamos que una posible explicación de este fenómeno podría estar relacionada, por una parte con la propia naturaleza triploide de los mismos, y, por otra, con el hecho de que truchas y salmónes sean de origen tetraploide ancestral en proceso de diploidización. En este sentido, es posible pensar que, aunque en los

genomas estándar diploides de salmones y truchas sólo se detecta una pareja de NORs activos (Phillis y Ihssen, 1985a; Phillips y col., 1986a; Mayr y col., 1986; Phillips y Kapuscinski, 1987, y la presente memoria), puede que en estos genomas existan uno o dos cromosomas NORs adicionales relictos del proceso de tetraploidía, y que tales cromosomas pueden ser reactivados como consecuencia de la triploidía artificial. Sería ésta otra situación en que al cambiar el "background" genético, en este caso el nivel de ploidía, también cambia el status de inactivación-activación de las zonas NORs presentes en el genoma. Thompson y Flavell (1988) han encontrado situaciones similares en diferentes híbridos de cereales en los que ciertos genes ribosómicos se activan diferencialmente según el entorno genético en el que se encuentren. Precisamente estos autores han asociado tales cambios a alteraciones en la distribución dentro de los genes ribosómicos de sitios CCGG no metilados, y a cambios de la conformación de la cromatina en el interior de los mismos.

Con respecto a la posibilidad de que en los genomas diploides de *S. gairdneri* y *O. kisutch* existan cromosomas NOR inactivos, hay que mencionar que Phillips y col. (1986a) han encontrado que los NORs de otra especie de la familia Salmonidae (*Oncorhynchus gorbuscha*) son muy similares a los que aparecen activos *de novo* en los triploides de las dos especies aquí estudiadas. Concretamente los NORs de *O. gorbuscha* se localizan, en posición pericentromérica, en un par cromosómico metacéntrico, similar en tamaño, morfología y posición de la zona NOR al que aparece *de novo* en los triploides de trucha y salmón. Se podría pensar por ello, que en el ancestral tetraploide de los salmónidos existieron dos parejas diferentes de cromosomas con actividad NOR, y que tras el proceso de diploidización, unas especies mantuvieron activa una pareja y otros grupos la otra, pero que, al menos en trucha arco-iris y salmón coho, la otra pareja permanece en el genoma (en todos o en algunos individuos) portando genes ADN_r aunque normalmente inactivos. La triploidía inducida artificialmente podría actuar como desencadenante de su activación. En la actualidad nos disponemos a probar esta hipótesis realizando experiencias de hibridación *in situ* con sondas de ADN_r tanto en diploides como en triploides. Asimismo, nos proponemos analizar, con un compuesto químico como la 5-azacitidina que inhibe la metilación del ADN, la posible metilación diferencial de los cromosomas que pasan de ser NOR-inactivos en los diploides a NOR-activos en los triploides.

Pero quizás sea el comportamiento frente a la digestión con endonucleasas

Es digno de mencionar también en relación con las zonas NOR de los triploides, cómo en el caso de la trucha arco-iris la heterocromatina asociada a los NOR activos que aparecen *de novo* en los triploides, mantienen el mismo patrón de bandeo C y fluorescencia que tenían en los diploides: por ejemplo, siguen siendo C⁻ y DAPI neutros (Figs. 6a y 8) y no son C⁺ y DAPI negativos como los NORs activos normales. En cambio, en el salmón coho la heterocromatina asociada a las zonas NOR activas que aparecen *de novo* en los triploides pasan de ser CMA₃⁻ a ser CMA₃⁺ (Fig. 18) como ocurre en los NOR activos normales de la especie. Es difícil de explicar esta última observación: ¿será que la presencia de las proteínas no histónicas con afinidad por los iones Ag⁺ influyen en la interacción de la cromomícina con el ADN presente en estas regiones?. Nos proponemos profundizar en este problema en posteriores investigaciones.

5.2.4.- Caracterización de la heterocromatina constitutiva

En este apartado distinguiremos entre la heterocromatina asociada a las regiones organizadoras del nucleolo y el resto de la heterocromatina, centromérica y telomérica fundamentalmente.

5.2.4.1. Heterocromatina asociada a los NORs

En primer lugar hay que decir que la heterocromatina asociada a los NORs de las dos especies analizadas es, hasta cierto punto, diferente. Ambas son ricas en pares de bases citosina-guanina como lo demuestra la tinción positiva CMA₃/DA. Sin embargo, empleando la misma combinación de fluorocromos, la heterocromatina NOR del salmón fluoresce con mayor intensidad que lo hace la de trucha arco-iris. Este distinto comportamiento podría deberse a las propias diferencias en la cantidad y distribución de los pares GC en una y otra especie, al igual que sucede con los distintos tipos de heterocromatina constitutiva de humanos y ratón, si bien en estas dos especies la heterocromatina es rica en pares de bases adenina-timina (Schweizer, 1983). A pesar de ello, no conviene descartar otros factores que influyen en la interacción de los fluorocromos con regiones específicas del ADN, como son la compactación de la heterocromatina y la presencia de proteínas no histónicas (Fernández-Piqueras, 1985).

Pero quizás sea el comportamiento frente a la digestión con endonucleasas

específicas el aspecto en el que más difiere la heterocromatina asociada a los NORs de una y otra especie. Y es que en *S.gairdneri* dicha heterocromatina es digerida por enzimas como Alu I y Mbo I mientras que en *O.kisutch*, esta heterocromatina resiste a estas mismas acciones enzimáticas. De igual manera, la digestión con Hae III, Hinf I y Dra I proporciona resultados distintos toda vez que en la trucha arco-iris tales endonucleasas digieren por igual la heterocromatina NOR y las regiones eucromáticas mientras que en el salmón dichos enzimas extraen prácticamente todo el ADN de las regiones de heterocromatina NOR, observándose una tinción diferencial respecto al resto del cariotipo (véanse Figs.9a,b,c y 23). En esta última especie resulta extraño cómo la heterocromatina NOR, que es rica en pares GC, es absolutamente digerida tanto por Hae III y, un enzima con diana tetramérica G/C (GG/CC), como con Dra I, un enzima que reconoce un hexámero del tipo TTT/AAA.

Como han señalado en sucesivas ocasiones autores como Burkholder y Weaver (1977), Miller y col. (1983), Mezzanotte y Ferrucci (1984) y Mezzanotte (1986) la actuación de los enzimas de restricción sobre la cromatina y los cromosomas animales fijados parece depender del grado de accesibilidad de tales restrictasas al ADN (sobre todo en el caso de la heterocromatina) así como de la extractibilidad de los fragmentos que aparecen tras digestión, lo que a su vez depende del tamaño de los mismos y ello de la existencia y número de dianas específicas para cada enzima. Por otra parte Lloyd y Thorgaard (1988) han demostrado recientemente que las endonucleasas extraen el ADN de los cromosomas fijados de trucha arco-iris. Teniendo presente estos aspectos, las diferencias que hemos encontrado tras la actuación de los enzimas de restricción sobre la heterocromatina NOR de trucha y salmón podrían ser indicativas de dos fenómenos. En primer lugar, es posible que ambas especies difieran claramente en la secuencia del ADN existente en la heterocromatina NOR, y que por ello, ciertas enzimas corten las zonas heterocromáticas asociadas a los NORs de una especie y no lo hagan en la otra. Por otro lado, la "limpieza" con la que algunos enzimas como Hae III y Hinf I digieren estas regiones, en el salmón por ejemplo, podría indicar una especial sensibilidad de esta zona al ataque mediante endonucleasas de restricción. En relación con el primer aspecto (la posible divergencia de ambas especies en la secuencia del ADN existente en la heterocromatina asociada a las zonas NORs), sería interesante investigar si, como ocurre en otras especies como el maíz (por ejemplo véase Givens y Phillips, 1976), tales regiones

heterocromáticas son portadoras de cistrones ribosómicos inactivos. Si así fuese, se pondría de manifiesto que las cistrones ribosómicos inactivos habrían divergido más que los activos. Schmid y col.(1982) han demostrado que las secuencias codificadoras de los cistrones ribosómicos activos presentes en las propias zonas NOR de varias especies de salmónidos parecen haberse mantenido invariables en el curso de la divergencia de las especies. El segundo fenómeno (la especial accesibilidad de las regiones heterocromáticas asociadas a los NOR frente a las enzimas de restricción), podría estar relacionado con el hecho de que esta región se encuentra muy próxima (¿o se solapa?) con otra región (la región NOR) que según se conoce (Givens y Phillips, 1976), permanece descondensada durante casi todo el ciclo celular.

5.2.4.2. Heterocromatina centromérica y telomérica

El primer aspecto que llama la atención es la presencia de bandas C⁺ en la mayoría de las regiones centroméricas de ambas especies y la ausencia de dichas bandas en los telómeros de las mismas. Sin embargo, la heterocromatina centromérica no es de la misma naturaleza en salmónes y truchas como se deduce de la diferente afinidad de una y otra por determinados fluorocromos. Así, mientras que las regiones centroméricas de *O.kisutch* (Figs.18 y 19) se muestran DAPI y CMA₃ neutras, las de *S.gairdneri* presentan tinción positiva para el DAPI y neutra para la CMA₃ (Fig.6c y d). Estas observaciones hablarían en favor de una divergencia a nivel molecular de las secuencias de ADN repetitivo entre especies emparentadas.

Pasando a las enzimas de restricción, excepto Dra I, que digiere completamente la heterocromatina NOR del salmón coho y Pvu II que apenas origina un tímido bandeo C en esta misma especie, el resto de enzimas con secuencias de reconocimiento hexaméricas (Bgl II, Hinf III y Dra I en trucha arco-iris) no parecen tener efectos dignos de mencionar sobre los cromosomas fijados de ambas especies. Este hecho coincide con observado recientemente por Lloyd y Thorgaard (1988) en cromosomas de trucha arco-iris tratados con Eco RI y Hind III (ambos con dianas hexaméricas) así como con los resultados obtenidos en cromosomas humanos sometidos a la digestión con estos mismos enzimas (Miller y col., 1983; Mezzanotte y col., 1983, 1985; Bianchi y col., 1985). En cambio las endonucleasas que reconocen secuencias de cuatro pares de bases (Alu I, Hae III, Mbo I y Rsa

l) sí que proporcionan un patrón de bandeo característico en las dos especies de salmónidos aquí analizadas, si bien la intensidad con se tiñen las bandas resistentes, ya sea con CMA o Giemsa, es sensiblemente superior en el caso del salmón. La mayor probabilidad de que la digestión con estas enzimas origine fragmentos de ADN de menos de 350 pares de bases (tamaño crítico para la extracción *in situ* según Miller y col., 1983 y Mezzanotte, 1986) sería la causa de que se observe un patrón de bandeo característico, similar al C, con estas enzimas.

Como ya citamos anteriormente, el bandeo con endonucleasas de restricción pone de manifiesto un patrón de bandas similar al bandeo C, tanto en *S. gairdneri* como en *O. kisutch*. Sin embargo, una diferencia aparece clara entre ambos métodos, y es que mientras que este último muestra la heterocromatina constitutiva propia de las zonas centroméricas esencialmente, la digestión enzimática resalta de manera primordial las regiones teloméricas, y no las centroméricas que, por el contrario son digeridas prácticamente todas ellas por enzimas del primer grupo (Alu I, Mbo I, Pvu II y Rsa I). Esta falta de correspondencia entre el bandeo C y el bandeo con enzimas de restricción también ha sido puesta de manifiesto por Gosálvez y col. (1987) y López-Fernández (1989) en dos especies de saltamontes en las cuales también Alu I induce bandas teloméricas que luego no son bandas C ni brillan al ser tratadas con fluorocromos. Estas observaciones podrían ser indicativas de una diferente organización y/o estructura de las secuencias de ADN repetido localizado en centrómeros y telómeros. La presencia de dianas específicas para estas enzimas deben de ser menos decisivos por cuanto las regiones centroméricas de la trucha arco-iris son DAPI+, y por tanto ricas en pares AT, mientras que las del salmón no lo son, aunque sin embargo, ninguna de las dos se tiñen positivamente con cromomicina, al igual que sucede con las zonas teloméricas.

Por último decir en este aspecto, que en el cariotipo de las dos especies estudiadas se encuentran ausentes zonas intercalares de heterocromatina, hecho que coincide totalmente con lo observado por investigadores anteriores.

5.2.5 .- Consideraciones sobre la utilidad de los enzimas de restricción en la Citogenética de peces

En los últimos años, a toda la batería de técnicas citogenéticas (bandeo C, G, R, N, fluorescencia...) existentes para caracterizar la cromatina de los seres vivos, se le ha venido a sumar la utilización de las endonucleasas de restricción, unas herramientas ampliamente utilizadas en los campos de la Genética Molecular y la Ingeniería Genética. Ha aparecido lo que se puede llamar el bandeo mediante enzimas de restricción (R.E.B. del inglés "Restriction Enzyme Banding"). El desarrollo de este método ha abierto perspectivas de resolver o de contribuir a resolver algunos problemas planteados en el campo de la Citogenética (como suele suceder con las técnicas recién aparecidas y novedosas). En el campo de la Citogenética de salmónidos se ha pensado que quizás este método podría proporcionar marcadores cromosómicos adecuados que permitieran la caracterización del cariotipo de estos organismos, y la determinación de la naturaleza de los abundantes polimorfismos cromosómicos existentes en algunas especies (p.e. en la trucha arco-iris, como hemos visto en este trabajo). Concretamente en algún momento se ha pensado en que, mediante la utilización de los enzimas de restricción, se podría obtener un bandeo G en peces, cosa hasta ahora difícil de resolver.

Desgraciadamente, como determinaron Lloyd y Thorgaard (1988), y como se ha comprobado en este trabajo, tras la actuación de endonucleasas específicas sobre los cromosomas fijados de peces, sólo se obtiene un bandeo C o un bandeo C modificado. Así las cosas, nos podríamos preguntar: ¿por qué las endonucleasas de restricción sólo inducen bandas C en los cromosomas de peces y no bandas G?, y en segundo lugar, ¿qué puede aportar a la Citogenética de peces la técnica de bandeo mediante enzimas de restricción?. Para responder a la primera pregunta, habría que considerar en qué organismos se pueden obtener bandas G (tanto mediante enzimas de restricción como mediante métodos convencionales) y en cuáles no, y, asimismo, cuáles son las características diferenciales de la cromatina (y del ADN) de unos y otros. En este sentido, es ampliamente conocido que son los cromosomas de los vertebrados de sangre caliente los que mediante técnicas convencionales y mediante algunos enzimas de restricción muestran un bandeo G. En cambio, los vertebra-

dos de sangre fría como los peces y anfibios, y los insectos, no presentan tal tipo de bandas, únicamente bandas C (y en todo caso, tras la digestión con ciertas enzimas de restricción, modificaciones del bandeo C). Algo similar sucede en plantas, con el "agravante" en este caso de que las endonucleasas son incapaces, en general, de digerir el ADN de la heterocromatina, incluso existiendo en ésta numerosas dianas para su actuación (Lozano y col., 1989). Por otro lado se sabe que el ADN de organismos como los anfibios y los propios peces no presenta las grandes regiones de composición homogénea y ricas en C+G llamadas isócoras, existentes en cambio en los vertebrados de sangre caliente (Olofsson y Bernardi, 1983; Bernardi y col., 1985). Recientemente Holmquist (1987) ha propuesto que la presencia de isócoras pesadas en el ADN y la existencia de bandas G en los cromosomas son manifestaciones del mismo proceso evolutivo que ha tenido lugar en mamíferos y aves pero no en anfibios y peces. Si esta relación es cierta, no sería posible obtener bandas G en peces, ni con técnicas convencionales ni tras la digestión con enzimas de restricción. Sin embargo, en la última International Chromosome Conference celebrada en Uppsala (Suecia) hace unos días, se ha presentado una comunicación por parte de Tantithakura y col. (1989) en la que mediante colagenasa, BrdU y colcemida se consigue un patrón de bandeo G de alta resolución en el pez *Xiphophorus* sp.. Habrá que esperar a ver los resultados que se obtienen con la aplicación de esta técnica a los peces para mantener o cambiar la conclusión anterior.

Nos podemos plantear ahora la pregunta sobre la utilidad del bandeo con enzimas de restricción a la Citogenética de peces, y concretamente de salmónidos. Pues bien, se puede responder que la digestión con endonucleasas de los cromosomas fijados de salmónidos como los aquí estudiados permite obtener una información muy valiosa sobre la composición de zonas cromosómicas específicas como las organizadoras del nucleolo, los centrómeros y los telómeros. Esta información complementaría la obtenida con otros métodos, fundamentalmente bandeo C, tinción con plata y fluorescencia. Pero además, se puede decir que la técnica de bandeo mediante enzimas de restricción, tal y como la hemos utilizado aquí (digestión primero con endonucleasas y tinción secuencial con fluorocromos y plata) presenta algunas ventajas con respecto al bandeo C. Y es que mediante bandeo con enzimas de restricción y tinción con fluorocromos se obtiene información sobre las regiones de heterocromatina, y la posterior tinción secuencial con plata, permite obtener información sobre las zonas NOR en las

mismas células. En cambio el bandeo C sólo permite teñir los cromosomas con fluorocromos pero no con nitrato de plata. Esto es seguramente debido a que con esta última técnica se extrae una mayor cantidad de ADN y proteínas, y de manera mucho más inespecífica (Holmquist, 1979; Hancock y Sumner, 1982; Burkholder y Duczek, 1982), que tras la digestión con enzimas de restricción, eliminándose de esta forma todo el ADNr y las proteínas asociadas, y alterando por consiguiente la actividad NOR.

Por último, mencionar que la utilización de los enzimas de restricción puede servir para aclarar la estructura de ciertas zonas como las NORs. Así, hemos podido comprobar en el salmón coho que, independientemente de que las regiones organizadoras del nucleolo sean digeridas por ciertas endonucleasas, esto no impide la ulterior visualización de los NORs mediante impregnación argéntica. Esta observación, reseñada aquí por primera vez, indica que la digestión de algunas o gran parte de las secuencias de nucleótidos situadas en estas zonas no afecta para nada las propiedades de tinción de los NORs. Nosotros pensamos en dos posibles explicaciones para esta observación. La primera estaría relacionada con el hecho de que la tinción con plata y el bandeo C (y la fluorescencia) no ponen de manifiesto las mismas regiones cromosómicas en la zona NOR. Las bandas C⁺ y CMA⁺ situadas en los brazos portadores de los NORs se situarían a ambos lados de éstos flanqueando a la constricción secundaria y, por tanto, serían adyacentes al propio NOR. En relación con ello, aunque en ocasiones se observa que las zonas donde se depositan los iones de plata se solapan con las bandas C, en otras ocasiones, como en los casos de cromosomas humanos (Pathak, 1980), cromosomas vegetales (Schubert, 1984) e incluso en la propia trucha arco-iris (Mayr y col, 1986 y nosotros mismos), la disposición de las bandas C heterocromáticas es claramente adyacente a las zonas NOR propiamente dichas. Si esto es así, la digestión de las bandas heterocromáticas asociadas a los NOR no tendría efecto sobre el ADNr con actividad NOR. Pero también podría suceder, y esta sería la segunda explicación, que los enzimas de restricción extrajeran algún ADN de la cromatina de las regiones organizadoras del nucleolo, pero que el proceso de digestión no afectara en absoluto a las proteínas responsables de la tinción con plata lo cual dejaría inalterada dicha actividad NOR.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Tras los análisis citogenéticos y biológicos llevados a cabo en dos especies de salmónidos con interés en acuicultura, *Salmo gairdneri* y *Oncorhynchus kisutch* hemos obtenido las siguientes conclusiones:

PRIMERA.- Se comprueba la eficacia del choque térmico caliente como método de inducción de triploidía en la trucha arco-iris y en el salmón coho, si bien los parámetros que determinan el equilibrio óptimo entre el porcentaje de triploides inducido y la supervivencia de los mismos durante las primeras etapas del desarrollo embrionario varían con la especie, la temperatura a la que maduran los reproductores y la presente durante el proceso de incubación así como de las características propias de cada instalación.

SEGUNDA.- Para una misma especie, el porcentaje de triploides inducido y la supervivencia de éstos parecen estar influenciados por las características genéticas de los progenitores: variedad utilizada, procedencia genética, grado de consanguinidad, grado de sincronía en la maduración sexual y calidad de los gametos.

TERCERA.- La supervivencia de los triploides obtenidos artificialmente depende de las características propias del choque térmico (temperatura, duración y tiempo de incubación), de las tasas de variabilidad intra e interindividual de las progenies tratadas, de los valores que estos mismos parámetros muestran en los parentales, y por supuesto, de las condiciones ambientales reinantes durante y después de la incubación de los huevos fecundados.

CUARTA.- Se ha podido demostrar que la triploidía artificial causa esterilidad en los animales donde ésta ha sido inducida, especialmente entre las hembras de trucha arco-iris y salmón coho. Tal esterilidad se traduce en la ausencia total o parcial de desarrollo gonadal y ello es la causa de los aumentos observados en las tasas de crecimiento de los triploides respecto a los diploides durante el periodo de madurez sexual, si bien este aspecto, que ha sido fiablemente constatado en la trucha arco-iris, requiere de investigaciones adicionales en el salmón coho.

QUINTA.- En las poblaciones de trucha arco-iris analizadas se ha puesto de manifiesto la existencia de un fenómeno de variabilidad cromosómica a niveles intra e interindividual originado por distintos tipos de reordenaciones cromosómicas de las cuales las que mayor protagonismo tienen son las fusiones y fisiones céntricas.

SEXTA.- Las poblaciones de trucha arco-iris se encuentran en proceso de diploidización de su cariotipo, ancestralmente tetraploide, como lo demuestra el diferente grado de evolución de las mismas. En dicho proceso de diploidización las fusiones céntricas juegan un papel decisivo, pudiéndose explicar la presencia de fisiones robertsonianas como reordenaciones cromosómicas dirigidas a corregir los efectos deletéreos de alguna fusión ocurrida anteriormente.

SEPTIMA.- En todas las progenies diploides analizadas se ha detectado cierta tasa de variabilidad intraindividual, la mayor parte de la cual es heredada de los progenitores mientras que otra parte de dicha variabilidad se origina *de novo* en cada generación. Además es significativo el hecho de que la mayor parte de la variabilidad que se transmite via sexual lo hace preferentemente via paterna, pudiendo suponer la gametogénesis femenina un mecanismo de "drenaje" de dotaciones cromosómicas anómalas.

OCTAVA.- Las progenies triploides, en general, siguen un comportamiento similar a las diploides en lo que a variabilidad intraindividual se refiere. Sin embargo, la triploidía inducida de nuevo parece ejercer un efecto amortiguador sobre este fenómeno que hace que dicha tasa de variabilidad sea más baja y se herede en menor proporción que las progenies diploides hermanas.

NOVENA.- El polimorfismo cromosómico presente a nivel interindividual en la trucha arco-iris también es un fenómeno heredado via sexual. La parte no esperada del mismo se puede explicar en base a tres argumentos: segregaciones meióticas irregulares en los progenitores, la existencia de individuos heterocigotos para varias reordenaciones cromosómicas y la presencia de variabilidad intraindividual en las células de la línea germinal.

DECIMA.- Variabilidad intraindividual y variabilidad interindividual no son dos fenómenos independientes sino correlacionados positivamente entre sí, pudién-

dose considerar al último como una amplificación del primero.

UNDECIMA.- Los cariotipos diploides de *Salmo gairdneri* y *Oncorhynchus kisutch* analizados en el presente trabajo coinciden en términos generales con los descritos previamente con la única excepción de que en nuestro caso, al igual que en el de otros autores, no ha podido ser identificado el par sexual en la trucha arco-iris. Por lo que se refiere a los triploides, constituye ésta la primera ocasión en que tales cariotipos han sido descritos.

DUODECIMA.- Se han detectado dos polimorfismos relacionados con las regiones organizadoras del nucleolo, uno en el nivel triploide de la trucha arco-iris que afecta tanto al número como a la morfología y tamaño de los cromosomas portadores de las zonas NOR activas, y otro en el nivel diploide del salmón coho que determina la presencia en la población analizada de tres tipos de individuos, homocigotos estándar, heterocigotos para una transposición y heterocigotos para una delección.

DECIMOTERCERA.- En los triploides obtenidos artificialmente en ambas especies se destacan dos hechos: 1) el número de zonas NOR no está sometido a ningún mecanismo de compensación de dosis y 2) aparecen nuevas zonas NOR activas que no se manifiestan en los cariotipos diploides. Ambas observaciones encuentran explicación en la naturaleza autopoliploide de los triploides inducidos y en el origen tetraploide de la familia Salmonidae, la cual se encuentra sometida a un proceso de diploidización del genoma.

DECIMOCUARTA.- Las mayores regiones de heterocromatina constitutiva de las dos especies estudiadas son las asociadas a las regiones organizadoras del nucleolo. Sin embargo, unas y otras muestran patrones de digestión diferentes con determinadas endonucleasas de restricción, diferencias que pueden ser indicativas de dos hechos: 1) la distinta composición en las secuencias de bases de la heterocromatina NOR, y 2) la existencia de una sensibilidad especial para el ataque mediante enzimas de restricción en una especie y no en la otra, lo cual a su vez dependería del grado de accesibilidad de dichas regiones de heterocromatina NOR.

DECIMOQUINTA.- El resto de la heterocromatina constitutiva de *Salmo gairdneri*

y *Oncorhynchus kisutch* se localiza exclusivamente en las regiones centroméricas y teloméricas existiendo diferencias en la composición de bases y en la estructura y organización de dicha heterocromatina entre ambos tipos de regiones como demuestran los diferentes resultados obtenidos con bandeo C y digestión *in situ* con endonucleasas de restricción. Mientras que el primero mantiene intactos los centrómeros, el segundo respeta fundamentalmente los telómeros. De igual manera, existen diferencias en la composición nucleotídica de la heterocromatina centromérica entre las dos especies analizadas toda vez que en la trucha arco-iris dichas regiones son DAPI⁺ y por tanto ricas en pares adenina-timina mientras que en el salmón coho no presentan esta característica.

DECIMOSEXTA.- Se pone de manifiesto la utilidad de las endonucleasas de restricción en la caracterización citogenética de estas especies por cuanto que la especificidad en el mecanismo de acción de tales enzimas, y la posibilidad de aplicar secuencialmente otros métodos de bandeo cromosómico como la tinción con fluorocromos y nitrato de plata, permiten obtener una más completa información sobre la composición y estructura de la cromatina de tales organismos.

DECIMOSEPTIMA.- Relacionada con la conclusión anterior, hemos podido comprobar que las regiones NOR activas permanecen inalteradas tras ser digeridas con endonucleasas tales como Hae III o Hinf I. Ello podría ser debido a que dichas enzimas sólo actúan sobre la heterocromatina asociada a los NORs pero no sobre estos mismos, o a que la digestión únicamente afecta al ADNr pero no a las proteínas responsables de la tinción con plata.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- AKERBERG, E.; S. BINGEFORS; A. JOSEFSSON y S. ELLERSTRÖM. 1963.- Induce polyploids as fodder crops. En: Recent Plant Breeding Research Svalöf 1946-1961. E. Akerberg & H. Hagberg, eds. Wiley & Sons, London, pags. 125-150.
- ALLEN, Jr. S. K.; P. S. GAGNON y H. HIDU. 1982.- Induced triploidy in the soft-shell clam: cytogenetic and allozymic confirmation. **J. Hered.**, **73:421-428**.
- ALLEN, Jr. S. K. y J. G. STANLEY. 1978.- Reproductive sterility in polyploid brook trout, *Salvelinus fontinalis*. **Trans. Am. Fish. Soc.** **107:473-478**.
- 1979.- Polyploid mosaics induced by cytochalasin B in landlocked Atlantic salmon *Salmo salar*. **Trans. Am. Fish. Soc.**, **108:462-466**.
- 1981.- Polyploidy and gynogenesis in the culture of fish and shellfish. **Int. Counc. Explor. Sea. Coop. Res. Rep.** C.M. 1981/F:28.
- 1983.- Ploidy of hybrid grass carp x bighead carp determined by flow cytometry. **Trans. Am. Fish. Soc.**, **112:431-435**.
- ALLENDORF, F. W. 1978.- Protein polymorphism and the rate of loss of duplicate gene expression. **Nature**, **272:76-79**.
- ALLENDORF, F. W. y B. P. MAY. 1975.- Gene duplication within the family Salmonidae. II. Detection and determination of the genetic control of duplicate loci through inheritance studies and the examination of populations. En: Isozymes: IV. Genetics and Evolution. C. L. Markert (ed.), Academic Press, New York, pags. 415-432.
- ALLENDORF, F. W. y G. H. THORGAARD. 1984.- Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. En: Evolutionary Genetics of fishes, Bruce J. Turner (ed.), Plenum Press, New York, pags. 1-53.

- ALLENDORF, F.W. y F.M. UTTER. 1976.- Gene duplication in the family Salmonidae. III. Linkage between two duplicated loci coding for aspartate aminotransferase in the cutthroat trout (*Salmo clarki*). **Hereditas**, **82**: 19-24.
- ALLENDORF, F.W.; F.M. UTTER y B.P. MAY. 1975.- Gene duplication within the family Salmonidae: detection and determination of the genetic control of duplicated loci through inheritance studies and the examination of populations. En: Isozymes IV. Genetics and Evolution, C.L. Market, ed. Academic Press, New York, pags. 415-431.
- AL-SABTI, K. 1985.- Chromosomal studies by blood leukocyte culture technique on three salmonids from Yugoslavian waters. **J. Fish Biol.**, **26**: 5-12.
- ARAI, K. y N.P. WILKINS. 1987.- Triploidization of brown trout (*Salmo trutta*) by heat shocks. **Aquaculture**, **64**: 97-103.
- ASTAUROV, B.L. 1969.- Experimental polyploidy in animals. **Annu. Rev. Genet.**, **3**: 99-126.
- BARSIENE, J.V. 1981.- Intercellular polymorphism of chromosome sets in the Atlantic salmon. **Tsitolgiya**, **23**: 1053-1059 (en ruso).
- BEÇAK, W.; M.L. BEÇAK y S. OHNO. 1966.- Intraindividual chromosomal polymorphism in the freen sunfish (*Lepomis cyanellus*) as evidence of somatic segregation. **Cytogenetics**, **5**: 313-320.
- BECK, M.L. y C.J. BIGGERS. 1982.- Chromosomal investigation of *Ctenopharyngodon idella* x *Aristichthys nobilis* hybrids. **Experientia**, **38**: 319.
- . 1983.- Erythrocyte measurements of diploid and triploid *Ctenopharyngodon idella* x *Hypophthalmichthys nobilis* hybrids. **J. Fish Biol.**, **22**: 497-502.
- . 1986.- The separation and cultivation of fish lymphocytes. **Fish Immunology**, **1**: 1-10.
- BECK, M.L.; E.J. BIGGERS y H.K. DUPREE. 1980.- Karyological analysis of *Ctenopharyngodon idella*, *Aristichthys nobilis* and their F1 hybrid. **Trans. Am. Fish. Soc.**, **109**: 433-438.

- BEHNKE, R.J. 1972.- The systematics of salmonid fishes of recently glaciated lakes. **J.Fish.Res.Board Can.**, **29:639-671.**
- BENFEY, y SUTTERLIN. 1984a.- Growth and gonadal development in triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Can.J.Fish.Aquat.Sci.**, **41:1387-1392.**
- 1984b.- Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, **36:359-367.**
- BERNARDI, G.; B.OLOFSSON; J.FILIPSKI; M.ZERIAL; J.SALINAS; G.CUNY; M.MEUNIER-ROTIVAL y M.RODIER. 1985.- The mosaic genome of warm-blooded vertebrates. **Science**, **228:953-958.**
- BIANCHI, N.O.; M.S.BIANCHI y J.E.CLEAVER. 1984.- The action of ultraviolet light on the patterns of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes. **Chromosoma**, **90:133-138.**
- BIANCHI, M.S.; N.O.BIANCHI; G.E.PANTELIAS y G.WOLFFS. 1985.- The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes. **Chromosoma**, **91:131-136.**
- BILLARD, R. 1977.- Utilization d'un système Tris-Glycocolle pour tamponner le dilueur d'insémination pour truite. **Bull.Fr.Pisc.**, **264:102-112.**
- BLAXHALL, P.C. 1983a.- Factors affecting lymphocyte culture for chromosome studies. **J.Fish Biol.**, **22:61-76.**
- 1983b.- Lymphocyte culture for chromosome preparation. **J. Fish Biol.**, **22:279-282.**
- 1985.- The separation and cultivation of fish lymphocytes. **Fish Immunology**, **00:247-259.**
- CHEVASSUS, D. y GUILLET, Y. 1983.- Production de saumon atlantique stérile par volégenèse. **La pisciculture française**, **78:10-19.**

- BLOOM, S.E. 1972.- Chromosome abnormalities in chicken (*Gallus domesticus*) embryos: types, frequencies and phenotypic effects. **Chromosoma**, **37**:309-326.
- BOGART, J.P. 1980.- Polyploidy in evolution of amphibians and reptiles. En: Polyploidy: Biological Relevance, H.L. Lewis, ed. Plenum Press, New York, pags.341-369.
- BOLLA, S. 1987.- Cytogenetic studies in Atlantic salmon and rainbow trout embryos. **Hereditas**, **106**:11-17.
- BURKHOLDER, G.D. y L.L. DUCZEK. 1982.- The effect of the chromosome banding techniques on the histone and nonhistone proteins of isolated chromatin. **Can. J. Biochem.**, **60**:328-337.
- BURKHOLDER, G.D. y M.G. WEAVER. 1977.- Differential accessibility of DNA in extended and condensed chromatin to pancreatic DNAase I. **Exp. Cell Res.**, **92**:518-522.
- BYE, V.J. y R.F. LINCOLN. 1986.- Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture**, **57**:299-309.
- CAPANNA, E.; S. CATAUDELLA y R. VOLPE. 1974.- Un íbrido intergenerico tra trota iridea e salmerino di fonte (*Salmo gairdneri* x *Salvelinus fontinalis*). **Boll. Pesca Piscic. Idrobiol.**, **29**:101-106.
- CHERFAS, N.B.; B.I. GOMELSKY; O.V. EMELJANOVA y A.V. REKOURBRAISKY. 1981.- Triploidy in reciprocal hybrids obtained from crucian carp and carp. **Genetika**, **17**:1136-1139.
- CHEVASSUS, B.; R. GUYOMARD; D. CHOURROUT y E. QUILLET. 1983.- Production of viable hybrids in salmonids by triploidization. **Génét. Sél. Evol.**, **15**: 519-532.
- CHEVASSUS, B.; E. QUILLET y D. CHOURROUT. 1984.- La production de truites stériles par voie génétique. **La pisciculture française**, **78**:10-19.

- CHOURROUT, D. 1980.- Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Reprod. Nutr. Dévelop.**, **20(3A):727-733.**
- , 1984.- Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. **Aquaculture**, **57:329-336.**
- , 1986.- La mejora genética de los peces. **Mundo Científico**, **63:1078-1088.**
- COLE, C.I. y LEAVENS, C.R. 1971.- Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. **Herpetol. Rev.**, **3: T 102.**
- COMINGS, D.E. 1972.- Evidence for ancient tetraploidy and conservation of linkage groups in mammalian chromosomes. **Nature**, **238:455-457.**
- CUELLAR, O. Y T.UYENO. 1972.- Triploidy in rainbow trout. **Cytogenetics**, **11:508-515.**
- DAREVSKY, I. S. y V. N. KULIKOVA. 1964.- Natural triploidy within a polymorphous form of Caucasian lizards, *Lacerta sexicola* (Eversmann) resulting from hybridization between bisexual and parthenogenetic subspecies of this species. **Dokl. Akad. Nank. SSSR** **158: 202-205**
- DAVISSON, M.T.; J.E.WRIGHT y L.M.ATHERTON. 1973.- Cytogenetic analysis of pseudolinkage of LDH loci in the teleost genus *Salvelinus*. **Genetics**, **73:645-658.**
- DERMEN, H. 1954.- Colchiploidy in grapes. **J.Heredity**, **45:159-172.**

- DINGERKUS,G. y W.M.HOWELL. 1976.- Karyotypic analysis and evidence of tetraploidy in the North American paddlefish *Polyodon spathula*. **Science**,**194:842-844**.
- DOBZHANSKY,T.; F.J.AYALA; G.L.STEBBINS y J.W.VALENTINE. 1977.- Evolution. W.H.Freeman, San Francisco.
- DOWNING,S.L. y S.K.ALLEN. 1987.- Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. **Aquaculture**,**61:1-15**.
- DUNHAM,R.A.; D.P.PHILIPP y G.S.WHITT. 1980.- Levels of duplicate gene expression in armoured catfishes. **J.Hered.**,**71:248-252**.
- ELINSON, R. P. y A. BRIEDIS, 1981.- Triploidy permits survival of an inviable amphibian hybrid. **Develop. Genet.**, **2: 357-367**.
- EMSWELLER,S.L. 1948.- Breeding of ornamental plants. **Proc.Amer.Hort.Sci.**,**51:565-574**.
- ENGEL,W.; J.SCHMIDTKE y U.WOLF. 1975.- Diploid-tetraploid relationship in teleostean fishes. En: Isozymes: IV.Genetics and Evolution. C.L.Markert (ed.), Academic Press, New York, pags.449-462.
- ETLINGER,H.M.; H.O.HODGINS y J.M.CHILLER. 1976.- Rainbow trout leukocyte culture: a simplified method. **In Vitro**,**12 (8):599-601**.
- EVANS,E.P.; M.D.BURTENSHAW y C.E.FORD. 1972.- Chromosomes of mouse embryos and new-born young:preparations from membranes and tail tips. **Stain Technol.**,**47:229-234**.
- FANKHAUSER G. y R. B. GRIFFITHS. 1983.- Induction of triploidy and haploidy in the newt *Triturus viridiscens* by cold treatment of unsegmented eggs **Proc.Nat. Acad. Sci.**, **25: 233-238**.
-

- FANKHAUSER, G.; R. GROTTA y M. PERROT. 1942. Spontaneous and cold induced triploidy in the Japanese newt, *Triturus viridiscens*. **J. Exp. Zool.**, **89:167-181.**
- FERNANDEZ-PIQUERAS, J. 1985.- Análisis de la heterocromatina constitutiva de Ortópteros con técnicas de fluorescencia. En: Orthoptera, vol. 1. J. Gosálvez, C. López-Fernández & C. García de la Vega (eds.), Madrid, pags. 193-226.
- FERRIS, S.D. 1984.- Tetraploidy and the Evolution of the Catostomid Fishes. En: Evolutionary Genetics of Fishes, B.J. Turner, ed. Plenum Press, New York and London, pags. 55-93.
- FERRIS, S.D. y G.S. WHITT. 1980.- Genetic variability in species with extensive gene duplication: the tetraploid catostomid fishes. **Am. Nat.**, **115:650-666.**
- FISHER, S.E.; J.B. SHAKLEE; S.D. FERRIS y G.S. WHITT. 1980.- Evolution of five multilocus isozyme systems in the chordates. **Genetica**, **52:73-85.**
- FLAVELL, R.B. 1986.- Oxford Surveys Plant. Plant Mol. Cell Biol., **3:252-274.**
- FORD, E.B. 1940. Polymorphism and taxonomy. En: New Systematics, J.S. Huxley (ed.), Clarendon Press, Oxford.
- FUKUOKA, H. 1972.- Chromosome-number variations in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii irideus* (Gibbons)). **Japan J. Genetics**, **47:455-458.**
- GERVAI, J.; S. PETER; A. NAGH; L. HORVATH y V. CSANNI. 1980.- Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio*. **J. Fish Biol.**, **17:667-671.**
- GIVENS, J.F. y R.L. PHILLIPS. 1976.- The nucleolus organizer regions of maize (*Zea mays* L.). Ribosomal RNA gene distribution and nucleolar interactions. **Chromosoma**, **57:103-117.**
- GIVENS, J.F. 1984a.- Chromosome relationships in the genus *Zea*. **Chromosoma**, **90:229-237.**

- GOLD, J.R. y J.C. AVISE. 1976.- Spontaneous triploidy in the California roach, *Hesperoleucus symmetricus* (Pisces: Cyprinidae). **Cytogenet. Cell Genet.**, **17:144-149.**
- GOLD, J.R. y G.A.E. GALL. 1975.- Chromosome cytology and polymorphism in California High Sierra golden trout (*Salmo aguabonita*). **Can. J. Genet. Cytol.**, **17:41-53.**
- GOLD, J.R.; W.J. KAREL y M.R. STRAND. 1980.- Chromosome formulae of North American fishes. **Proc. Fis. Cult.**, **42:10-23.**
- GOSALVEZ, J.; J.L. BELLA; C. LOPEZ-FERNANDEZ y R. MEZZANOTTE. 1987.- Correlation between constitutive heterochromatin and restriction enzyme resistant chromatin in *Arcyptera tornosi* (Orthoptera). **Heredity**, **59:173-180.**
- GRAMMELTVEDT, A.F. 1974.- A method of obtaining chromosome preparations from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by leucocyte culture. **Norw. J. Zool.**, **22:129-134.**
- 1975.- Chromosomes of salmon (*Salmo salar*) by leukocyte culture. **Aquaculture**, **5:205-209.**
- HANCOCK, J.M. y A.T. SUMNER. 1982.- The role of proteins in the production of different types of chromosome bands. **Cytobios**, **35:37-46.**
- HARTLEY, S.E. 1987.- The chromosomes of salmonid fishes. **Biol. Rev.**, **62:197-214.**
- HARTLEY, S.E. y M.T. HORNE. 1982.- Chromosome polymorphism in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Chromosoma**, **87:461-468.**
- 1983.- A method for obtaining mitotic figures from blood leucocyte cultures of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **J. Fish Biol.**, **22:77-82.**
- 1984a.- Chromosome relationships in the genus *Salmo*. **Chromosoma**, **90:229-237.**

- 1984b.- Chromosome polymorphism and constitutive heterochromatin in Atlantic salmon *Salmo salar*. **Chromosoma**, **89:377-380**.
- 1985.- Cytogenetic techniques in fish genetics. **J.Fish Biol.**, **26:575-582**.
- HECKMAN, J.R.; F.W. ALLENDORF y J.E. WRIGHT. 1971.- Trout leukocyte: growth in oxygenated cultures. **Science**, **173:246-247**
- HOLMQUIST, G. 1979.- The mechanism of C-banding: depurination and B-elimination. **Chromosoma**, **72:203-224**.
- 1987.- DNA sequences in G-bands and R-bands. En: Chromosome chromatin structure. K.W. Adolph, ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- HOWELL, W.M. y D.A. BLACK. 1980.- Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, **36:1014-1015**.
- HSU, T.C. y J.L. PATTON. 1969.- Bone marrow preparations for chromosome studies. In: Comparative Mammalian Cytogenetics, pp.454-460. K. Benirschke (ed), Springer-Verlag, Heidelberg, New York.
- HUMASON, G.L. 1972.- Animal tissue techniques, 3rd edition. W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA, 641 pags.
- JIMENEZ, R.; M. BURGOS y R. DIAZ DE LA GUARDIA. 1988.- A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. **Heredity**, **60:125-127**.
- JOHNSON, O. W.; W.W. DICKHOFF y F. M. UTTER. 1986. Comparative growth and development of diploid and triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, **57: 329-336**.
- JOHNSTONE, R. 1985.- Induction of triploidy in Atlantic salmon by heat shock. **Aquaculture**, **49:133-139**.

- JOHNSTONE,R. y R.F.LINCOLN. 1986.- Ploidy stimation using erythrocytes from formalin-fixed salmonid fry. **Aquaculture**,**55:145-148**.
- JOHNSTONE,R.; T.H.SIMPSON y A.F.YOUNGSON. 1978.- Sex reversal in salmonid culture. **Aquaculture**,**13:115-134**.
- KAJDANOVA,T.L. 1974.- A study of chromosomal polymorphism in the population of rainbow (*Salmo irideus* G.) and brown (*Salmo trutta m fario*) trouts. **Izvestiya Gosniorkh**,**97:155-158**.
- KIHARA,H. 1951.- Triploid watermelons. **Proc.Amer.Soc.Hort. Sci**,**58:217-230**.
- KLIGERMAN,A.D. y S.E.BLOOM. 1977.- Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. **J.Fish. Res. Board Can.**,**34:266-269**.
- KOBAYASI,H. 1976.- Comparative study of karyotypes in the small and large races of spinous loaches (*Cobitis biwae*). **Zool.Mag.**,**85:84-87**.
- KOMARU, A.; Y. UCHIMURA.; H. IEYAMA y K. T. WADA. 1988.- Detection of induced triploid scallog *Chlamys nobilis*, by DNA microfluorometry with DAPI staining. **Aquaculture**,**69:201-209**.
- LEARY,R.F. ;F.W.ALLENDORF; K.L.KNUDSEN y G.H.THORGAARD. 1985.- Heterozygosity and developmental stability in gynogenetic diploid and triploid rainbow trout. **Heredity**,**54:219-225**.
- LEE,G.M. y J.E.WRIGHT Jr. 1981.- Mitotic and meiotic analyses of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **J.Hered.**,**72:321-327**.
- LEE,M.R. y F.F.B.ELDER. 1980.- Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogenet.Cell Genet.**,**26:36-40**.
- LEMOINE,H.L. y L.T.SMITH. 1980.- Polyploidy induce in brook trout by cold shock. **Trans Am.Fish.Soc.**,**109:626-631**.

- LEVAN, A.; K. FREDGA y A. A. SANDBERG. 1964.- Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, **52:201-220**.
- LINCOLN, R. F. 1981a.- Sexual maturation in triploid male plaice (*Pleuronectes platessa*) and plaice x flounder (*Platichthys flesus*) hybrids. **J. Fish. Biol.**, **19:415-426**.
- 1981b. Sexual maturation in female triploid plaice *Pleuronectes platessa*, and plaice x flounder *Platichthys flesus*, hybrids. **J. Fish. Biol.**, **19:499-507**.
- LINCOLN, R. F. y V. BYE. 1984a.- Triploid rainbows show commercial potential. **Fish Farmer**, **7(5):30-32**.
- . 1984b.- The growth and survival of triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in sea water over the spawning period. Int. Counc. Explor. Sea. Coop. Res. Rep., C.M. 1986/F:6.
- LINCOLN, R. F. y P. A. SCOTT. 1983.- Production of all-female triploid rainbow trout. **Aquaculture**, **30:375-380**.
- LINCOLN, R. F. y P. A. SCOTT. 1984.- Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **J. Fish. Biol.**, **25:385-392**.
- LINCOLN, R. F.; D. AULSTAD y A. GRAMMELTVEDT. 1974.- Attempted triploid induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using cold shocks. **Aquaculture**, **4:237-297**.
- LIU, S.; D. SEZAKI; K. HASHIMOTO; H. KOBAYASI y N. NAKAMURA. 1978.- Simplified techniques for determination of polyploidy in gimbuna *Carassius auratus langsdorfi*. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.**, **44:601-606**.
- LOPEZ-FERNANDEZ, C.; J. GOSALVEZ y R. MEZZANOTTE. 1989.- Heterochromatin heterogeneity in *Oedipoda germanica* (Orthoptera) detected by *in situ* digestion with restriction endonucleases. **Heredity**, **62:269-277**.

- LOZANO,R.; M.JAMILENA; C.RUIZ REJON y M.RUIZ REJON. 1989.- Characterization of the chromatin of some liliaceous species after digestion with restriction endonucleases and sequential Giemsa, fluorochrome and silver staining. **Heredity (en prensa)**.
- LLOYD,M.A. y G.H.THORGAARD. 1988.- Restriction endonuclease banding of rainbow trout chromosomes. **Chromosoma**,**96:171-177**.
- MAGEE,S.M. y D.P.PHILIPP. 1982.- Biochemical genetic analyses of the grass carp x bighead carp F1 hybrid and the parental species. **Trans.Am.Fish Soc.**,**111:593-602**.
- MARIAN,T. y Z.KRAZSNAI. 1978.- Karyological investigation on *Ctenopharngodon idella* and *Hypophthalmichthys nobilis* and their cross-breeding. **Aquacult.Hung.**,**1:44-50**.
- MAY,B.; M.STONEKING y J.E.WRIGHT. 1980.- Joint segregation of biochemical loci in Salmonidae. II.Linkage associations from a hybridized *Salvelinus* genome (*Salvelinus namaycush* x *S.fontinalis*). **Genetics**,**95:707-726**.
- MAY,B.; J.E.WRIGHT y M.STONEKING. 1979.- Joint segregation of biochemical loci in Salmonidae: results from experiments with *Salvelinus* and review of the literature and other species. **J.Fish.Res.Board.Can.**,**36:1114-1128**.
- MAY,B.; J.E.WRIGHT y K.R.JOHNSON. 1982.- Joint segregation o biochemical loci in Salmonidae. III.Linkage associations in Salmonidae including data from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Biochem.Gene.**,**20:29-39**.
- MAYR,B.; M.KALAT y P.RAB. 1988.- Heterochromatins and band karyotypes in three species of salmonids. **Theor.Appl. Genet.**, **76:45-53**.
- MAYR,B.; P.RAB y M.KALAT. 1986.- Localisation of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Salmo gairdneri* and *Salmo trutta* (Pisces,Salmonidae). **Theor. Appl.Genet.**,**71:703-707**.

- MELANDER, Y. y E. MONTEN. 1950.- Probable parthenogenesis in *Coregonus*. **Hereditas**, **36**:105-106.
- MEREDITH, R. 1969.- A simple method for preparing meiotic chromosomes from mammalian testis. **Chromosoma**, **26**:254-258.
- MEZZANOTTE, R. 1986.- The selective digestion of polytene and mitotic chromosome of *Drosophila melanogaster* by the Alu I and Hae III restriction endonucleases. **Chromosoma**, **93**: 249-255.
- MEZZANOTTE, R. y L. FERRUCCI. 1984.- Alterations induced in mouse chromosomes by restriction endonucleases. **Genetica**, **64**:123-128.
- MEZZANOTTE, R.; V. BIANCHI; R. VANNI y L. FERRUCCI. 1983.- Chromatin organization and restriction endonuclease activity on human metaphase chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.**, **36**: 562-566.
- MEZZANOTTE, R.; L. FERRUCCI; R. VANNI y A. T. SUMNER. 1985.- The banding pattern produced by restriction endonucleases in mouse chromosomes. **Basic Appl. Histochem.**, **29**:115-120.
- MILLER, D. A.; Y. CHOI y O. J. MILLER. 1983.- Chromosome localization of highly repetitive human DNA's and amplified ribosomal DNA with restriction enzymes. **Science**, **219**:395-397.
- MONG, S. J. ; M. D. SNYDER; N. S. FECHLIEIMER y R. G. JAAP. 1974. The origin of triploidy in chick (*Gallus domesticus*) embryos. **Can J. Genet. Cytol.**, **16**:311-322.
- MORELLI, S.; L. A. C. BERTOLLO y O. MOREIRA Fº. 1983.- Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). II. Occurrence of natural triploidy. **Caryologia**, **3**:245-250.
- MULLER, H. J. 1925.- Why polyploidy is rarer in animals than in plants. **Am. Nat.**, **59**:345-353.

- MÜNTZING,A. 1951.- Cyto-genetic properties and practical value of tetraploid rye. **Hereditas**,**37:17-84**.
- MURAMOTO,J.E.; S.OHNO y N.B.ATKIN. 1968.- On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma** **24:59-66**.
- NIEBUHR,E. 1974.- Triploidy in man: Cytogenetical and clinical aspects. **Human-genetik**,**21:103-125**.
- NORDEN,C.R. 1961.- Comparative osteology of representative salmonid fishes with particular reference to the grayling (*Thymallus arcticus*) and its phylogeny. **J.Fis.Res.Board Can.**,**18:679-753**.
- OHNO,S. 1967.- Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer, Heidelberg.
- 1970a.- Evolution by gene duplication. Springer Verlag, New York.
- 1970b. The enormous diversity in genome sizes of fishes as a reflection of nature's extensive experiments with gene duplication. **Trans.Am.Fish.Soc.**,**99:120-130**.
- 1974.- Protochordata, Cyclostomata and Pisces. En: Animal Cytogenetics, vol.4. Chordata I. B.John, H.Bauer,S.Brown,H.Kayano,A.Levan & M.White (eds.). Gebruder-Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- OHNO,S.; J.MURAMOTO; L.CHRISTIAN y N.B.ATKIN. 1967.- Diploid-tetraploid relationship among old world members of the fish family Cyprinidae. **Chromosoma**,**23:1-9**.
- OHNO,S.; J.MURAMOTO; C.STENIUS; L.CHRISTIAN; W.A.KITTRELL y N.B.ATKIN. 1969a.- Microchromosomes in holocephalian, chondrosteian and holosteian fishes. **Chromosoma**,**26:35-40**.
- OHNO,S.; J.MURAMOTO; J.KLEIN y N.B.ATKIN. 1969b. Diploid-tetraploid relationship in clupeoid and salmonid fish. En: Chromosomes Today, vol.2. C.D.Darlington & K.R.Lewis (Eds.). Edinburgh, pages.139-147.

- OHNO,S.;C.STENIUS;E.FAISST y M.T.ZENZES. 1965.- Post-zygotic chromosomal rearrangements in rainbow trout (*Salmo irideus* Gibbons). **Cytogenetics**,4:117-129.
- OHNO,S.; U.WOLF y N.B.ATKIN. 1968.- Evolution from fish to mammals by gene duplication. **Hereditas**,59:169-187.
- OLMO,H.P. 1952. Breeding tetraploid grapes. **Proc.Amer.Soc. Hort.Sci.**,59:285-290.
- OLOFSSON,B. y G.BERNARDI. 1983.- Organization of nucleotide sequences in the chicken genome. **Eur.J.Biochem.**,130:241-245.
- OLSSON,G. 1963.- Induce polyploids in *Brassica*. En: Recent Plant Breeding Research Svalöf 1946-1961. E.Akerberg & H.Hagberg,eds. Wiley & Sons,London, pags.179-192.
- PATHAK,S. 1980.- Cytogenetic analysis in human breast tumors. **Canc.Genet.Cytogenet.**,1:281-289.
- PHILLIPS,R.B. y P.E.IHSSEN. 1985a.- Identification of sex chromosomes in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Cytogenet.Cell Genet.**,39:14-18.
- 1985b.- Chromosome banding in salmonid fish: nucleolar organizer regions in *Salmo* and *Salvelinus*. **Can.J.Genet.Cytol.**,27:433-440.
- PHILLIPS,R.B. y KAPUSCINKSI. 1987.- A Robertsonian polymorphism in pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) involving the nucleolar organizer region. **Cytogenet. Cell Genet.**,44:148-152.
- PHILLIPS,R.B.;K.D.ZAJICEK y F.M.UTTER. 1986a.- Chromosome banding in salmonid fishes: nucleolar organizer regions in *Oncorhynchus*. **Can.J.Genet.Cytol.**,28:502-510.

- PHILLIPS,R.B.;K.D.ZAJICEK;P.E.IHSEN y O.JOHNSON. 1986b.- Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. **Aquaculture**,**54:313-319**.
- PHILLIPS,R.B.; K.A.PLEYTE y S.E.HARTLEY. 1988.- Stock specific differences in the number and chromosome positions of the nucleolar organizer regions in arctic char (*Salvelinus alpinus*).**Cytogenet.Cell Genet.**,**48:9-12**.
- PURDOM,C.E. 1972.- Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). **Heredity**,**29:11-24**.
- PURDOM,C.E. 1983.- Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. **Aquaculture**,**33:287-300**.
- PURDOM,C.E.y R.F.LINCOLN. 1973.- Chromosome manipulations in fish. En: Genetics and Mutagenesis of Fish. J.H.Schroder,ed. Springer-Verlag, Berlin, New York, pags.83-89.
- QUILLET,E. y P.J.PANELAY. 1986.- Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. **Aquaculture**,**57:271-279**.
- RAICU,P. y E.TAISESCU. 1972.- *Misgurnus fossilis*, a tetraploid fish species. **J.Hered.**,**63:92-94**.
- REES,H. 1964.- The question of polyploidy in the Salmonidae. **Chromosoma** **15:275-279**.
- REFSTIE,T. 1981.- Tetraploid rainbow trout produced by cytochalasin B. **Aquaculture**, **25:51-58**.
- 1983.- Induction of diploid gynogenesis in Atlantic salmon and rainbow trout using irradiated sperm and heat shock. **Can.J.Zool.**,**61:2411-2416**.
- REFSTIE,T. V.VASSVIK y T.GJEDREM. 1977.- Induction of polyploidy in salmonids by cytochalasin B. **Aquaculture**,**10:65-74**.

- RILEY, R. y G. KIMBER. 1966.- The transfer of alien genetic variation to wheat. **Rept. Pl. Breed. Inst.: 1964-65: 6-36.**
- ROBERTS, F. L. 1968.- Chromosomal polymorphism in North American landlocked *Salmo salar*. **Can. J. Genet. Cytol., 10: 865-875.**
- 1970.- Atlantic salmon (*Salmo salar*) chromosomes and speciation. **Trans. Am. Fish. Soc., 99: 105-111.**
- SALINAS, J.; G. MATESSI; L. M. MONTERO y G. BERNARDI. 1988.- Compositional compartmentalization and compositional patterns in the nuclear genomes of plants. **Nucl. Acid Res., 16(10): 4269-4285.**
- SCHEERER, P. D. y G. H. THORGAARD. 1983.- Increased survival in salmonid hybrids by induced triploidy. **Can. J. Fish. Aquat. Sci., 40: 2040-2044.**
- SCHMID, M. y C. G. DE ALMEIDA. 1988.- Chromosome banding in Amphibia. XII. Restriction endonuclease banding. **Chromosoma, 96: 283-290.**
- SCHMID, M.; C. LOSER; J. SCHMIDTKE y W. ENGEL. 1982.- Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. **Chromosoma, 86: 149-179.**
- SCHUBERT, I. 1984.- Mobile nucleolus organizing regions (NORs) in *Allium* (Liliaceae s. lat). Interferences from the specificity of silver staining. **Pl. Syst. Evol., 144: 291-305.**
- SCHULTZ, R. J. 1969.- Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. **Am. Nat., 108: 605-619.**
- 1980.- Role of polyploidy in the evolution of fishes. En: **Polyploidy: Biological Relevance**. W. H. Lewis, ed. Plenum Press, New York, pags. 313-340.
- SCHWARZACHER, T.; P. AMBROS y D. SCHWEIZER. 1980.- Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. **Pl. Syst. Evol., 134: 293-297.**

- SCHWEIZER,D. 1976.- Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**,**58:307-324**.
- 1979.- Fluorescent chromosome banding in plants: applications, mechanisms and implications for chromosome structure. In: Davies,D.R. and HOPWOOD,R.A. (eds.): Proc. 4th John Innes Symposium, Norwich, 1979: The Plant Genome, pp.61-72, Norwich: John Innes Charity.
- 1980.- Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.**,**27: 190-193**.
- 1983.- En: Kew Chromosome Conference II. M.D.Bennett & P.Brandham, eds. London, Allen & Unwin, pgs.43-57.
- SEZAKI,K. y H.KOBAYASI. 1978.- Comparison of erythrocyte size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwae*. **Bull.Jpn.Soc.Sci.Fish.**,**44:851-854**.
- SMITH,L.T. y H.L.LEMOINE. 1979.- Colchicine-induced polyploidy in brook trout. **Progressive Fish-Culturist**, **41:86-88**.
- SILVAN,A. 1966.- Primeras variedades poliploides de remolacha azucarera obtenidas en España. **Génet.Ibér.**,**17:177-200**.
- SOLA,L.; S.CATAUDELLA y E.CAPANNA. 1981.- New developments in vertebrate cytotaxonomy III. Caryology of bony fishes. A review. **Genetica**,**54:285-328**.
- SOLAR,I.I.; E.M.DONALDSON y G.A.HUNTER.1984.- Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigation of early growth. **Aquaculture**, **42:57-67**.

- SOLAR, I.I. y E.M.DONALDSON. 1985.- Studies on genetic and hormonal sex control in domesticated rainbow trout. I. The effect of heat shock treatment for induction of triploidy in cultured rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Can.Tech.Rep.Fish.Aq.Sci. No.1379.**
- SOLAR, I.I.; E.M.DONALDSON y G.A.HUNTER. 1984.- Optimization of treatment regimes for controlled sex differentiation and sterilization in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by oral administration of 17-alfa-methyltestosterone. **Aquaculture, 42:129-139.**
- STANLEY, J.G. 1983.- Gene expression in haploid embryos of Atlantic salmon. **J.Hered., 74:19-22.**
- STANLEY, J.G.; S.K.ALLEN y H.HIDU. 1981.- Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. **Aquaculture, 23:1-10.**
- . 1984.- Growth of American oyster increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. **Aquaculture, 37:147-155.**
- STEBBINS, G.L. 1977.- Process of Organic Evolution, 3rd. ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- STEVENSON, E.C. 1958.- Seedless watermelons. **Amer.Vegetable Grower, 6:11.**
- STOCK, A.D.; D.B.BURNHAM y T.C.HSU. 1972.- Giemsa banding from meiotic chromosomes with description of a procedure for cytological preparations from solid tissues. **Cytogenetics, 11: 534-539.**
- STURTEVANT, A.H. y G.W.BEADLE. 1936.- The relations of inversion in the X-chromosome of *Drosophila melanogaster* to crossing over and disjunction. **Genetics, 21:554-604.**
- SUMNER, A.T. 1972.- A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exptl. Cell Res., 75:304-306.**

- SVARDSON,G. 1945.- Chromosome studies of Salmonidae. **Rep.Swed.State Inst.Fresh-Water Fish.Res.,23:1-151.**
- SWARUP,H. 1959.- Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L.). **J.Genet.,56:143-155.**
- TABARINI,C.L. 1984.- Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. **Aquaculture,42:157-160.**
- TANTITHAKURA,O.; W.FOERSTER; A.ANDERS y F.ANDERS. 1989.- High resolution G-banded chromosomes of fish. 10th International Chromosome Conference,Abstracts, pag.60.
- THOMPSON,W.F. y R.B.FLAVELL. 1988.- DNase sensitivity of ribosomal RNA genes in chromatin and nucleolar dominance in wheat. **J.Mol.Biol.,204:535-548.**
- THORGAARD,G.H. 1976.- Robertsonian polymorphism and constitutive heterochromatin distribution in chromosomes of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Cytogenet. Cell Genet., 17:174-184.**
- 1977.- Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. **Science,196:900-902.**
- 1983a.- Chromosomal differences among rainbow trout populations. **Copeia,3:650-662.**
- 1983b.- Chromosome set manipulation and sex control in fish. En: Fish Physiology,vol.IX, W.S.Hoar, D.J.Randal y E.M.Donaldson (eds.), pags.405-434.
- 1986.- Ploidy manipulation and performance. **Aquaculture,57:57-64.**
- THORGAARD,G.H. y G.A.E.GALL. 1979.- Adult triploids in rainbow trout family. **Genetics,93:961-973.**

- THORGAARD,G.H.; M.E.JAZWIN y A.R.STIER. 1981.- Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. **Trans. Am. Fish. Soc.**, **110:546-550.**
- THORGAARD,G.H.; P.S.RABINOVITCH; M.W.SHEN; G.A.E.GALL; J.PROPP y F.M.UTTER. 1982.- Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. **Aquaculture**,**29:305-309.**
- TOMPKINS,R. 1978.- Triploid and gynogenetic diploid *Xenopus laevis*. **J.Exp.Zool.**,**203:251-256.**
- UEDA,T.y Y.OJIMA. 1984a.- Sex chromosomes in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. **Bull.Japan.Soc.Sci.Fish.**,**50:1499-1504.**
- 1984b.- Cytogenetical characteristics of the progeny from the heteroploidy in the rainbow trout. **Proc.Japan Acad.**,**60B:183-186.**
- UEDA,T.; M.KOBAYASHI y R.SATO. 1986.- Triploid rainbow trouts induced by polyethylene glycol. **Proc. Japan Acad.**,**62(B): 161-164.**
- UEDA,T. 1983.- Cytogenetical characters of 4 species in the salmonid fishes. **Bulletin of the Faculty of Education, Utsunomiya University**, **34:53-61 (en japonés).**
- UEDA,T.; Y.OJIMA; T.KATO y Y.FUKUDA. 1983.- Chromosomal polymorphisms in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Proc.Japan Acad.**,**59B:168-171.**
- UTTER,F.M.; O.J.JOHNSON; G.H.THORGAARD y P.S.RABINOVITCH. 1983.- Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. **Aquaculture**,**35:125-135.**
- UYENO,T. 1972. Chromosomes of offspring resulting from crossing coho salmon and brook trout. **Jpn.J.Ichthyol.**,**19:166-171.**
- UYENO,T y G.R.SMITH. 1972.- Tetraploid origin of the karyotype of catostomid fishes. **Science** **175:644-646.**

- VALENTI, R.J. 1975.- Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. **J.Fish Biol.**, **7:519-528.**
- VASIL'EV, V.B. 1975.- Karyotypes of different forms of Kamchatka trout *Salmo mykiss* Walbaum and steelhead *Salmo gairdneri* Richardson. **Voprosy Ikhtiologii**, **15:889-900.**
- VASILEV, V.P.; A.P. MAKEEVA y I.N. RYABOV. 1975.- Triploidy of hybrids of carp with other representatives of the family Cyprinidae. **Genetika**, **11:49-56.**
- VENERE, P.C. y P.M. GALETTI Jr. 1985.- Natural triploidy and chromosome B in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). **Rev. Brasil. Genet.**, **VIII, 4:681-687.**
- VERVOORT, A. 1980.- Tetraploidy in *Protopterus* (Dipnoi). **Experientia**, **36:294-295.**
- VILLEE, C.A.; W.F. WALKER, Jr. y R.D. BARNES. 1987.- Zoología, 6ª edición. Ed. Interamericana. México, D.F. 1987.
- WATTERDOF, R.J. y R.S. ANDERSON. 1986.- *Hydrilla* consumption by triploid grass carp in aquaria. **Proc. Annu. Conf. Southeast Assoc. Fish. Wildlife Agencies.** En prensa.
- WHITE, M.J.D. 1973.- Animal Cytology and Evolution. Cambridge University Press, London.
- 1978.- Modes of Speciation. W.H. Freeman, San Francisco.
- WOLF, U.; W. ENGEL y J. FAUST. 1970.- The mechanism of diploidization in vertebrate evolution: coexistence of tetrasomic and disomic gene loci for the isocitrate dehydrogenases in trout (*Salmo irideus*). **Humangenetik**, **9:150-156.**
- WOLTERS, W.R.; C.L. CHRISMAN y G.S. LIBEY. 1981.- Lymphocyte culture for chromosomal analyses of channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Copeia**, **503-504.**

WOLTERS,W.R.; G.S.LIBEY y C.L.CHRISMAN. 1982.- Effect of triploidy on growth and gonad development of channel catfish. **Trans.Am.Fish.Soc.**,111:102-105.

WRIGHT,J.E.; B.MAY; M.STONEKING y G.M.LEE. 1980.- Pseudolinkage of the duplicate loci for supernatant aspartate aminotransferase in brook trout, *Salvelinus fontinalis*. **J.Hered.**,71:223-228.

WRIGHT,J.E.; K.JOHNSON; A.HOLLISTER y B.MAY. 1983.- Meiotic models to explain classical linkage, pseudolinkage and chromosome pairing in tetraploid derivative salmonids. En: Isozymes:Current Topics in Biological and Medical Research, vol.10. C.Rattazzi, J.G.Scandalios y G.S.Whitt (eds.), Alan R.Liss, New York, pags.239-260.

ZENZES,M.T. y I.VOICULESCU. 1975.- C-Banding patterns in *Salmo trutta*, a species of tetraploid origin. **Genetica**, 45:531-536.

Tabla 1

Relación de las experiencias de inducción
 que se han desarrollado en el presente trabajo

TITULARIDAD	AS. POLY	HR	CI	FECHA DE REALIZACION	PROG
		78	11	Agosto-86	Di
		78	11	Febrero-87	Di
		70	11	Noviembre-87	

Tabla I

Datos relativos a las experiencias de inducción de triploidías descritas en el presente trabajo

EXPERIENCIA	ESPECIE	Nº DE PROGENITORES		FECHA DE REALIZACION	PROCEDENCIA PROGENITORES
		♀	♂		
Benamahoma	Trucha	38	19	Agosto-86	Dinamarca
Orol-1	Trucha	27	27	Febrero-87	Dinamarca
Orol-2	Salmón	70	45	Noviembre-87	EE.UU

Tabla II

Combinaciones de filtros de fluorescencia presentes en el microscopio Zeiss Universal utilizado en la presente memoria

Excitación	Filtro excitador	Divisor cromático	Filtro supresor	Fluorocromo excitable
Ultravioleta	365 nm	FT 395	LP 420	DAPI
Azul-violeta	405 nm	FT 460	LP 495	CMA ₃
Azul-violeta	436 nm	FT 510	LP 520	CMA ₃
Verde	546 nm	FT 580	LP 590	Otros

Tabla III

Enzimas de restricción ensayadas, concentraciones empleadas, dianas que reconocen y respuesta al bandeo cromosómico de cada una de ellas en las dos especies analizadas (S.G = Salmo gairdneri, O.K = Oncorhynchus kisutch)

Endonucleasa	Concentración (unidades/ul)	Diana 5'--3'	Bandeo	
			S.G	O.K
Alu I	0.5	AG/CT	+	+
Hinf I	1	G/ANTC	+	+
Hae III	1	GG/CC	+	+
Mbo I	1	/GATC	+	+
Dra I	0.5	TTT/CCC	+	+
Rsa I	1	GT/AC	+	+
Pvu II	1	CAG/CTG	+	+
Bgl II	0.1-3	A/GATCT	-	-
Hind III	0.1-2	A/AGCTT	-	-

Tabla IV

Resultados de la experiencia de inducción triploidía en la trucha arco-iris (Salmo gairdneri Richardson) llevada a cabo en la Piscifactoría de Benamahoma (Cádiz)

EXP.	CONDICIONES			No. INICIAL DE HUEVOS	SUPERVIVENCIA %				% DE TRIPLOIDES (N)
	T	D	t		230-250ºdía	S	430-460ºdía	S	
A	Control			409.2 ± 5.3	89.1 ± 5.3	---	79.1 ± 3.9	---	0.0 ± 0.0 (37)
	24	10	10	507.3 ± 6.6	86.1 ± 5.5	n.s	75.0 ± 4.2	n.s	7.2 ± 1.2 (42)
	26	10	10	511.3 ± 6.7	78.3 ± 3.9	**	69.3 ± 1.9	***	61.5 ± 5.7 (40)
	28	10	10	500.4 ± 5.8	53.1 ± 2.9	***	35.5 ± 3.3	***	94.4 ± 3.0 (43)
	30	10	10	563.6 ± 7.7	10.9 ± 8.7	***	3.2 ± 2.2	***	92.5 ± 4.4 (38)
B	Control			416.6 ± 3.5	88.2 ± 3.3	---	75.1 ± 2.7	---	0.0 ± 0.0 (31)
	26	5	10	542.1 ± 5.4	86.9 ± 2.7	n.s	73.8 ± 2.6	n.s	47.2 ± 8.5 (34)
	26	10	10	527.6 ± 8.8	81.3 ± 2.1	**	69.8 ± 2.5	**	67.6 ± 6.4 (42)
	26	20	10	509.3 ± 7.4	74.2 ± 3.0	***	61.8 ± 3.3	***	94.3 ± 5.0 (45)
	26	40	10	487.6 ± 9.1	15.0 ± 4.3	***	4.4 ± 2.6	***	97.3 ± 9.1 (17)
C	Control			441.3 ± 10.7	90.1 ± 2.3	---	75.7 ± 2.4	---	0.0 ± 0.0 (22)
	28	5	10	486.9 ± 8.6	62.6 ± 5.3	***	57.6 ± 5.1	***	43.2 ± 2.9 (36)
	28	10	10	453.4 ± 6.3	47.7 ± 3.3	***	32.9 ± 3.8	***	88.3 ± 6.0 (30)
	28	20	10	497.9 ± 8.1	12.3 ± 4.1	***	4.7 ± 1.9	***	96.9 ± 3.0 (44)
	28	40	10	524.7 ± 12.5	3.7 ± 3.5	***	0.0 ± 0.0	***	90.1 ± 5.5 (25)
D	Control			407.2 ± 9.7	85.8 ± 2.2	---	72.3 ± 3.7	---	0.0 ± 0.0 (31)
	26	10	5	444.8 ± 7.9	76.6 ± 2.7	**	64.6 ± 2.2	***	51.7 ± 6.4 (31)
	26	10	15	436.8 ± 11.3	74.7 ± 1.7	**	63.5 ± 2.6	***	60.8 ± 5.7 (31)
	26	10	30	461.1 ± 8.3	66.5 ± 3.5	***	40.4 ± 6.2	***	66.6 ± 2.7 (31)
	26	10	45	530.3 ± 5.5	74.1 ± 2.5	**	66.1 ± 6.2	**	26.7 ± 4.9 (31)
E	Control			392.8 ± 15.5	85.6 ± 3.7	---	70.8 ± 1.8	---	0.0 ± 0.0 (23)
	28	10	5	432.1 ± 10.9	53.4 ± 5.6	***	34.5 ± 4.2	***	90.5 ± 6.8 (40)
	28	10	15	466.5 ± 8.2	44.5 ± 3.3	***	37.6 ± 1.5	***	94.3 ± 7.3 (45)
	28	10	30	456.6 ± 10.1	44.8 ± 3.3	***	31.4 ± 9.1	***	99.3 ± 5.4 (45)
	28	10	45	401.3 ± 7.6	49.5 ± 4.9	***	36.7 ± 4.2	***	23.8 ± 5.9 (27)

T = Temperatura del choque térmico (°C)

D = Duración del choque térmico (minutos)

t = Tiempo de incubación (minutos)

N = Nº de individuos en los que se determinó el nivel de ploidía

n.s = no significativo

** 0.001 < P < 0.01

*** P < 0.001

Tabla VI

Tabla V

Resultados de la experiencia de inducción de triploidía en la trucha arco-iris (Salmo gairdneri Richardson) llevada a cabo en la Piscifactoría de Orol (Lugo)

NIVEL . TERMICO	No. INICIAL DE HUEVOS	SUPERVIVENCIA (%)				% de TRIPLOIDES		N
		230-250ºdía	S	430-460ºdía	S			
Control	934.7 ± 48.8	87.7 ± 3.6	---	82.1 ± 3.5	---	0.0 ± 0.0	23	
26°C	1165.8 ± 40.7	74.1 ± 3.9	**	71.0 ± 4.0	**	59.7 ± 1.4	36	
28°C	1185.4 ± 61.8	58.2 ± 4.3	***	54.6 ± 4.1	***	96.1 ± 0.7	32	
30°C	791.4 ± 54.3	26.8 ± 1.6	***	20.9 ± 1.5	***	100.0 ± 0.0	30	

N = Nº de individuos en los que se determinó el nivel de ploidía

** 0.01 > P > 0.001

*** P < 0.001

Tabla VI

Resultados comparativos de crecimiento (peso en gr. y factor de condición, K), y desarrollo gonadal (índice gónado-somático, GSI) referidos a la población de trucha arco-iris de Benamahoma (Cádiz)

MES	PESO 2n	PESO 3n	K 2n	K 3n	GSI 2n	GSI 3n
Ago.86	FERTILIZACION					
Oct.86	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	-----	-----	-----	
Dic.86	5.9 ± 1.2	5.7 ± 1.9	1.29 ± 0.07	1.28 ± 0.09		
Feb.87	21.0 ± 2.7	19.7 ± 3.9				
Abr.87	49.7 ± 7.2	46.4 ± 10.3	1.36 ± 0.12	1.31 ± 0.14		
Jun.87	108.2 ± 9.1	103.5 ± 12.6	1.43 ± 0.23	1.36 ± 0.24	} <u>1ª MADUREZ</u> <u>SEXUAL</u>	
Ago.87	186.1 ± 11.5	190.4 ± 13.2	1.40 ± 0.15	1.30 ± 0.19		
Oct.87	259.9 ± 13.4	263.8 ± 11.2	1.37 ± 0.29	1.40 ± 0.22		
Dic.87	398.0 ± 17.3	436.6 ± 19.6	1.31 ± 0.14	1.27 ± 0.23		
Feb.88	M 604.1 ± 15.9 H 713.2 ± 19.3	679.1 ± 14.5 ** 772.1 ± 21.6 *				
May.88	M 866.3 ± 24.8 H 900.8 ± 37.3	908.7 ± 38.5 986.4 ± 31.3	1.29 ± 0.04 1.34 ± 0.04	1.35 ± 0.05 1.42 ± 0.06	3.6 ± 0.7 18.7 ± 0.9	1.38 ± 0.07 0.21 ± 0.01
Jun.88	M 1009.2 ± 40.6 H 1175.9 ± 37.8	----- 1339.8 ± 47.2 **	1.27 ± 0.16 1.27 ± 0.12	----- 1.38 ± 0.07	} <u>2ª MADUREZ</u> <u>SEXUAL</u>	
Ago.88	M 1049.3 ± 42.1 H 1407.3 ± 46.5	1120.9 ± 44.7 1581.2 ± 50.6 *	1.24 ± 0.10 1.29 ± 0.05	1.29 ± 0.10 1.33 ± 0.12		
Oct.88	M 1087.2 ± 47.4 H 1641.7 ± 50.4	1244.8 ± 40.2 * 1796.5 ± 51.5 *	1.28 ± 0.11 1.30 ± 0.09	1.31 ± 0.11 1.35 ± 0.20		
Dic.88	M 1360.0 ± 51.6 H 2042.5 ± 57.6	1572.1 ± 54.6 ** 2426.9 ± 67.8 ***	1.27 ± 0.24 1.30 ± 0.10	1.40 ± 0.19 1.39 ± 0.23		
Feb.89	M 1865.8 ± 52.1 H 2488.6 ± 63.9	2026.0 ± 60.3 * 2827.1 ± 68.5 ***	1.30 ± 0.17 1.31 ± 0.07	1.38 ± 0.12 1.40 ± 0.16	2.9 ± 0.6 14.3 ± 0.4	0.82 ± 0.03 0.10 ± 0.03
Abr.89	M 2124.4 ± 58.9 H 2807.5 ± 73.1	2613.3 ± 77.2 *** 3274.6 ± 94.3 ***	1.29 ± 0.21 1.36 ± 0.18	1.27 ± 0.26 1.37 ± 0.33		

M = Machos

H = Hembras

N > 30 en todos los casos

Tabla VII

Resultados comparativos de la evolución seguida durante un periodo de crecimiento de 26 meses por dos lotes de trucha arco-iris en la población de Orol (Lugo)

MES.AÑO	CONTROL	N	TRIPLOIDES	N
Febrero 87	FECUNDACION			
Abril 87	0.26	11.000	0.25	15.800
Mayo 87	0.75	11.000	0.84	15.800
Junio 87	2.70	11.000	2.10	15.800
Agosto 87	6.71	2.382	5.00	6.721
Octubre 87	1ª RIADA			
Diciembre 87	36.90	1.333	45.70	1.370
Enero 88	83.50	1.306	82.90	1.348
Abril 88	190.20	1.287	187.70	1.361
Mayo 88	2ª RIADA			
Junio 88	263.20	1.424	268.5	1.398
Julio 88	377.70	1.424	408.5	1.398
Septbre 88	527.00	1.387	530.00	1.234
Novbre 88	730.00	1.330	765.00	1.107
Dicbre 88	3ª RIADA			
Enero 89	4ª RIADA			
Abril 89	890.3	1.280	1035.0	1.098

(1) y (2) = 1ª y 2ª época de madurez sexual

N > 30 en todos los casos

Tabla VIII

Valores medios de la constante de condición (K) e índice gónado-somático (GSI) observados en la población de trucha arco-iris ubicada en Orol (Lugo)

	FACTOR K				GSI					
	\bar{X}	\pm	E.S	(n)	P	\bar{X}	\pm	E.S	(n)	P
♀♀ 2n	1.48	\pm	0.13	(5)	n.s	17.84	\pm	0.75	(5)	<0.001
♀♀ 3n	1.48	\pm	0.03	(9)		0.31	\pm	0.05	(9)	
♂♂ 2n	1.36	\pm	0.06	(6)	n.s	2.34	\pm	0.31	(6)	<0.01
♂♂ 3n	1.48	\pm	0.06	(6)		0.71	\pm	0.21	(6)	

Tabla IX

Resultados de la experiencia de inducción de triploidía llevada a cabo en el salmón coho (Oncorhynchus kisutch L.)

EXP.	CONDICIONES			No. INICIAL DE HUEVOS	SUPERVIVENCIA HASTA		% de	
	T	D	t		DESPUES DE LA ECLOSION	S	TRIPLOIDES	N
1	Control			587.7 ± 42.0	46.78 ± 4.45	---	0.00	29
	28	10	10	804.8 ± 86.2	37.17 ± 3.86	n.s	64.87	37
	30	10	10	808.3 ± 85.3	12.17 ± 6.71	***	85.29	34
	32	10	10	900.7 ± 99.6	8.57 ± 5.80	***	93.94	33
2	Control			496.0 ± 40.6	42.22 ± 4.33	---	0.00	30
	32	2	10	811.3 ± 90.1	27.49 ± 6.45	n.s	0.00	38
	32	5	10	827.1 ± 118.2	8.29 ± 3.16	***	54.06	49
	32	7	10	661.6 ± 72.8	0.73 ± 0.73	***	93.94	16
3	Control			463.2 ± 40.2	28.89 ± 4.86	---	0.00	30
	28	10	5	677.2 ± 74.8	15.00 ± 6.36	n.s	95.24	32
	28	10	15	656.3 ± 129.1	12.34 ± 5.07	*	78.57	38
	28	10	25	731.2 ± 204.8	15.85 ± 4.88	n.s	42.31	33

T = Temperatura del choque térmico (°C)

D = Duración del choque térmico (minutos)

t = Tiempo de incubación (minutos)

N = N° de individuos en los que se determinó el nivel de ploidía

n.s = no significativo

* 0.01 < P < 0.05

*** P < 0.001

Tabla X

Resultados comparativos de la evolución seguida durante un periodo de crecimiento de 16 meses de dos lotes de salmón coho en la población de Orol (Lugo)

MES	PESO 2n		PESO 3n		P
	$\bar{X} \pm ES$	(n)	$\bar{X} \pm ES$	(n)	
Nov.87	F E C U N D A C I O N				
Feb.88	0.35 \pm 0.06	(168)	0.34 \pm 0.05	(147)	n.s
Mar.88	1.34 \pm 0.12	(120)	1.29 \pm 0.17	(106)	n.s
Abr.88	1ª R I A D A				
May.88	2.98 \pm 0.44	(94)	2.92 \pm 0.61	(85)	n.s
Jun.88	8.50 \pm 1.38	(109)	9.20 \pm 1.19	(103)	n.s
Jul.88	17.47 \pm 2.90	(104)	15.35 \pm 1.77	(104)	n.s
Ago.88	SMOLT 58.27%		SMOLT 43.23%		<0.05
Sep.88	35.00 \pm 3.11	(127)	29.46 \pm 2.75	(155)	n.s
Se clasifican por primera vez y se continua la experiencia con los de mayor tamaño (50%)					
Sep.88	52.60 \pm 4.27	(179)	51.60 \pm 5.09	(182)	n.s
Nov.88	103.50 \pm 9.14	(175)	97.60 \pm 8.65	(182)	n.s
Dic.88	2ª R I A D A				
Ene.89	3ª R I A D A				
Feb.89	165.2 \pm 17.3	(115)	140.5 \pm 10.3	(131)	n.s

Tabla XI

Valores medios de la constante de condición (K) e índice gónado-somático (GSI) observados en la población de salmón coho ubicada en Orol (Lugo)

	FACTOR K					GSI				
	\bar{X}	\pm	E.S	(n)	P	\bar{X}	\pm	E.S	(n)	P
♀♀ 2n	1.25	\pm	0.02	(18)	n.s	0.74	\pm	0.03	(17)	<0.001
♀♀ 3n	1.22	\pm	0.03	(17)		0.14	\pm	0.02	(11)	
♂♂ 2n	1.18	\pm	0.02	(17)	n.s	0.087	\pm	0.008	(14)	<0.001
♂♂ 3n	1.17	\pm	0.02	(25)		0.047	\pm	0.002	(18)	

Tabla XII

Resultados relativos a los distintos parámetros determinados para el análisis de la variabilidad cromosómica intra e interindividual presente en la trucha arco-iris (Salmo gairdneri Richardson)

N	H	HA	HA+	HA-	M	MA	MA+	MA-	DDA	DDA+	DDA-	DTA	DTA+	DTA-	VI D	VI T	E(%)	S3n	S2n
1	59	3.85	3.85	.00	60	.00	.00	.00	5.80	.00	5.80	4.61	2.27	2.34	15.38	15.38	86.96	68.33	79.6
2	60	4.00	.00	4.00	60	3.70	3.70	.00	8.83	3.05	5.78	8.58	2.32	6.26	5.88	7.41	97.78	66.05	73.7
3	60	.00	.00	.00	60	.00	.00	.00	8.70	3.56	5.14	8.28	2.27	6.01	.00	.00	95.23	75.96	76.1
4	60	.00	.00	.00	60	.00	.00	.00	5.88	.00	5.88	5.93	4.49	1.44	7.69	5.88	89.76	71.31	80.0
5	60	9.09	4.54	4.55	60	10.34	6.90	3.44	13.61	2.99	10.62	10.88	3.82	7.06	15.38	15.00	96.51	68.22	72.5
6	60	4.76	.00	4.76	60	.00	.00	.00	5.18	2.67	2.51	4.21	.96	3.25	.00	8.69	98.11	73.42	81.6
7	60	6.67	.00	6.67	60	4.17	.00	4.17	10.33	3.37	6.96	9.10	2.63	6.47	7.14	9.09	97.21	60.72	70.2
8	60	10.00	.00	10.00	59	6.90	6.90	.00	12.28	4.05	8.23	6.47	3.81	2.66	.00	5.00	94.92	63.79	67.4
9	60	11.11	3.70	7.41	61	10.00	3.33	6.67	12.57	3.41	9.16	9.43	6.25	3.18	11.76	8.33	96.87	57.35	69.7
10	60	12.50	4.17	8.33	62	17.24	3.35	13.79	14.19	6.20	7.99	12.52	2.28	10.24	22.22	20.00	80.87	57.94	69.5
11	60	4.17	.00	4.17	63	20.83	.00	20.83	18.39	5.18	13.21	12.86	4.90	7.96	21.43	23.81	84.61	58.73	58.7
12	61	.00	.00	.00	59	10.00	3.33	6.67	9.12	1.57	7.55	8.50	2.11	6.39	7.69	.00	90.07	55.53	73.4
13	61	12.00	4.00	8.00	60	.00	.00	.00	8.65	3.44	5.21	7.63	3.59	4.04	11.76	9.09	90.89	60.75	76.2
14	61	13.04	4.35	8.69	61	19.23	.00	19.23	14.75	3.01	11.74	11.10	2.61	8.49	.00	.00	86.05	55.49	70.3
15	61	11.11	.00	11.11	61	14.82	.00	14.82	13.00	3.65	9.35	12.44	2.50	9.94	9.52	.00	90.52	54.23	71.4
16	61	13.64	.00	13.64	62	17.86	3.57	14.29	16.09	1.64	14.45	15.21	5.62	9.59	22.22	28.57	96.15	48.92	60.3
17	61	13.04	.00	13.04	63	19.05	.00	19.05	17.82	7.98	9.83	16.32	4.20	12.12	27.78	21.74	84.89	49.89	60.4
18	62	16.67	.00	16.67	59	5.00	5.00	.00	7.80	2.52	5.28	7.89	2.16	5.73	18.75	25.00	79.88	66.63	76.8
19	62	17.86	3.57	14.29	60	6.89	.00	6.89	7.32	1.96	5.35	7.74	2.25	5.49	26.31	26.09	98.14	64.20	80.2
20	62	13.64	4.54	9.09	60	4.17	.00	4.17	7.81	3.98	2.83	9.43	3.98	5.45	26.67	18.75	97.56	69.15	76.6
21	62	15.00	.00	15.00	61	8.68	4.34	4.34	15.80	6.33	9.47	16.76	5.17	11.59	31.25	23.81	98.34	40.44	61.5
22	62	14.29	.00	14.29	62	11.54	.00	11.54	17.59	4.79	12.80	22.79	1.69	21.10	30.77	40.00	98.00	53.47	60.9
23	62	15.38	.00	15.38	62	12.50	.00	12.50	16.18	3.88	12.30	23.51	4.16	19.35	35.29	44.44	97.02	56.66	63.3
24	62	14.81	.00	14.81	62	14.28	.00	14.28	13.34	3.85	9.49	18.74	5.55	13.19	38.09	47.37	94.74	60.12	72.5
25	63	17.39	.00	17.39	62	15.38	.00	15.38	17.26	5.13	12.24	16.17	5.39	10.77	27.27	46.67	88.67	51.57	59.2



Tabla XIII

Incrementos que se producen en la tasa de variabilidad
intraindividual entre las generaciones parental y
filial (en los niveles diploide y triploide)
en la clase de cruzamientos HA y MA > 0

	SUBCLASE		
	HA<MA (n=6)	HA=MA (n=6)	HA>MA (n=7)
HA	11.25 ± 1.46	10.51 ± 2.04	14.69 ± 0.95
MA	18.17 ± 0.84	9.64 ± 2.00	7.95 ± 1.19
DDA	15.71 ± 0.86	12.66 ± 1.99	12.11 ± 1.69
//HA	+39.64 %	+20.46 %	17.56 %
//MA	-13.54 %	+31.33 %	+52.33 %
DTA	13.41 ± 0.80	12.15 ± 1.74	13.51 ± 2.79
//HA	+19.20 %	+15.60 %	-8.01 %
//MA	-26.20 %	+26.04 %	+69.97 %

// = incremento respecto a

Tabla XIV

Valores medios de variabilidad intraindividual mostrados por cada uno de los números cromosómicos presentes en la generación parental y en la generación filial

2n	HA + MA		PROGENITORES		DIFERENCIAS PADRES- -HIJOS	DA HIJOS		N	P
	\bar{X}	\pm E.S	N	P		\bar{X}	\pm E.S		
59	6.44	\pm 1.34	4		> 0.1	11.68	\pm 3.35	9	
60	4.58	\pm 0.95	20	n.s	< 0.001	9.08	\pm 0.74	191	n.s
61	11.56	\pm 1.57	10	< 0.001	> 0.2	13.23	\pm 1.02	114	< 0.001
62	15.11	\pm 0.54	13	< 0.05	> 0.2	16.86	\pm 1.38	76	< 0.05
63	19.09	\pm 0.99	3	< 0.01	> 0.1	22.88	\pm 2.32	13	< 0.05

Tabla XV

Matriz de correlación obtenida de la comparación entre las 19 variables calculadas en relación con el polimorfismo intra e interindividual en cada uno de los 25 cruzamientos realizados en la población de trucha arco-iris de Orol (Lugo)

	H	HA	HA+	HA-	M	MA	MA+	MA-	DDA	DDA+	DDA-	DTA	DTA+	DTA-	VID	VIT	E(%)	S3n	S2n
H	1.00																		
HA	.75	1.00																	
HA+	-.17	.18	1.00																
HA-	.81	.94	-.17	1.00															
M	.25	.36	-.15	.41	1.00														
MA	.29	.42	-.07	.45	.77	1.00													
MA+	-.17	.04	.04	.02	-.36	.01	1.00												
MA-	.33	.39	-.08	.42	.85	.94	-.31	1.00											
DDA	.34	.45	-.20	.52	.81	.86	.05	.80	1.00										
DDA+	.31	.42	-.13	.47	.60	.52	.00	.50	.69	1.00									
DDA-	.25	.33	-.21	.41	.71	.82	.08	.76	.91	.33	1.00								
DTA	.60	.54	-.29	.65	.76	.64	-.15	.66	.82	.56	.74	1.00							
DTA+	.22	.28	-.05	.30	.45	.38	.11	.32	.48	.22	.48	.36	1.00						
DTA-	.57	.50	-.30	.60	.67	.57	-.19	.61	.73	.53	.65	.96	.10	1.00					
VID	.66	.66	-.04	.67	.61	.42	-.15	.45	.50	.41	.40	.75	.43	.68	1.00				
VIT	.66	.64	-.19	.71	.59	.38	-.16	.41	.50	.32	.46	.74	.38	.68	.89	1.00			
E(%)	.09	.00	-.08	.03	-.17	-.33	.03	-.32	-.11	-.12	-.08	.11	.09	.09	.02	.05	1.00		
S3n	-.46	-.51	.20	-.58	-.58	-.69	-.06	-.63	-.76	-.52	-.70	-.67	-.43	-.59	-.48	-.36	.07	1.00	
S2n	-.32	-.37	.36	-.49	-.74	-.75	-.09	-.68	-.95	-.66	-.86	-.76	-.51	-.66	-.46	-.48	.05	.79	1.00

Valor crítico (1 cola, $P=0.05$): 0.34

Valor crítico (2 colas, $P=0.05$): 0.39

Tabla XVI

Tasas de polimorfismo cromosómico no esperado que presenta cada cruzamiento en las progenies diploides (VID) y triploides (VIT) respectivamente

CRUCE nº	H	M	Nº INDIVIDUOS 2n						Nº INDIVIDUOS 3n										
			58	59	60	61	62	63	VID	88	89	90	91	92	93	94	95	VIT	
1	59	x	60	--	3	8	②	--	--	15.38	◇	④	22	--	--	--	--	15.38	
2	60	x	60	--	①	16	--	--	--	5.88	--	--	25	--	②	--	--	7.41	
3	60	x	60	--	--	13	--	--	--	0.00	--	--	20	--	--	--	--	0.00	
4	60	x	60	--	--	12	①	--	--	7.69	--	--	16	--	①	--	--	5.88	
5	60	x	60	--	①	11	①	--	--	15.38	--	--	17	①	②	--	--	15.00	
6	60	x	60	--	--	11	--	--	--	0.00	--	②	21	--	--	--	--	8.69	
7	60	x	60	--	--	13	①	--	--	7.14	--	--	20	②	--	--	--	9.09	
8	60	x	59	--	2	18	--	--	--	0.00	--	◇	19	--	①	--	--	5.00	
9	60	x	61	--	--	4	11	②	--	11.76	--	--	12	10	②	--	--	8.33	
10	60	x	62	--	--	④	14	--	--	22.22	--	--	②	16	②	--	--	20.00	
11	60	x	63	--	--	③	6	5	--	21.43	--	--	⑤	10	6	--	--	23.81	
12	61	x	59	--	◇	7	5	①	--	7.69	--	◇	9	9	1	--	--	0.00	
13	61	x	60	--	②	9	6	--	--	11.76	--	--	18	②	2	--	--	9.09	
14	61	x	61	--	--	9	3	3	--	0.00	--	--	11	2	4	--	--	0.00	
15	61	x	61	①	--	10	4	5	①	9.52	--	--	10	5	5	--	--	0.00	
16	61	x	62	--	①	②	9	5	①	22.22	--	--	⑥	10	--	5	--	28.57	
17	61	x	63	--	--	⑤	6	6	1	27.78	--	--	⑤	9	5	4	◇	21.74	
18	62	x	59	--	②	10	3	①	--	18.75	--	--	⑤	11	4	--	--	25.00	
19	62	x	60	--	--	④	14	①	--	26.31	--	--	④	②	17	--	--	26.09	
20	62	x	60	--	--	④	11	--	--	26.67	--	--	③	--	13	--	--	18.75	
21	62	x	61	--	--	④	5	6	①	31.25	--	--	④	①	9	7	--	23.81	
22	62	x	62	--	--	④	--	9	--	30.77	--	--	⑤	②	①	12	--	40.00	
23	62	x	62	--	--	⑤	①	11	--	35.29	--	--	⑦	--	①	10	--	44.44	
24	62	x	62	--	--	⑤	②	13	①	38.09	--	--	⑥	②	①	10	--	47.37	
25	63	x	62	--	--	④	②	9	7	27.27	--	--	⑥	--	①	8	--	◇	46.67

Sin marcar = números cromosómicos observados y esperados
 Con círculo = números cromosómicos observados pero no esperados

Con rombo = números cromosómicos esperados y no observados

Tabla XVII

Características de la variabilidad NOR que presentan los individuos triploides de trucha arco-iris en las dos poblaciones analizadas

CITOTIPO NOR	FRECUENCIA CELS.		Nº NUCLEOLOS/CELULA				
	BENAM.	OROL	$\bar{X} \pm$	ES	(N)	t_s	S
1 M ₁ + 1 M ₂	13.33	10.00	1.46 ± 0.08		(54)	8.823	***
2 M ₁ + 1 M ₂	20.00	20.00	2.59 ± 0.10		(44)	0.390	n.s
2 M ₁ + 1 M ₃	6.67	10.00	2.54 ± 0.08		(30)	2.667	**
3 M ₁	26.67	10.00	2.97 ± 0.14		(35)	2.657	**
2 M ₁ +1 M ₂ +1 M ₃	33.33	50.00	3.42 ± 0.12		(36)		

* 0.05 > P > 0.01

** 0.01 > P > 0.001

*** P < 0.001

FIGURAS

FIGURA 1.- Morfolofía externa de los testículos de trucha arco-iris pertenecientes, unos a ejemplares diploides (2n), otros a ejemplares triploides (3n), y otros a neomachos. Ver descripción en el texto.

OUROL-LUGO



NEO
MACHO



ESTERIL
3N

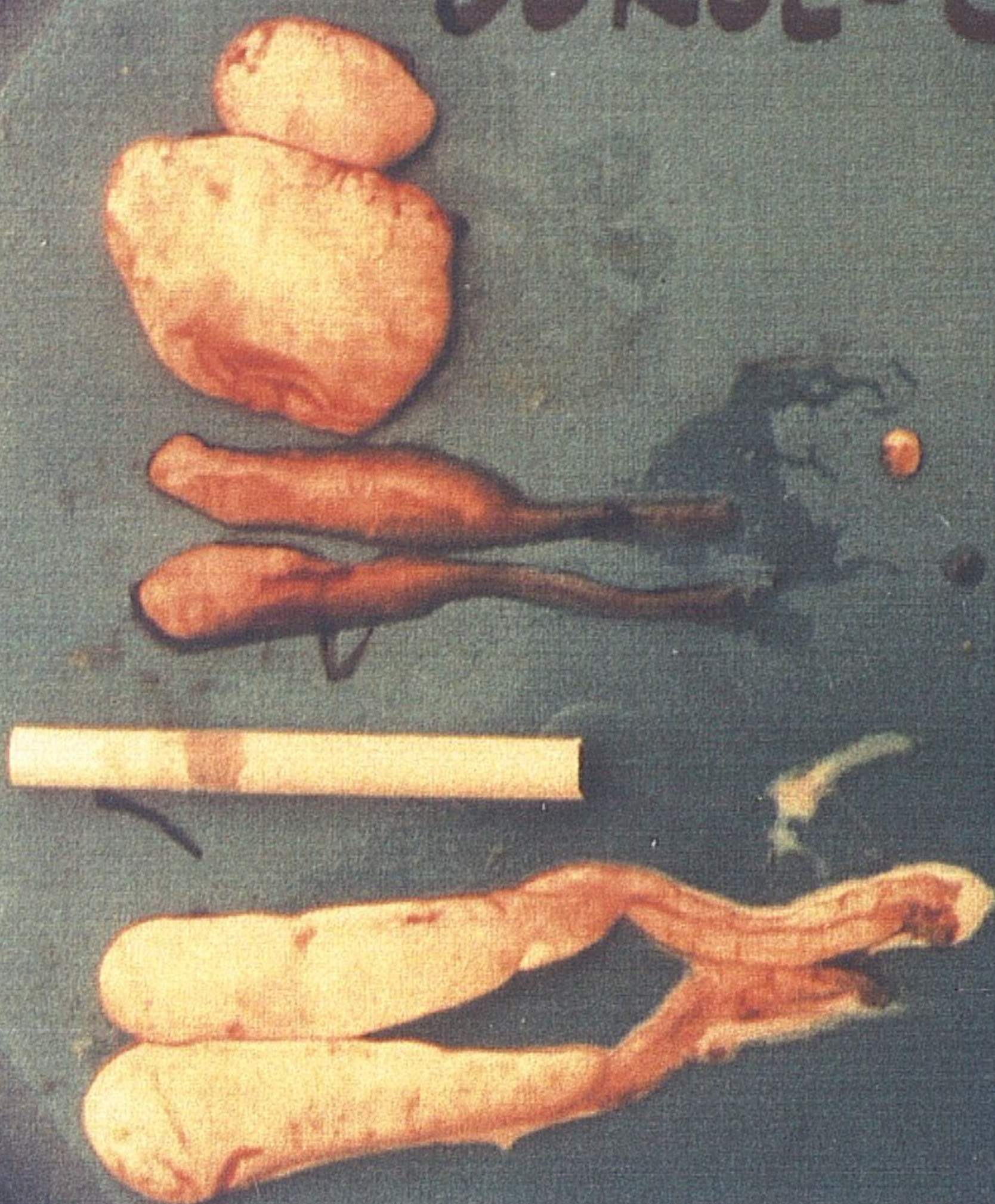


MACHO
2N

21-2-89

21-2-89

OUROL-LUGO



NEO-♂

♂ 3N

♂ 2N

FIGURA 2.- Cortes histológicos de gónadas de trucha arco-iris: a) testículo de macho normal (diploide), b) testículo de macho triploide, c) ovario de hembra normal (diploide), y d) ovario de hembra triploide. Ver descripción en el texto.

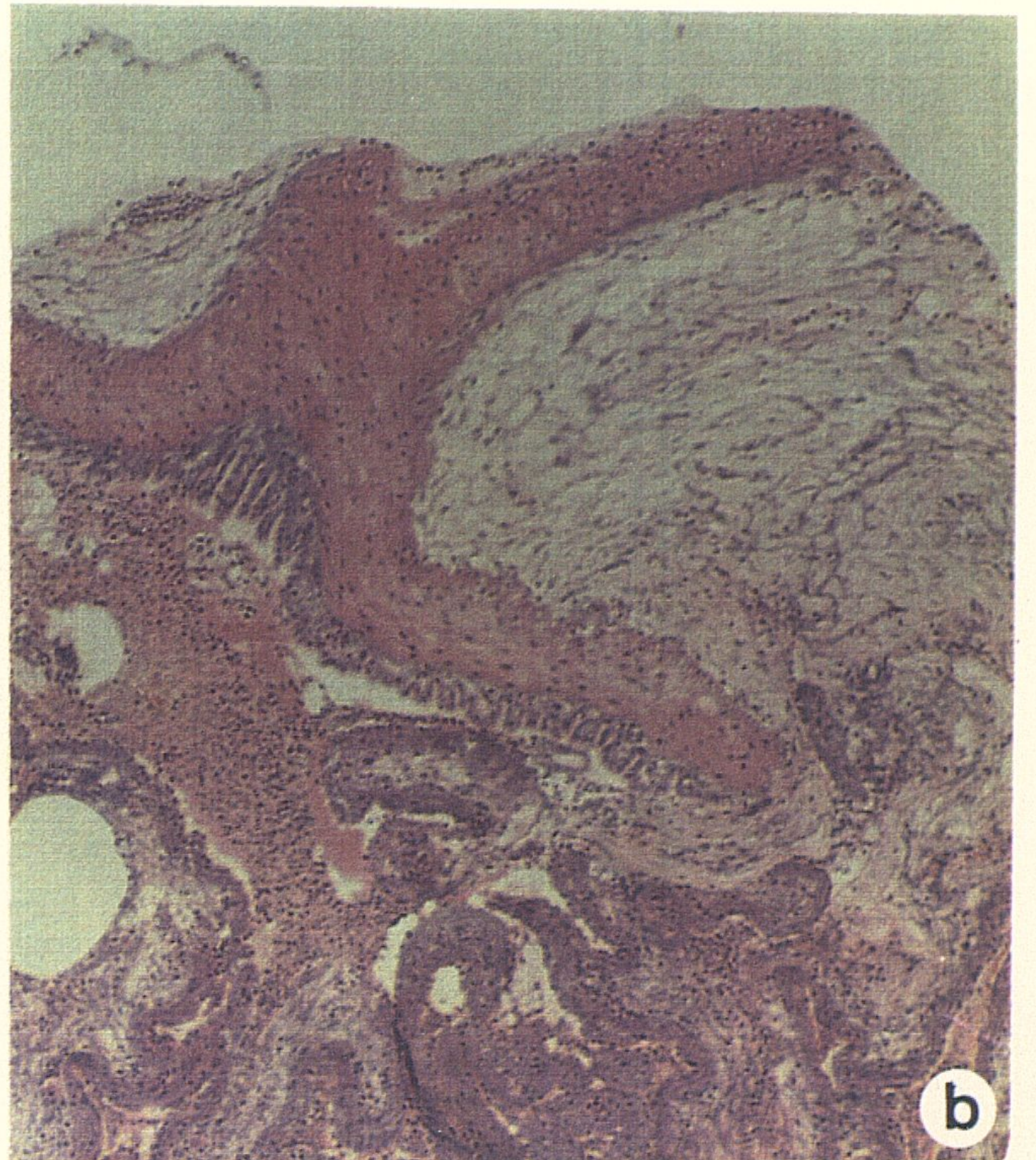


FIGURA 3.- Cortes histológicos de gónadas de salmón coho: a) testículo de macho normal (diploide), b) testículo de macho triploide, c) ovario de hembra normal (diploide), y d) ovario de hembra triploide. Ver descripción en el texto.

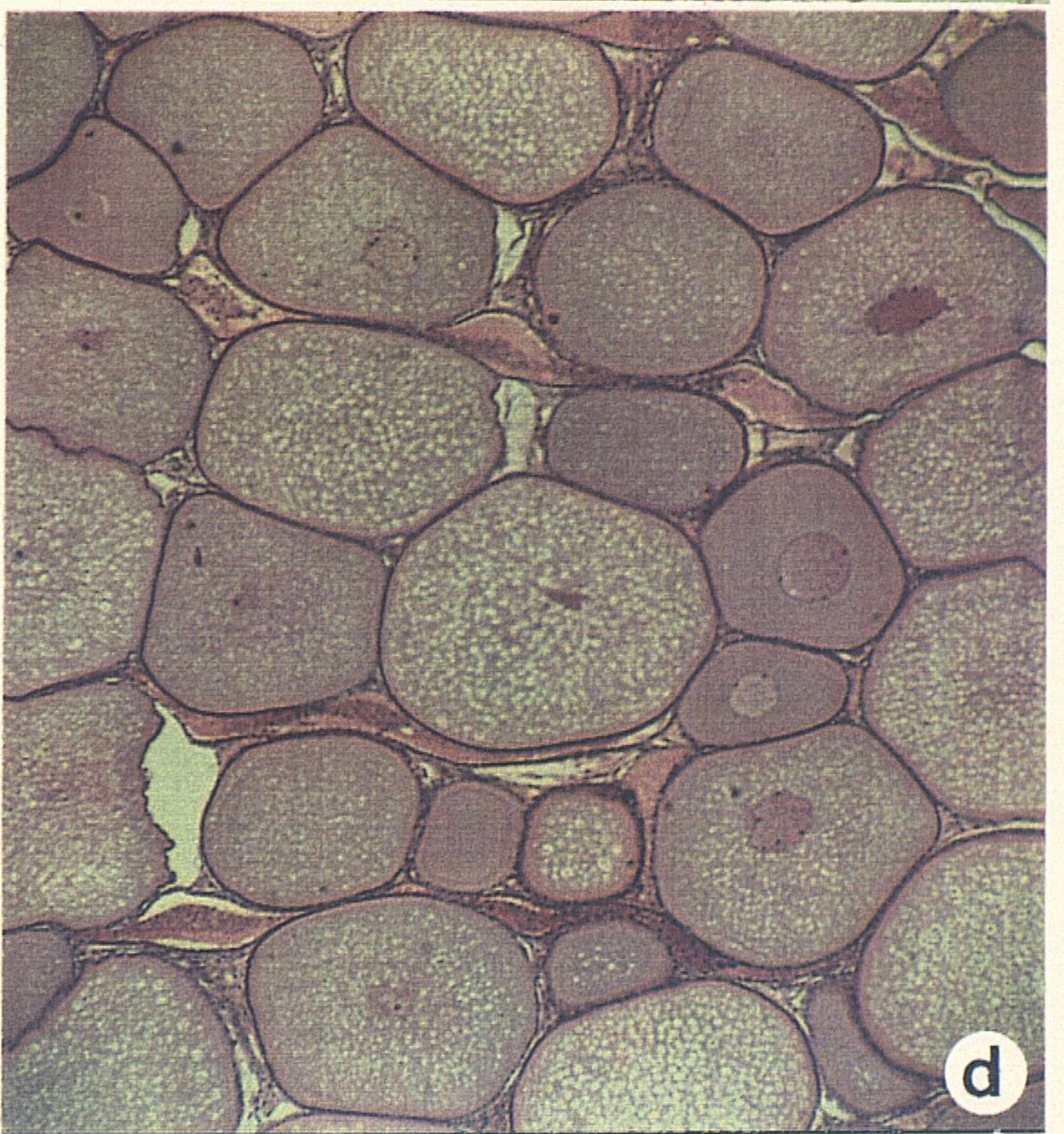
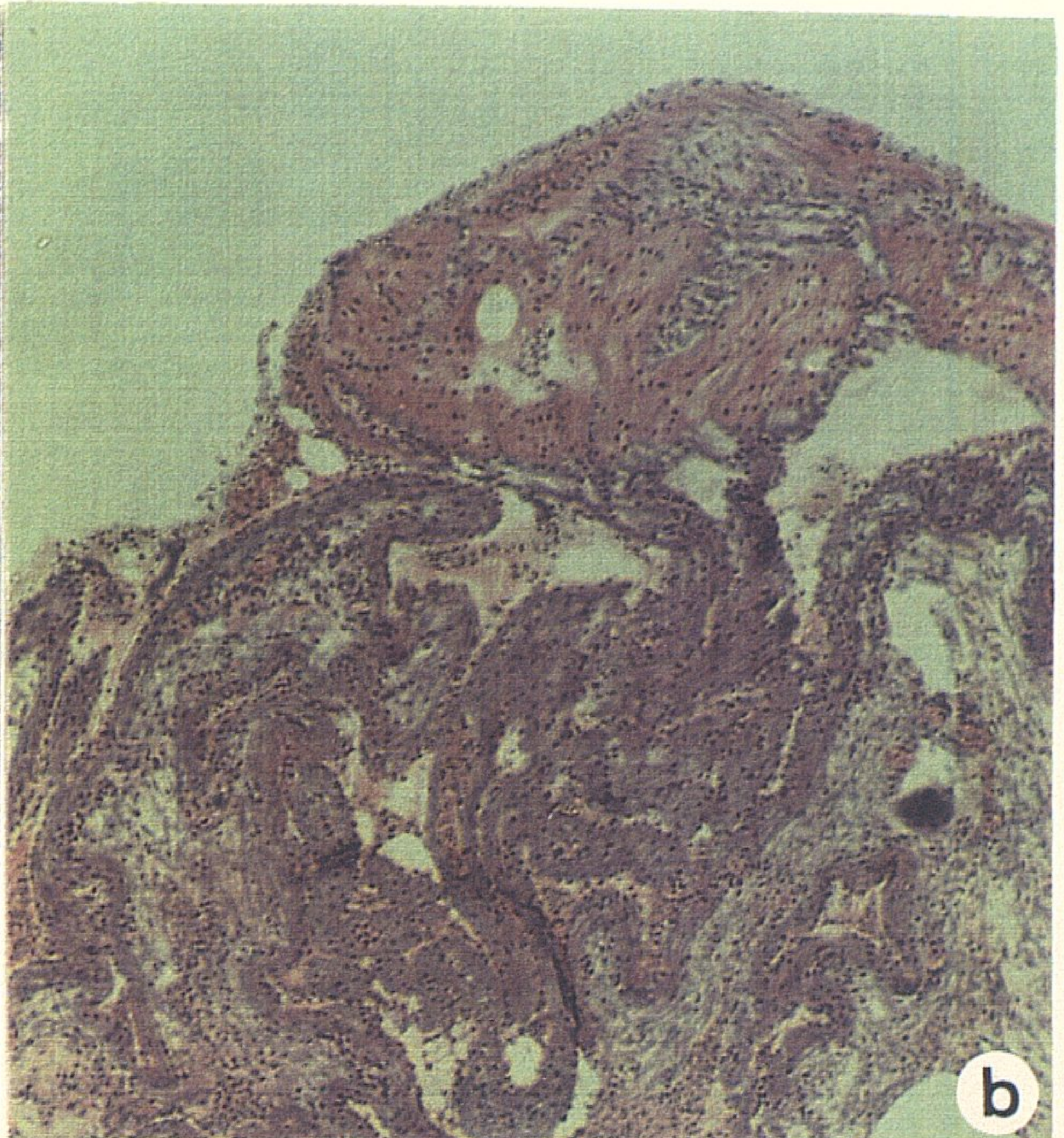
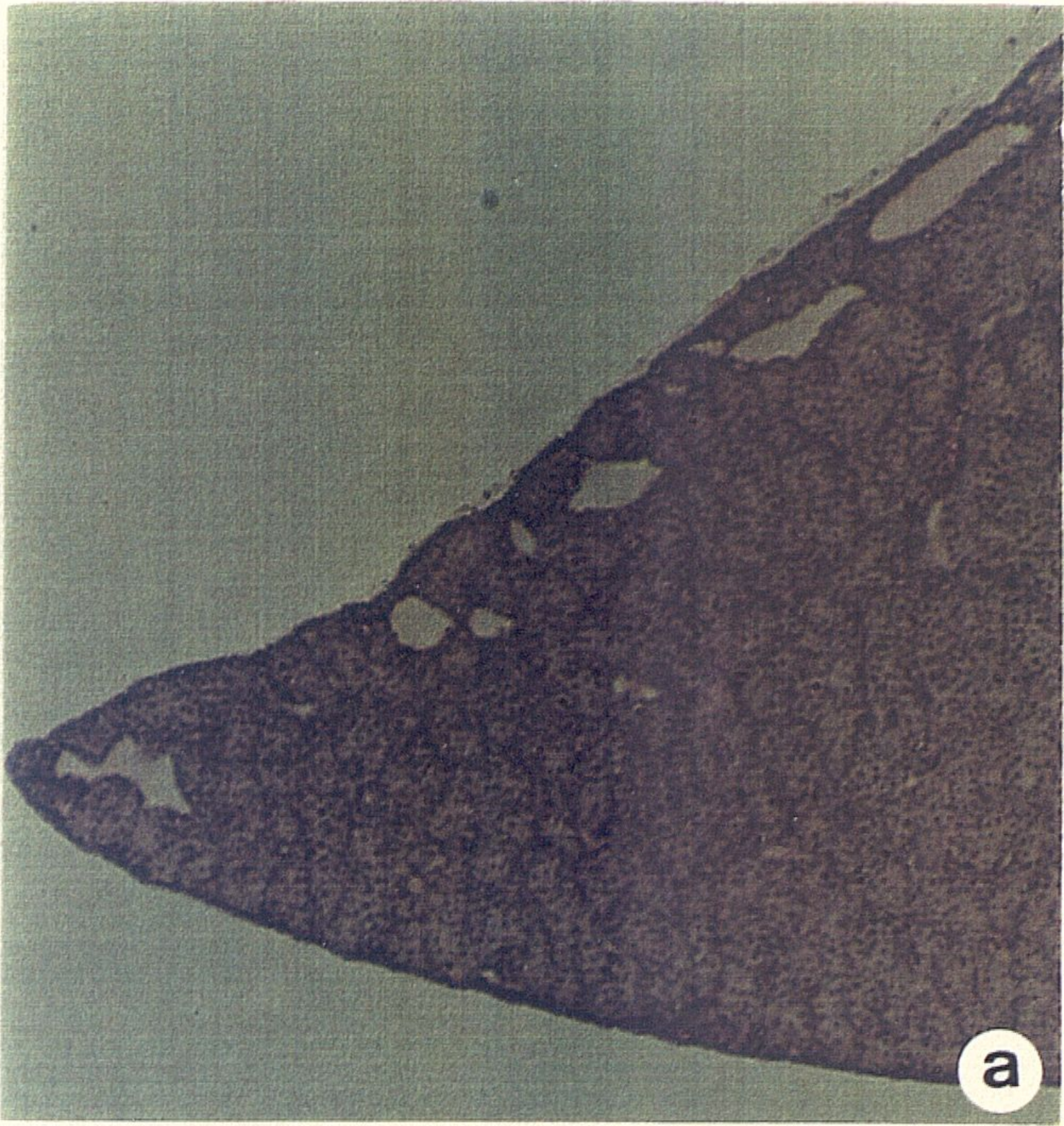
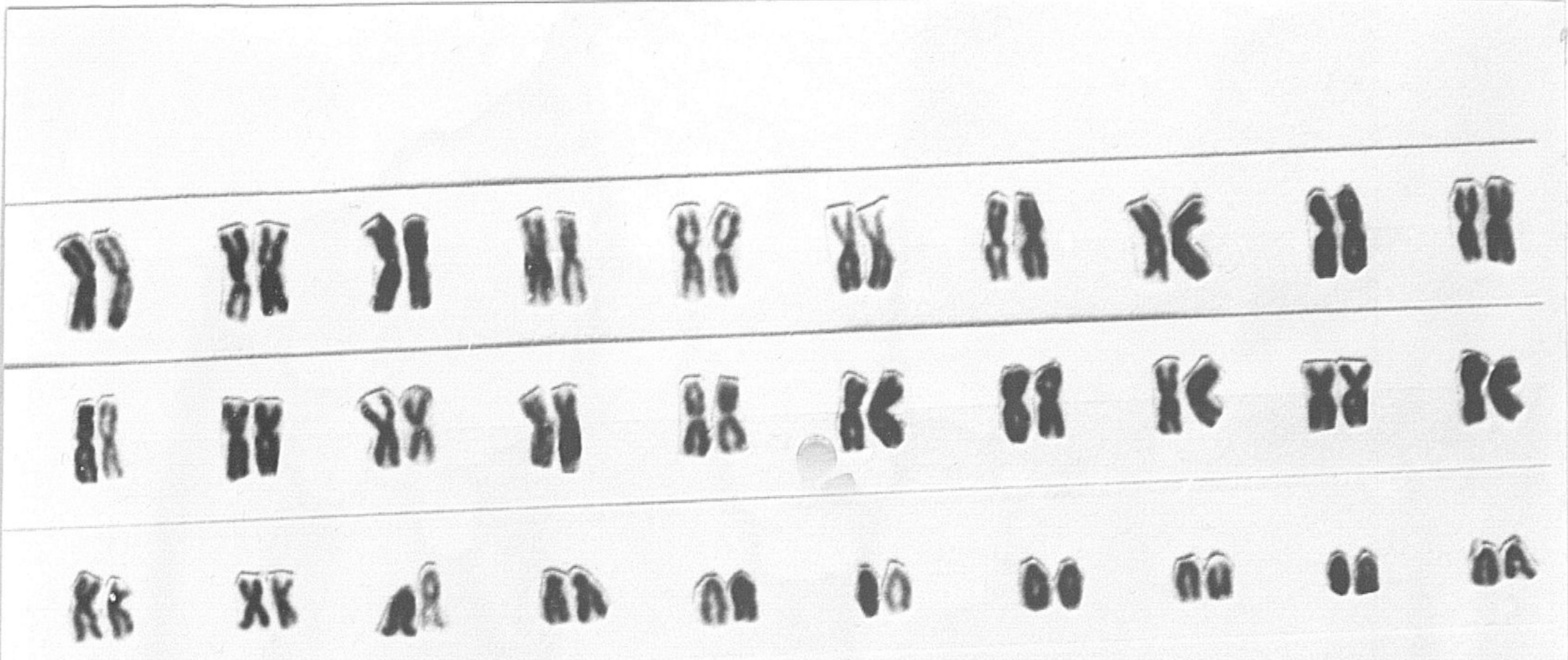


FIGURA 4.- Cariotipo diploide estándar ($2n=60$) y metafases mitóticas con distinto número cromosómico en la trucha arco-iris: a) metafase con $2n=59$ cromosomas, b) metafase con $2n=60$, c) metafase con $2n=61$, y d) metafase con $2n=63$ cromosomas. Escala 10 micras.



10 μ

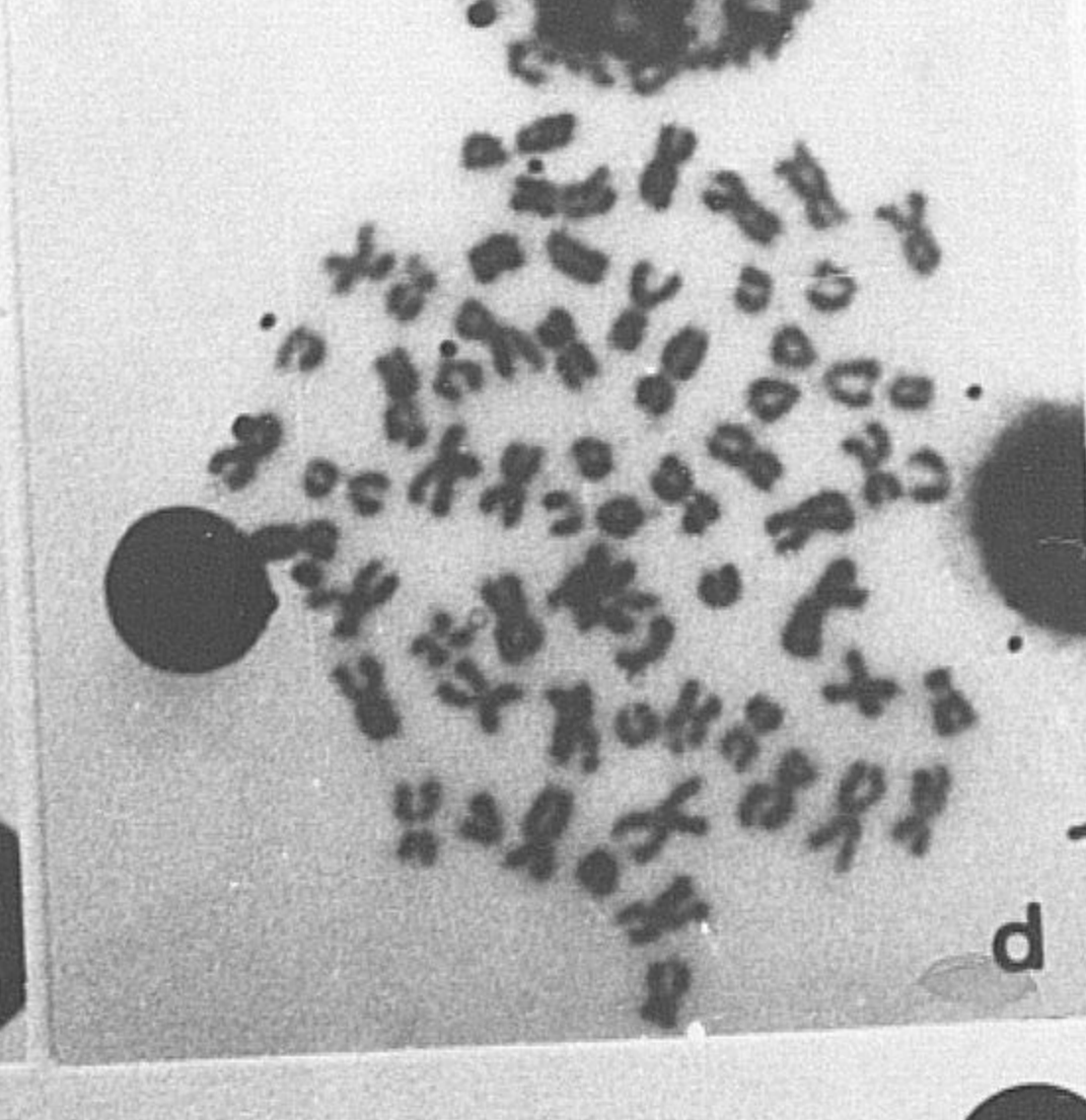
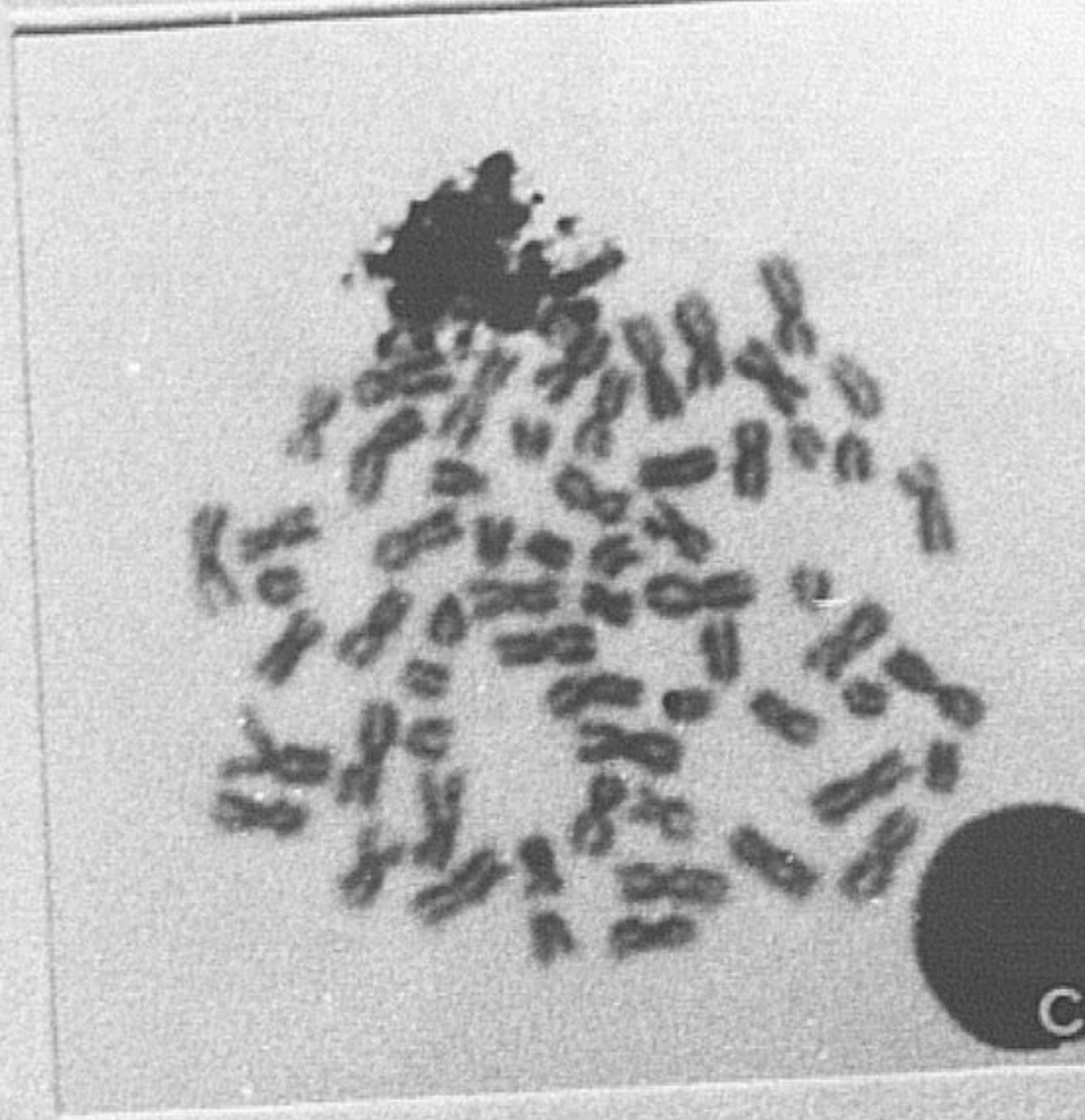
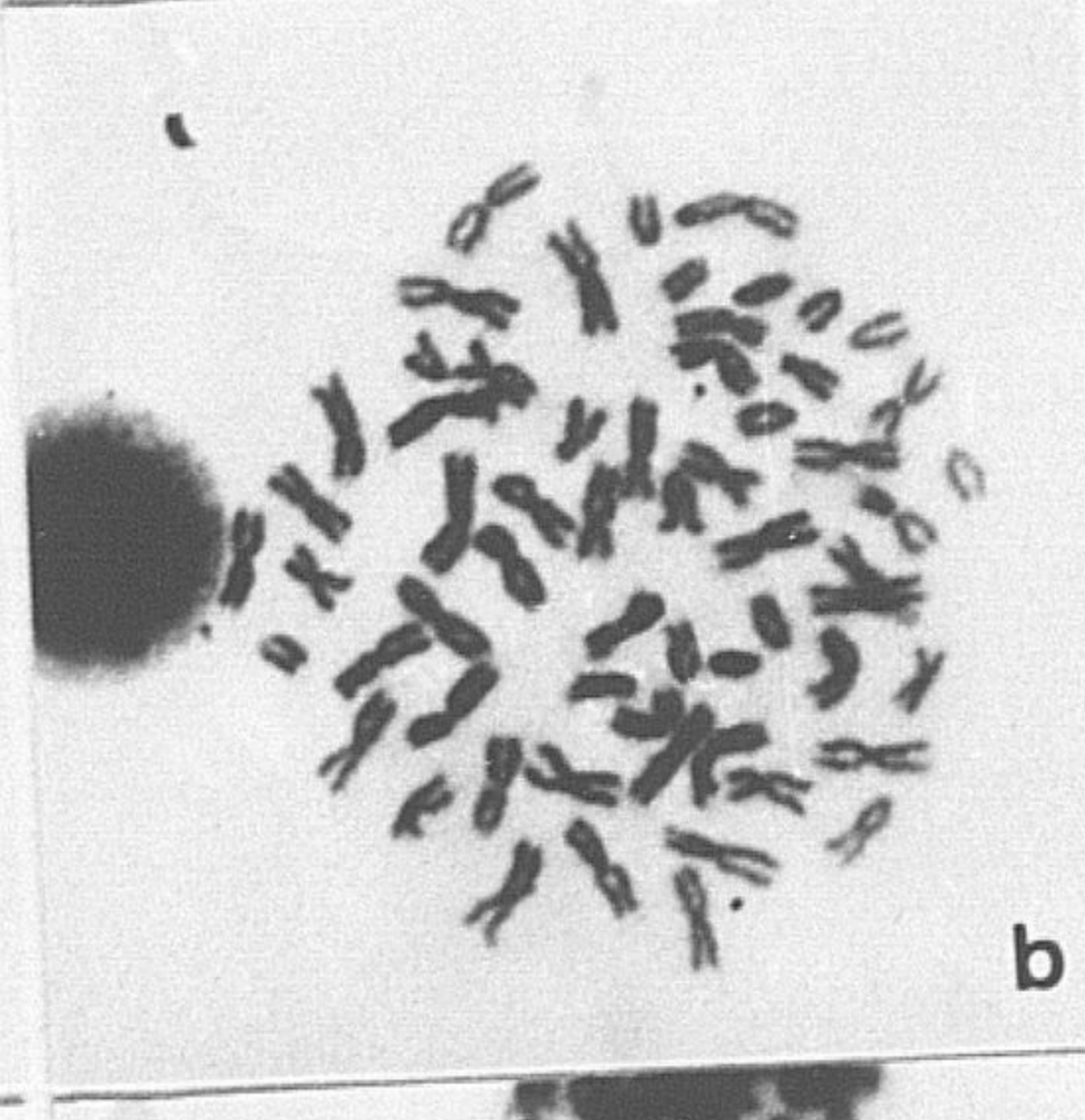
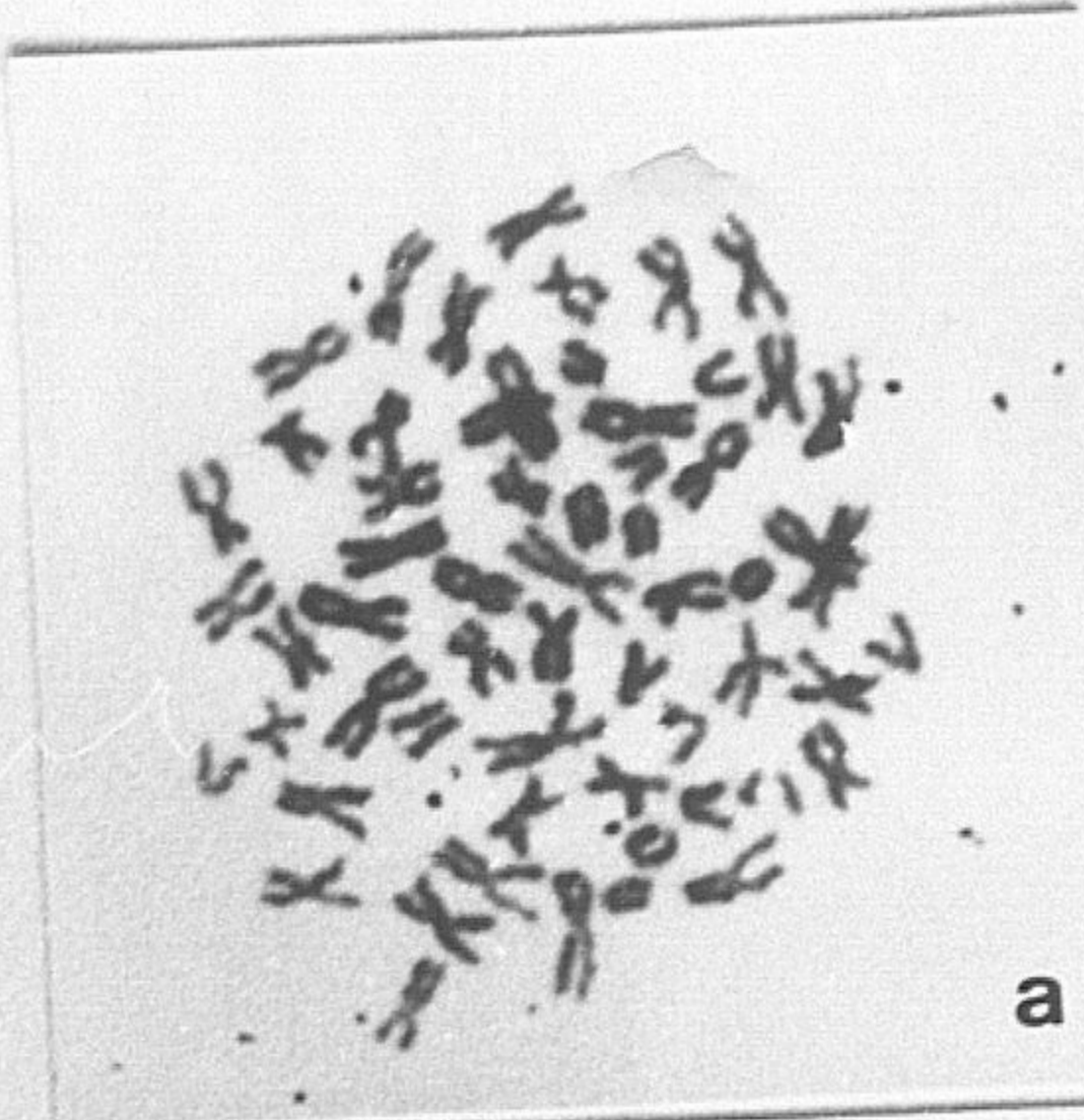
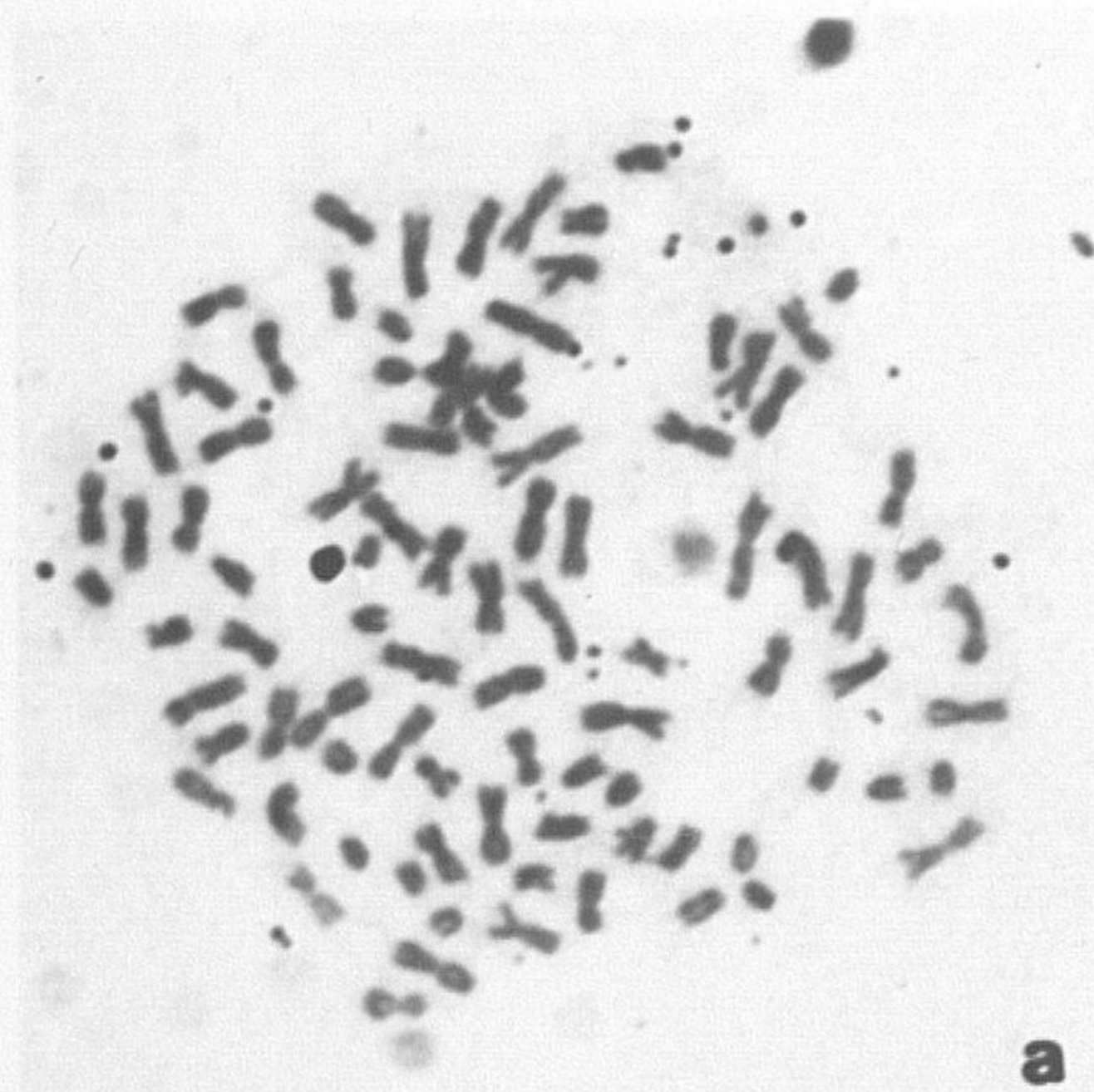
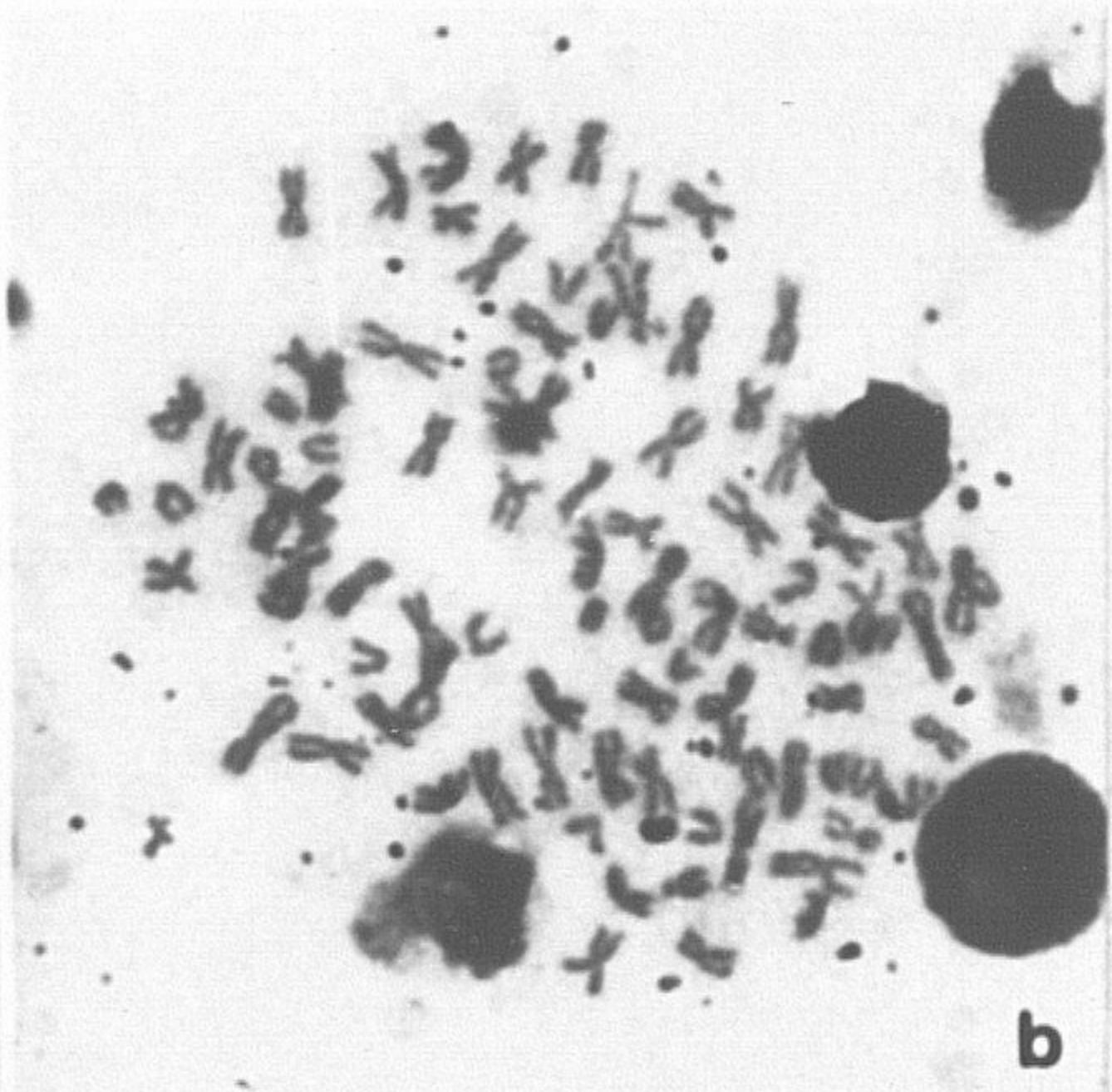


FIGURA 5.- Cariotipo triploide ($3n=90$) y metafases con distinto número cromosómico en la trucha arco-iris: a) $3n=90$, b) $3n=92$, c) $3n=94$, y d) $3n=95$.

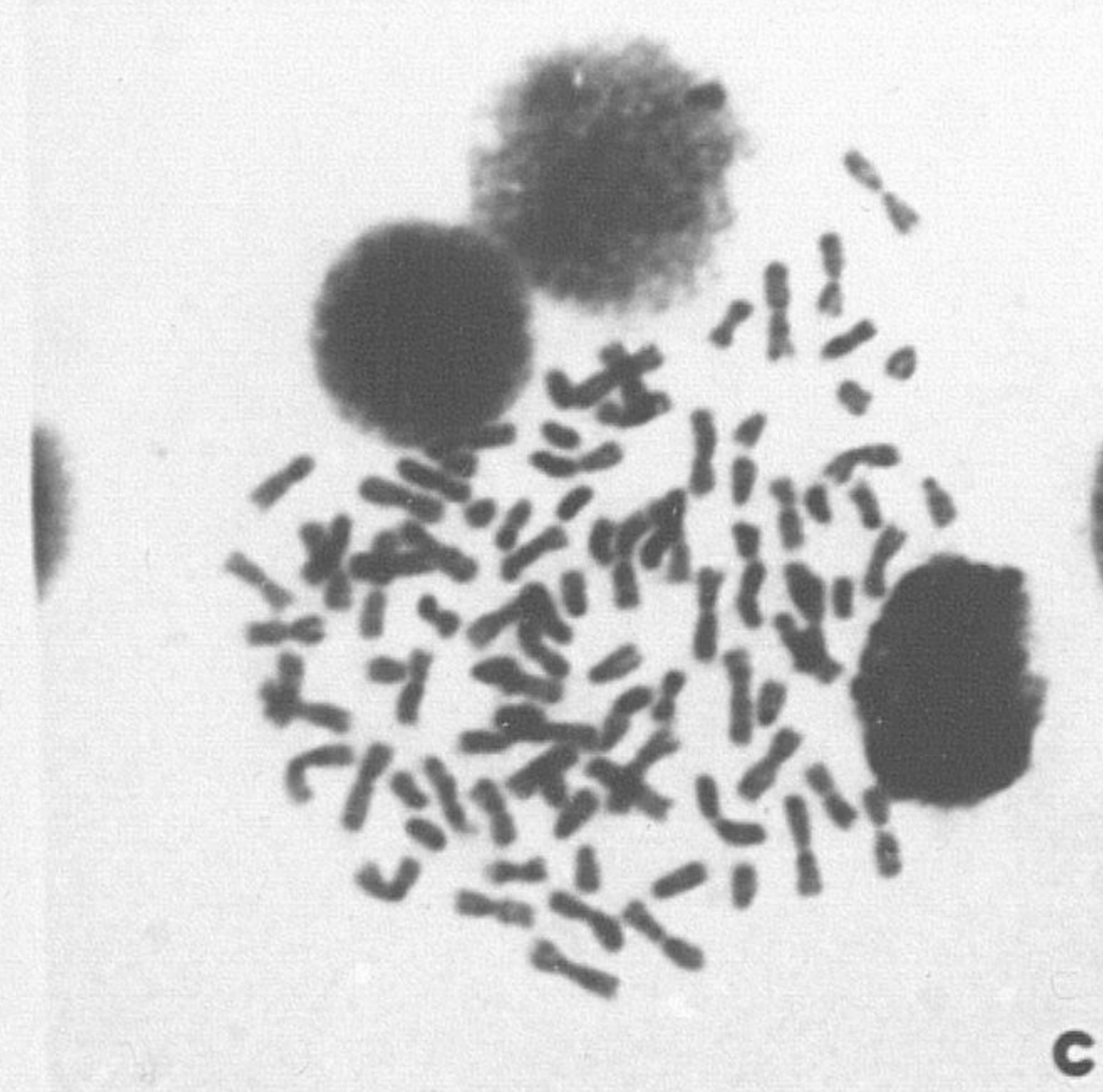
111 222 333 444 555 666 777 888 999 000
111 222 333 444 555 666 777 888 999 000
111 222 333 444 555 666 777 888 999 000



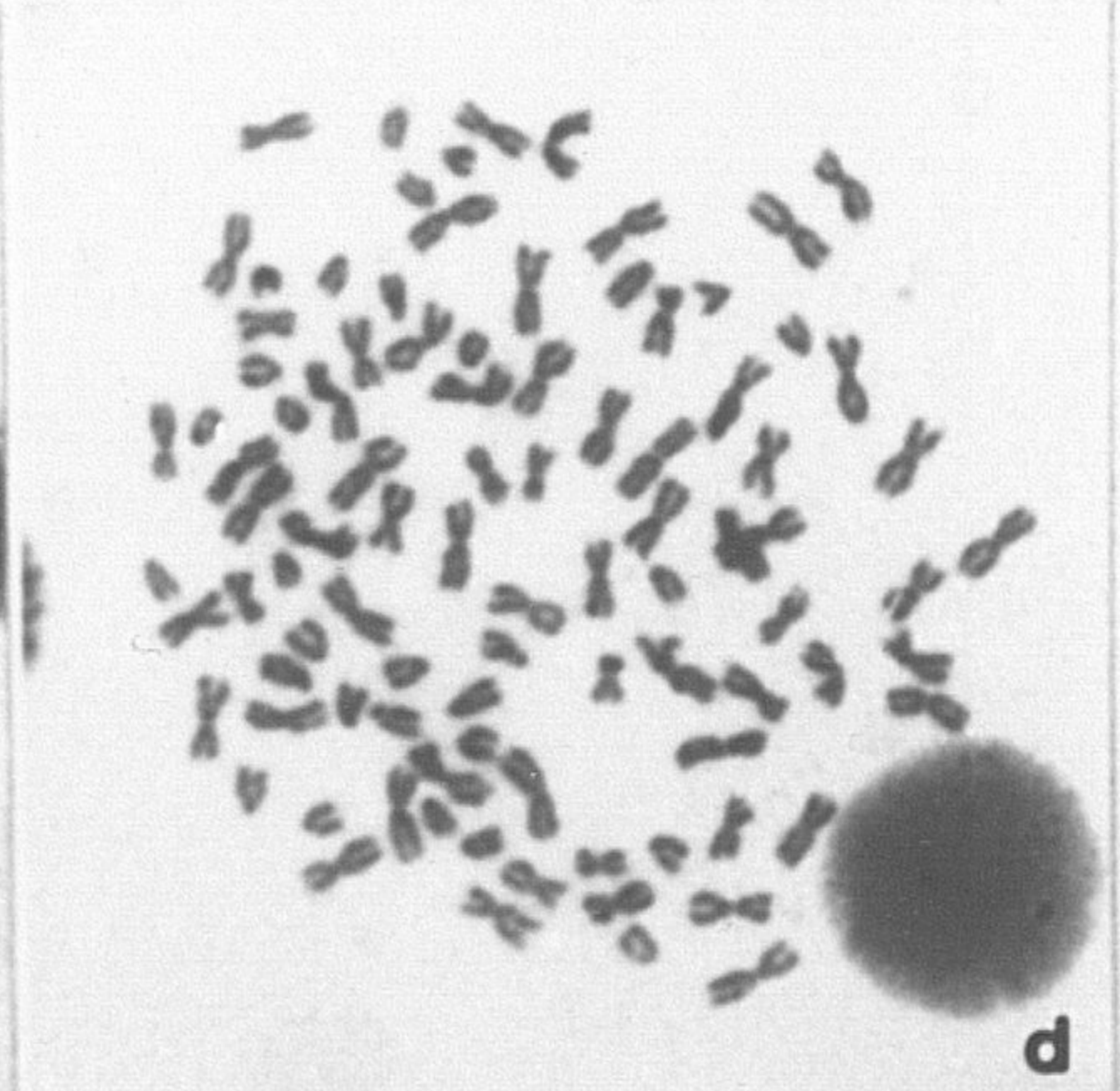
a



b

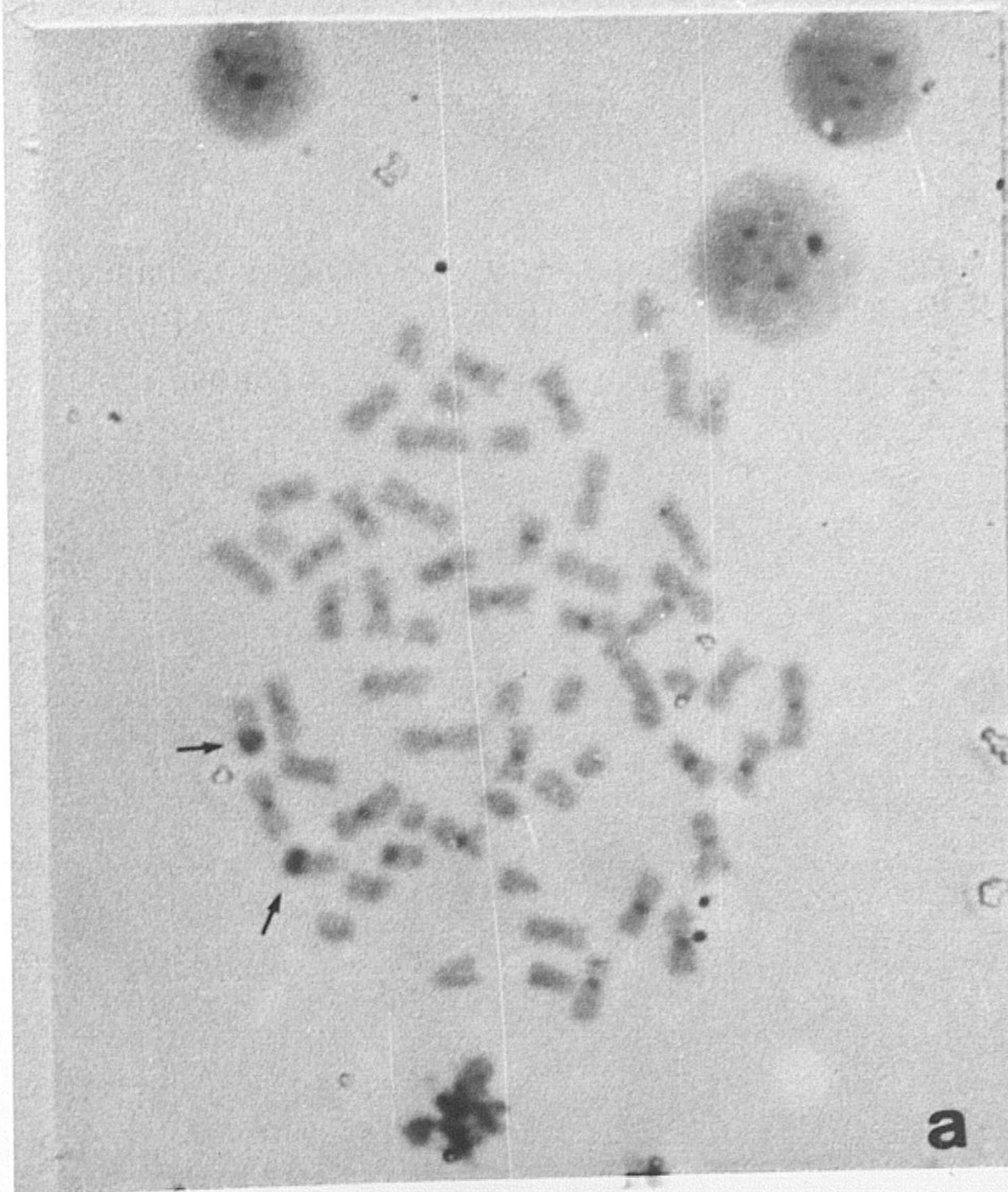


c

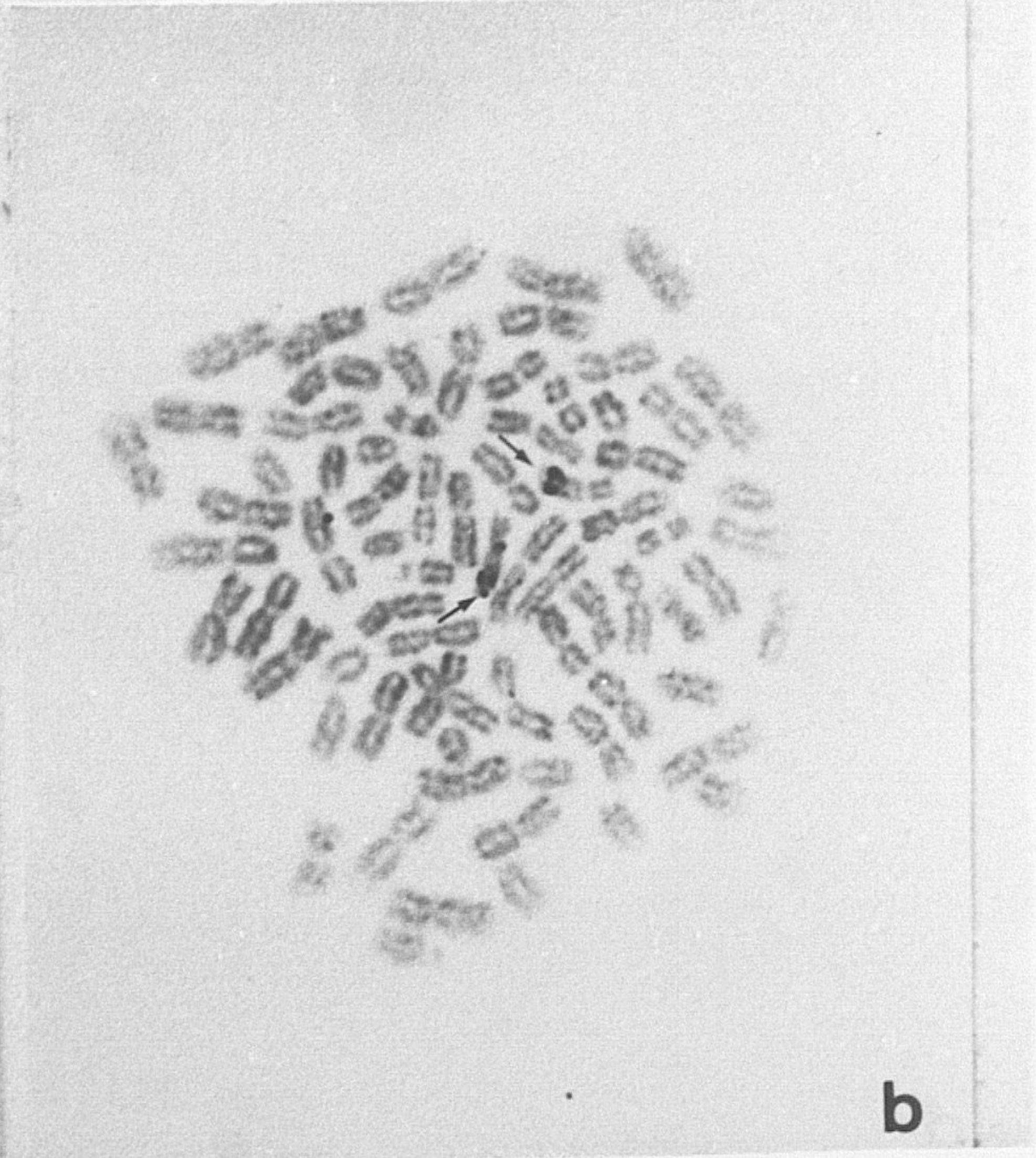


d

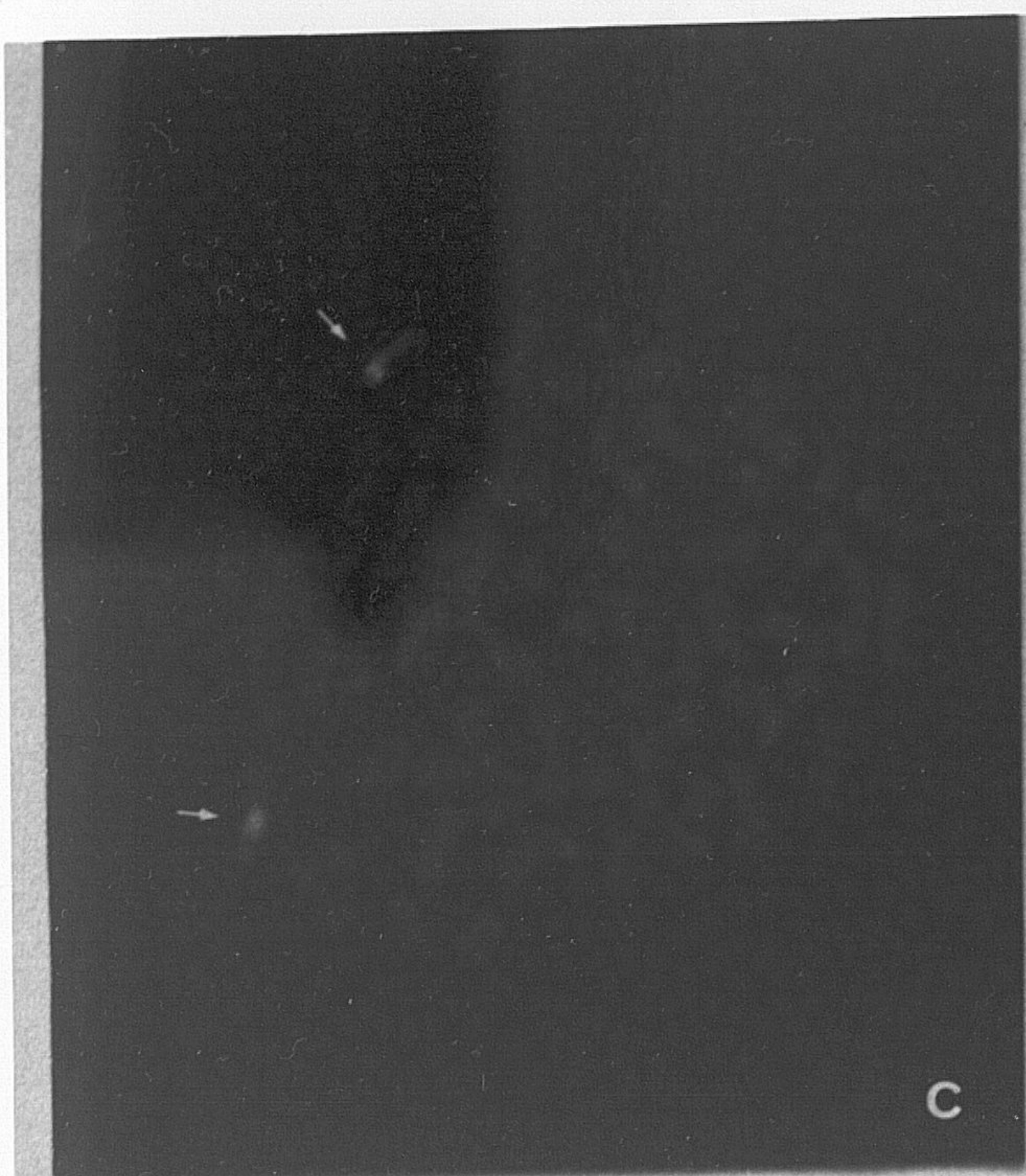
FIGURA 6.- Bando cromosómico en metafases somáticas de trucha arco-iris (*Salmo gairdneri*): a) bando C, b) tinción con nitrato de plata, c) tinción fluorescente con CMA₃/DA, y d) tinción fluorescente con DAPI/AMD. Las flechas señalan las regiones de heterocromatina asociada a los NORs y a estos mismos.



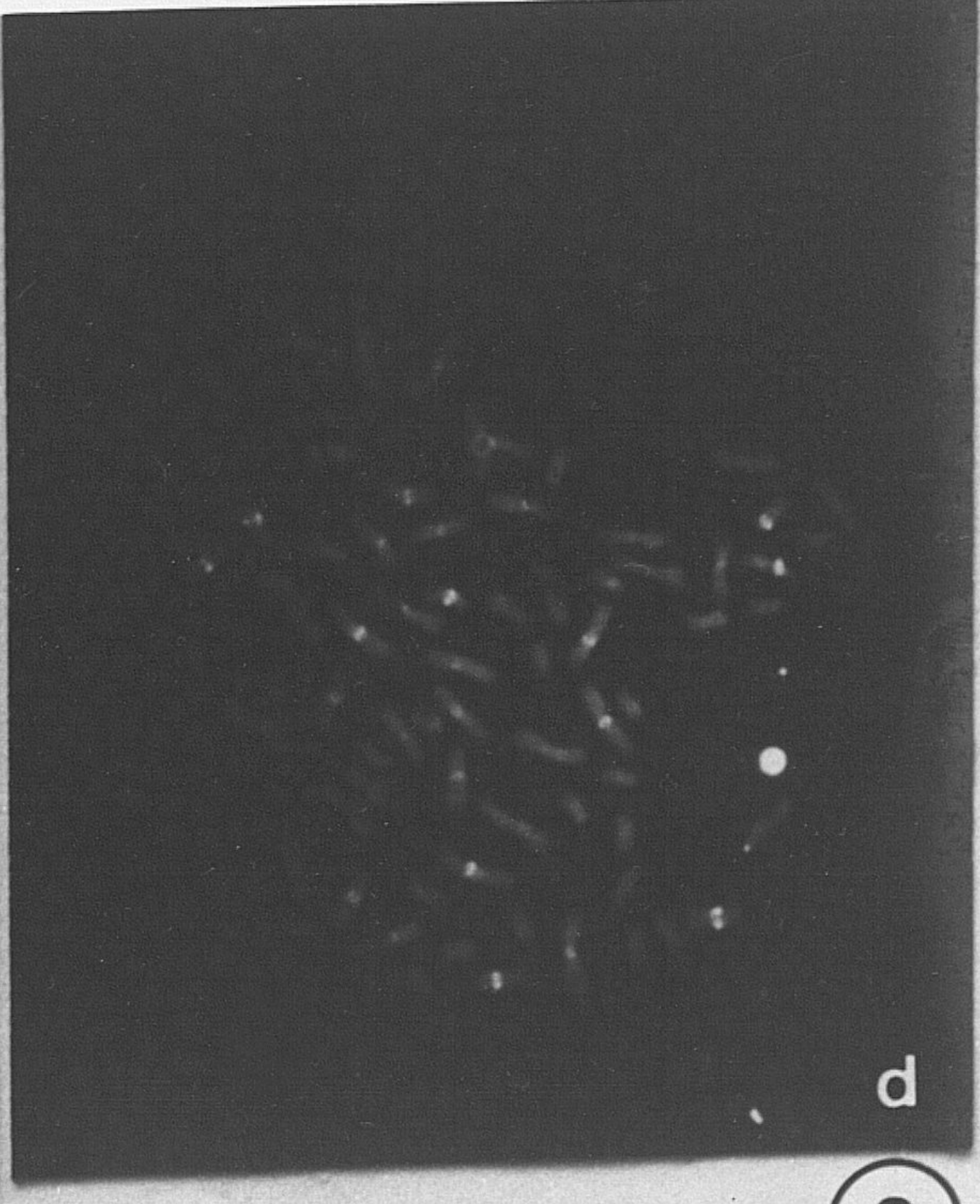
a



b



c



d

6

FIGURA 7.- Polimorfismos para el número y posición de los NORs en ejemplares triploides de *Salmo gairdneri*: a) metafase mitótica con dos NORs en combinación $1 M_1 + 1 M_2$, b) metafase con tres NORs en combinación $2 M_1 + 1 M_2$, c) metafase con tres NORs en combinación $2 M_1 + 1 M_3$, y d) metafase con cuatro NORs en combinación $2 M_1 + 1 M_2 + 1 M_3$. Las flechas señalan las zonas NORs. Para más detalle consultar el texto.

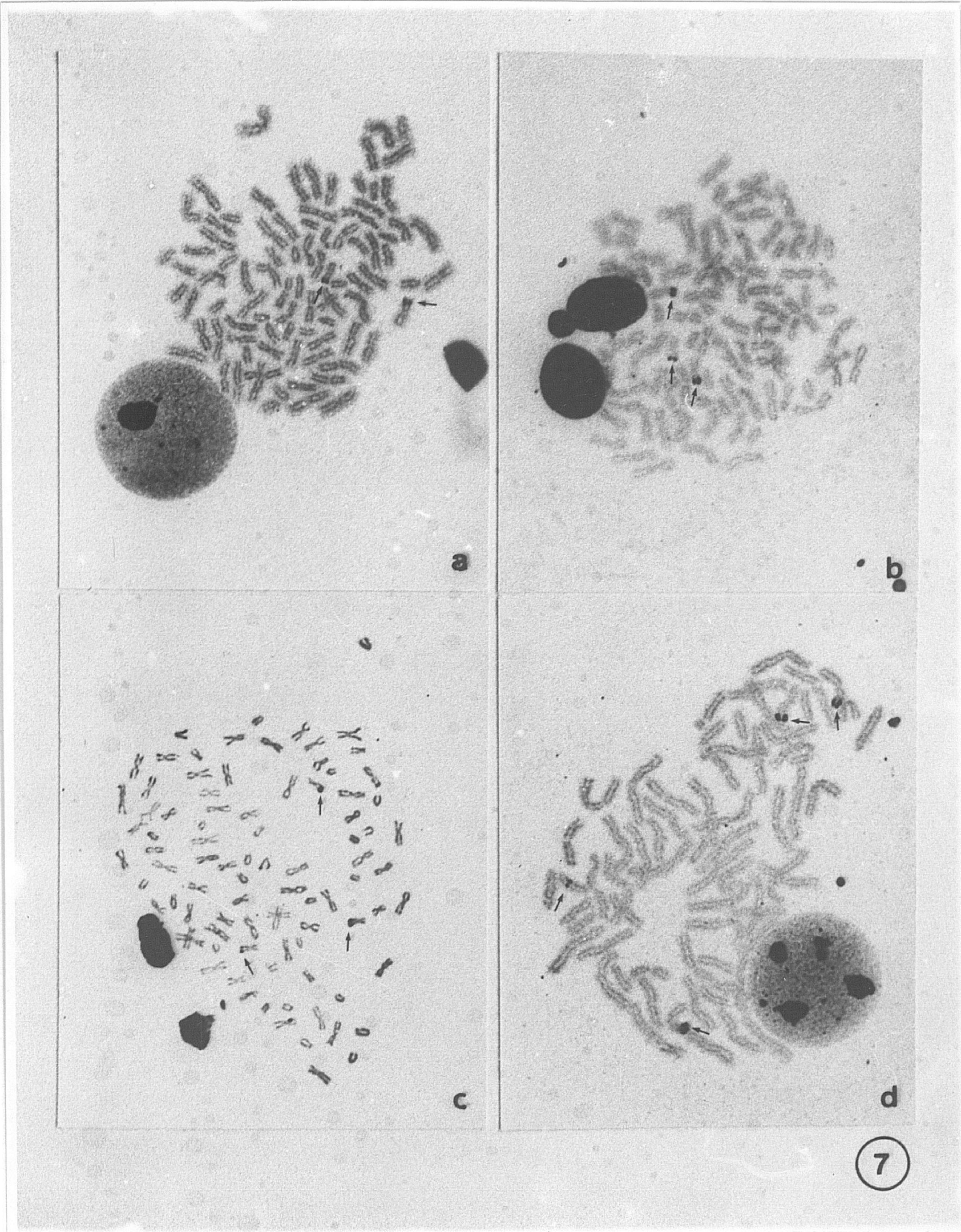
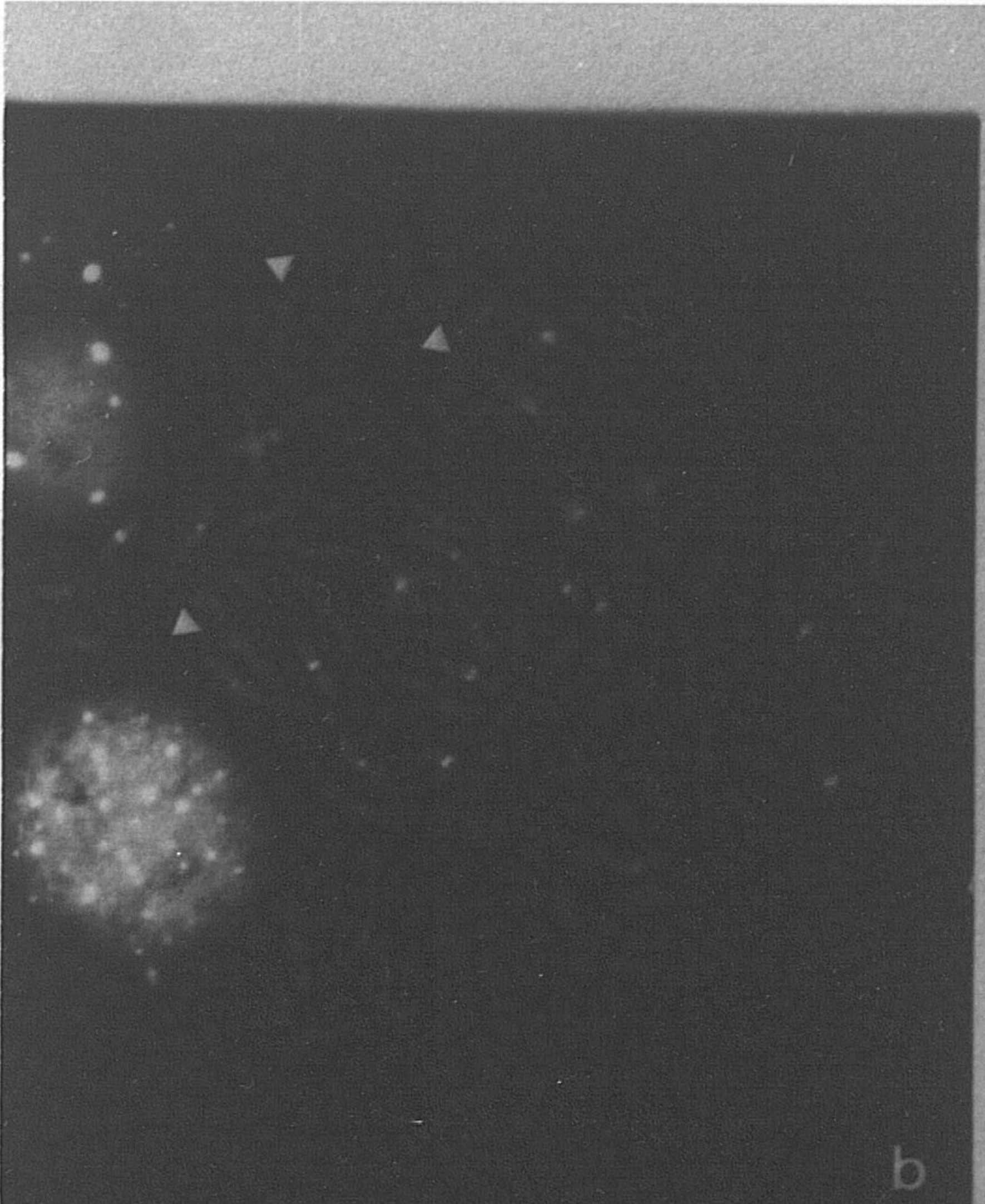
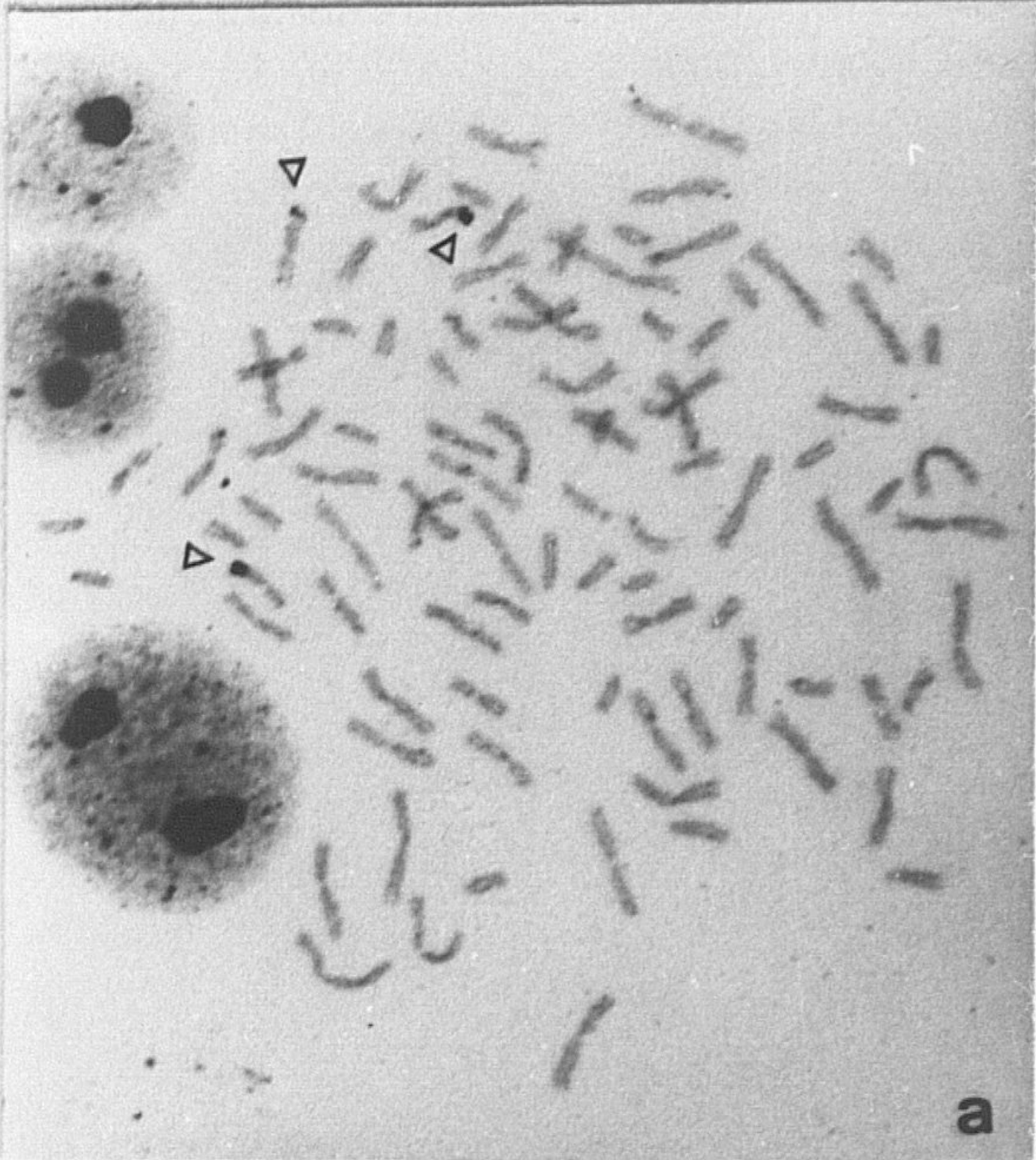
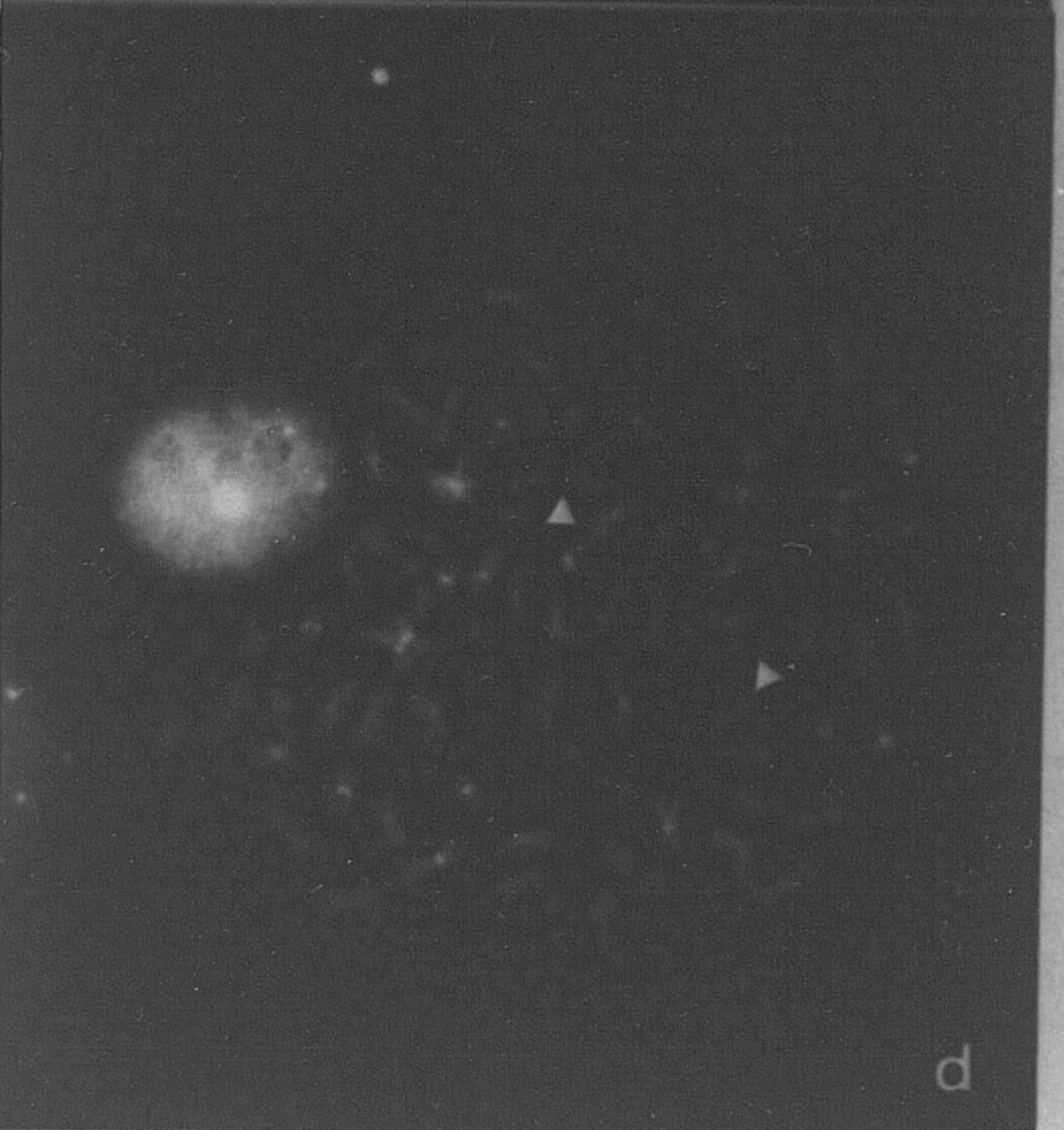
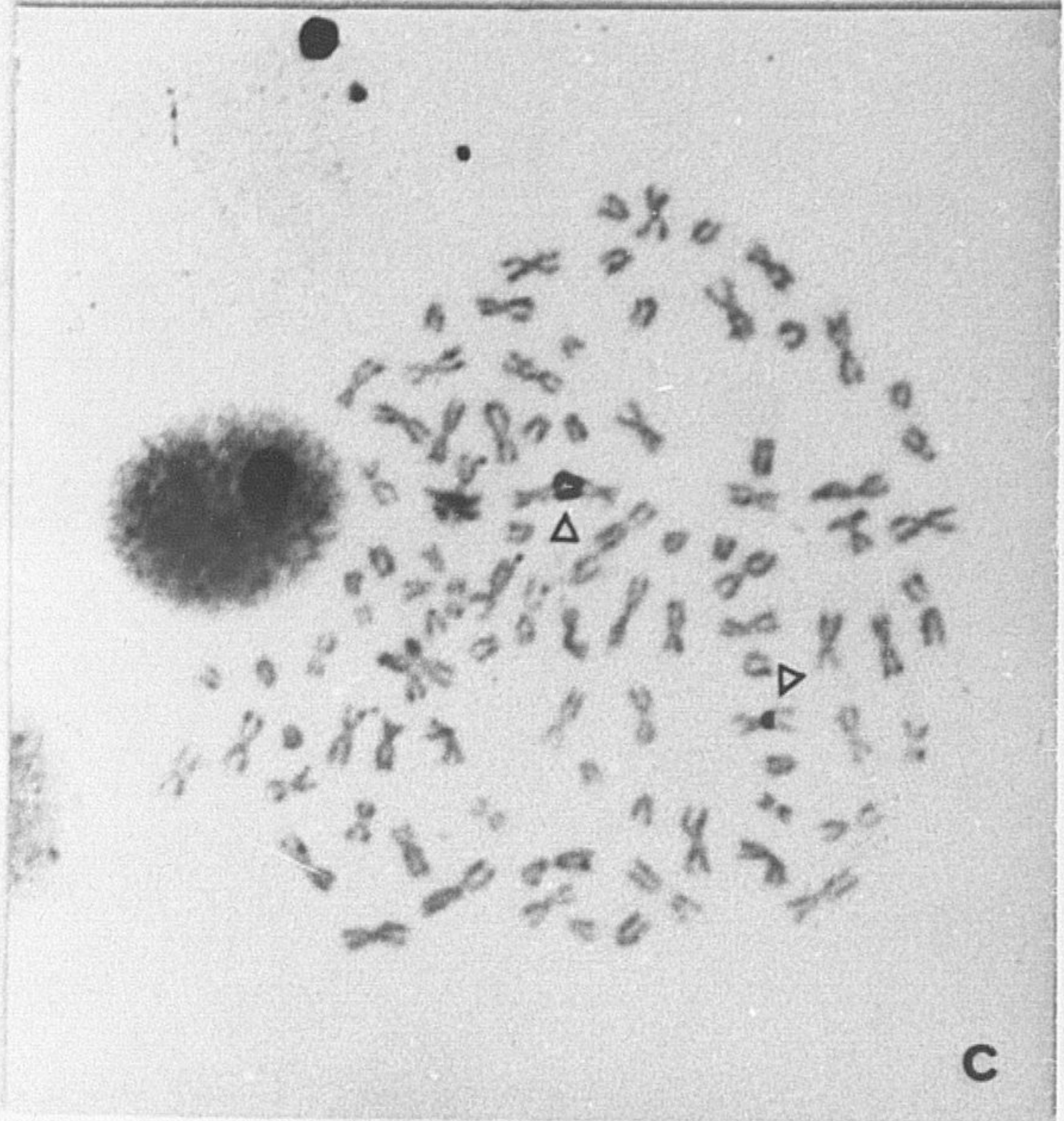


FIGURA 8.- Tinción secuencial NOR-DAPI de metafases triploides de trucha arco-iris. El citotipo $3 M_1$ (a) presenta tres cromosomas metacéntricos en los que las regiones NORs terminales son DAPI (b). El citotipo $2 M_1 + 1 M_3$ muestra dos cromosomas metacéntricos en los que las regiones NORs terminales se encuentran asociadas (c) y son DAPI (d), y un cromosoma metacéntrico con el NOR en posición pericentromérica (c) y DAPI neutro (d). Las flechas señalan las zonas NORs mencionadas



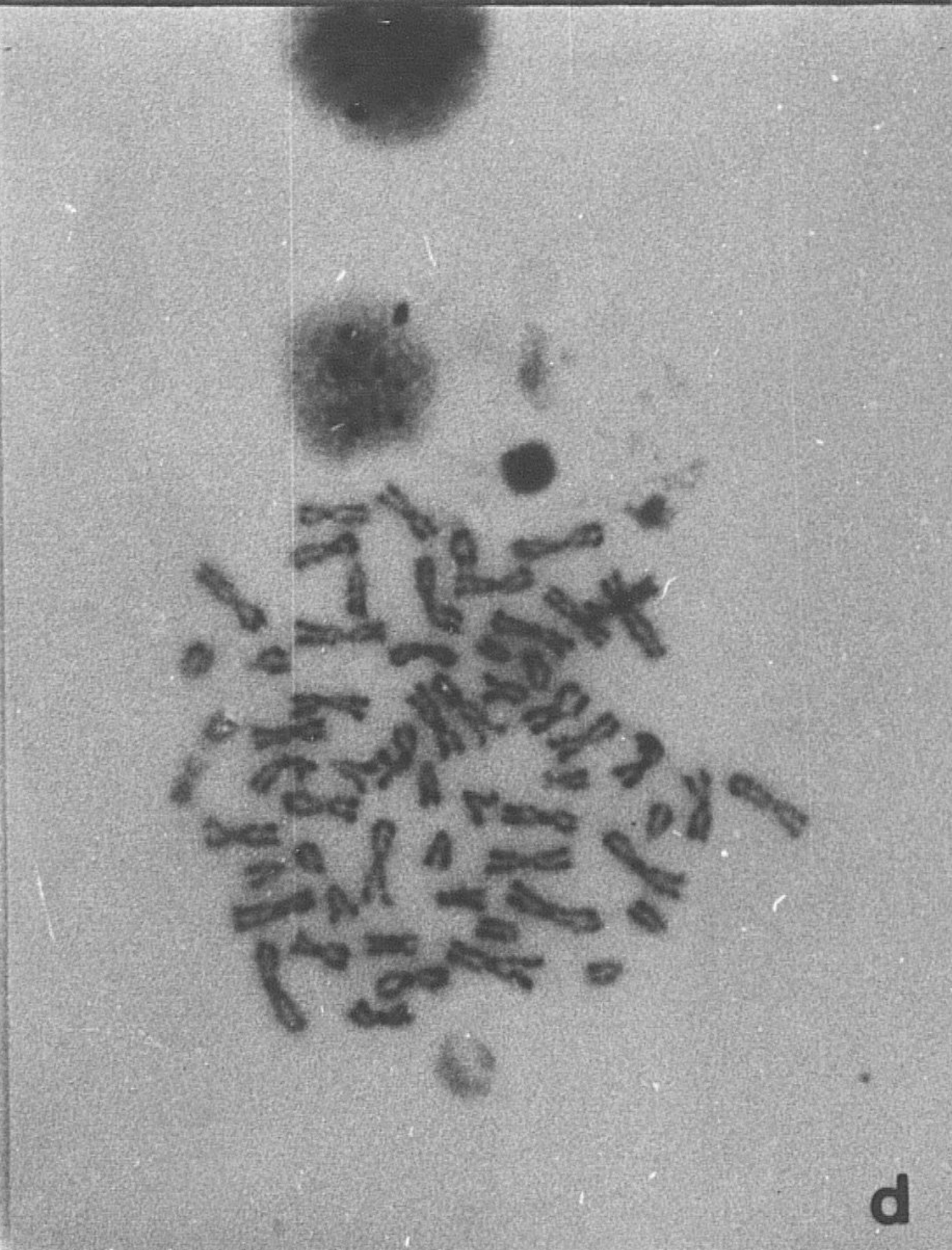
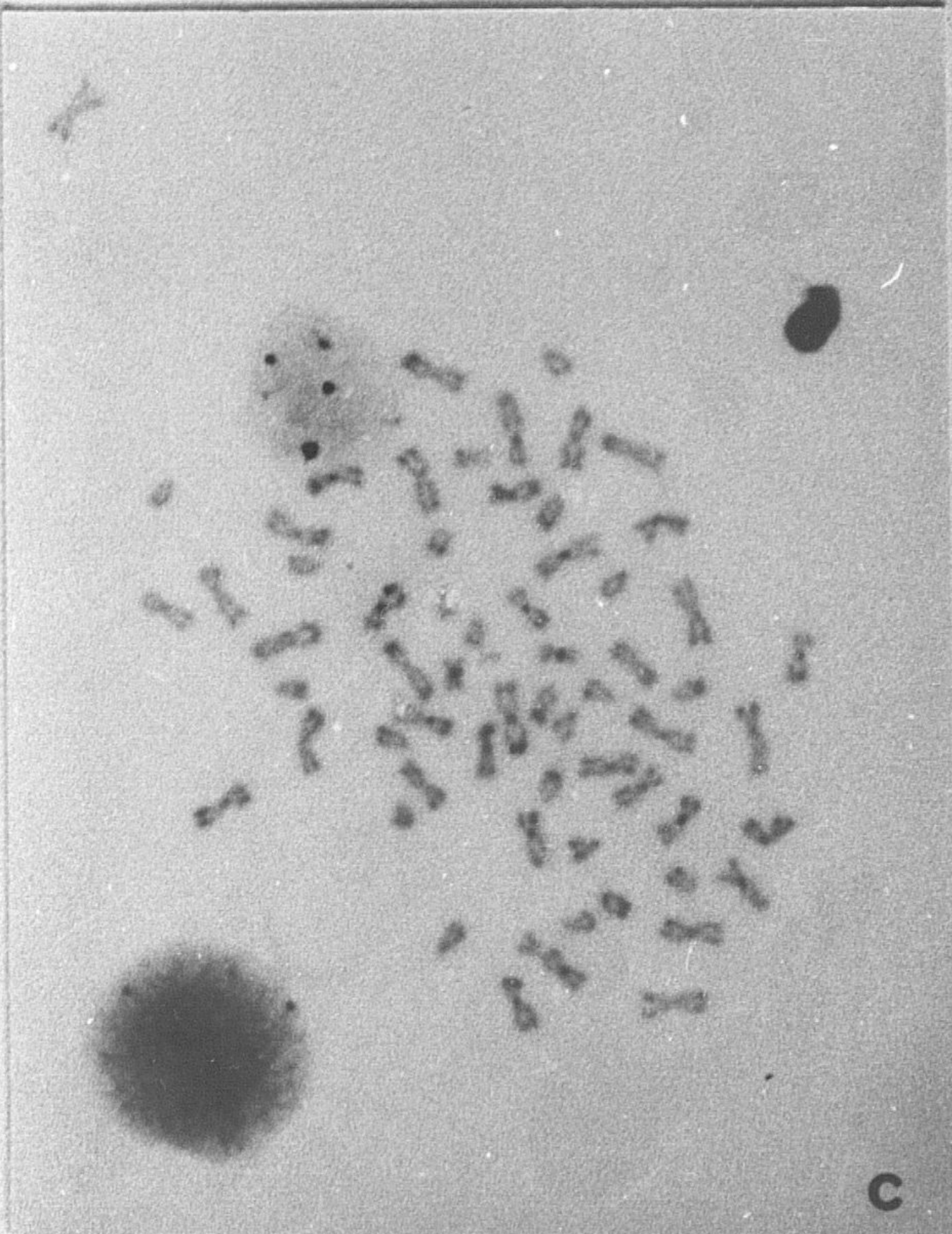
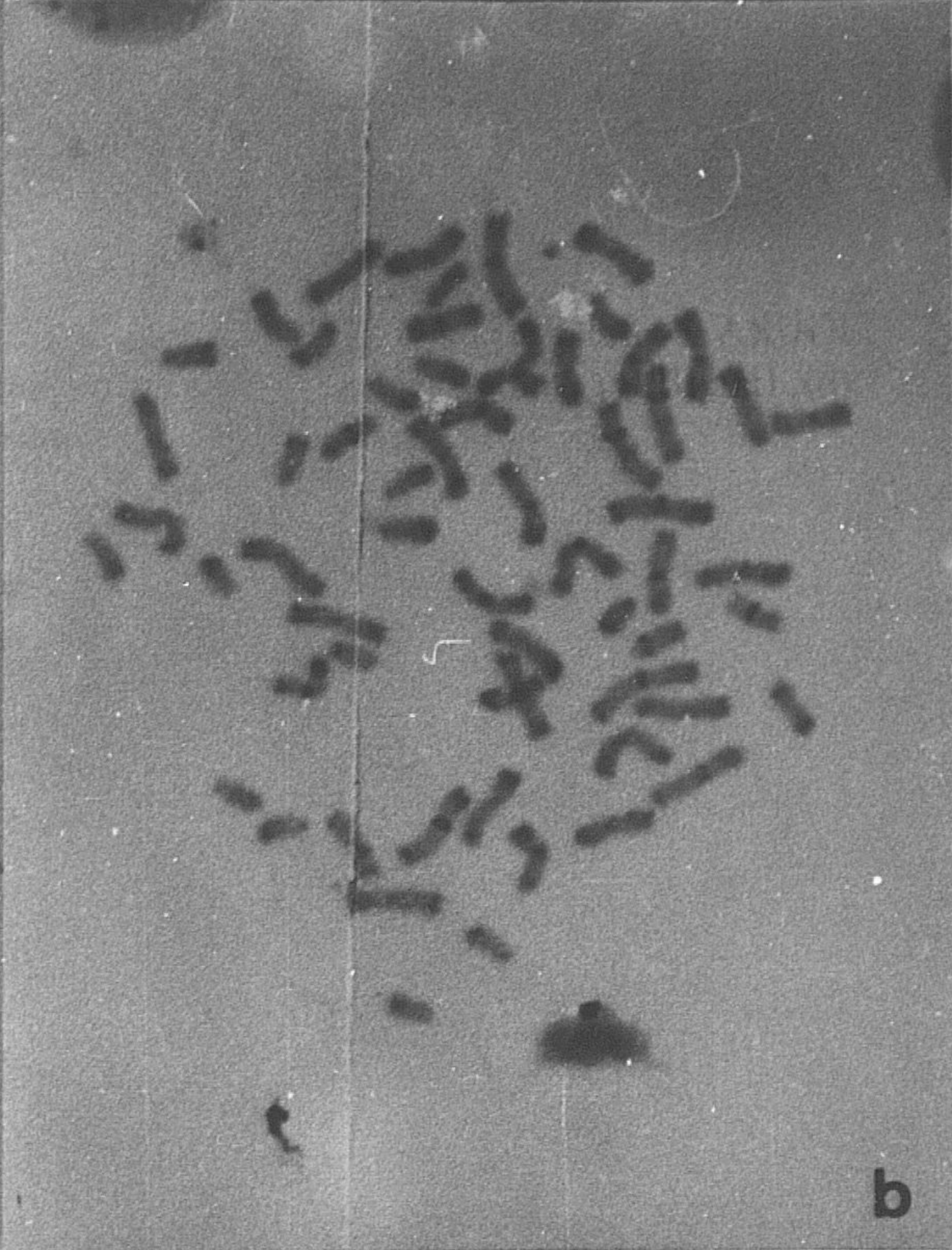
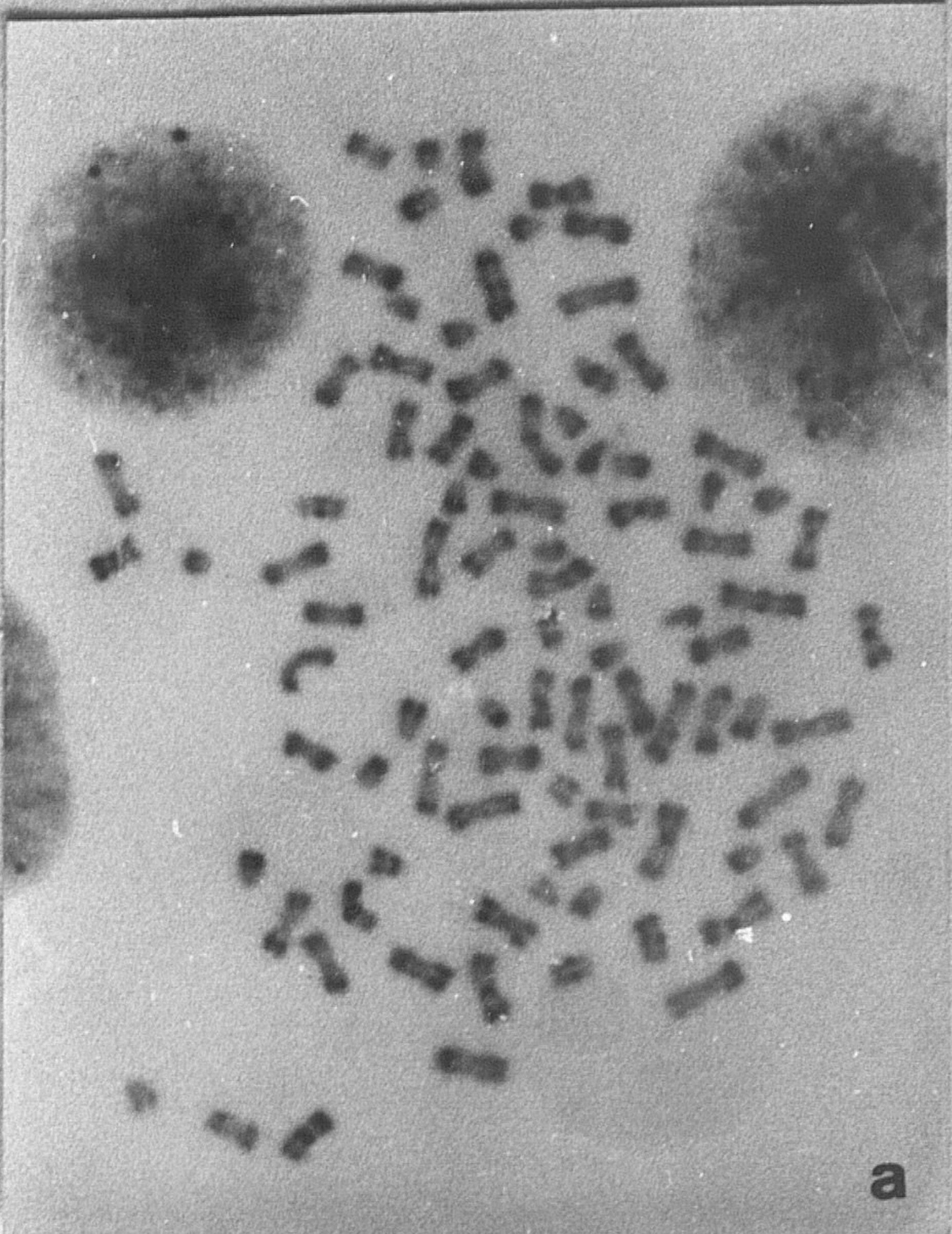
b



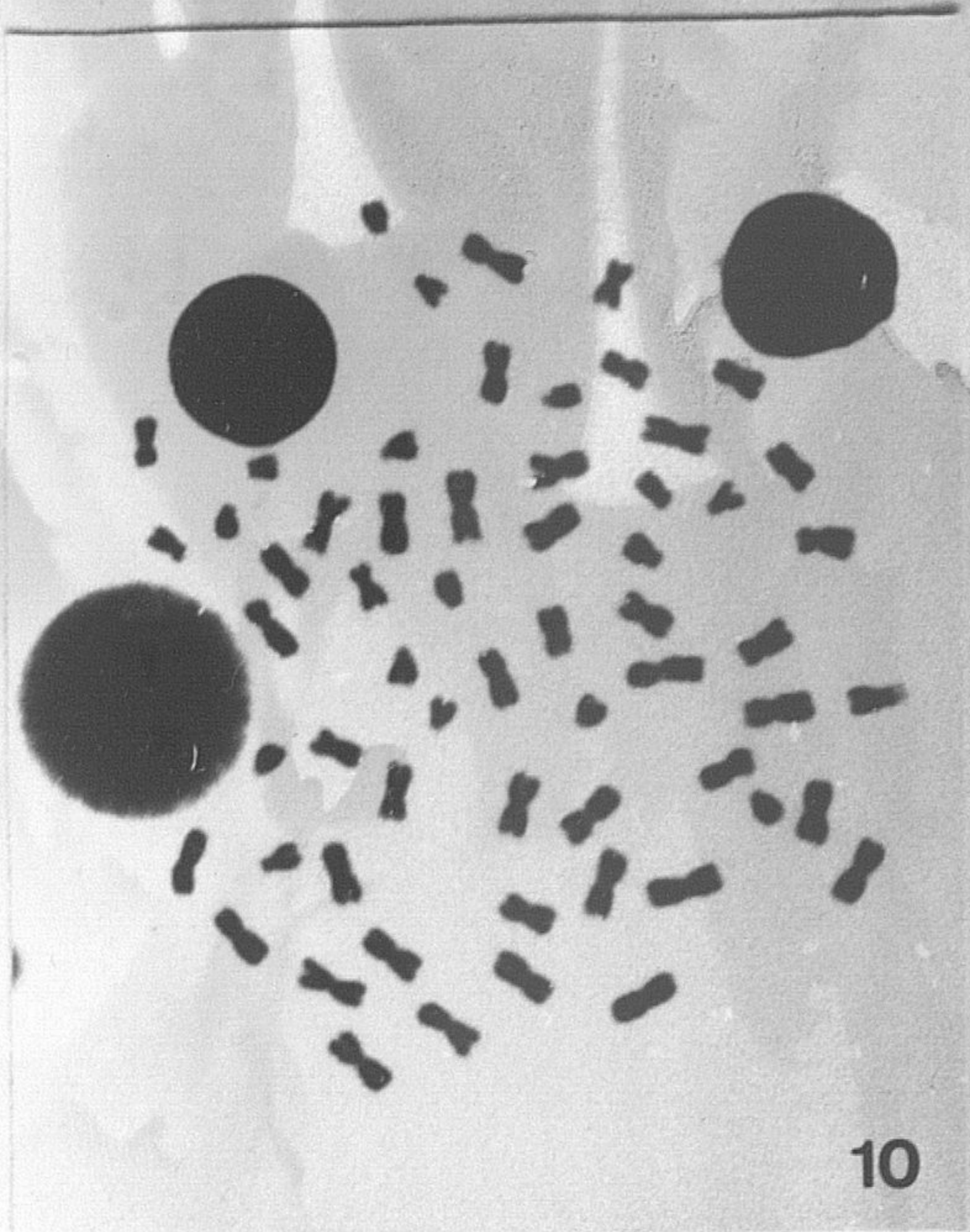
d

8

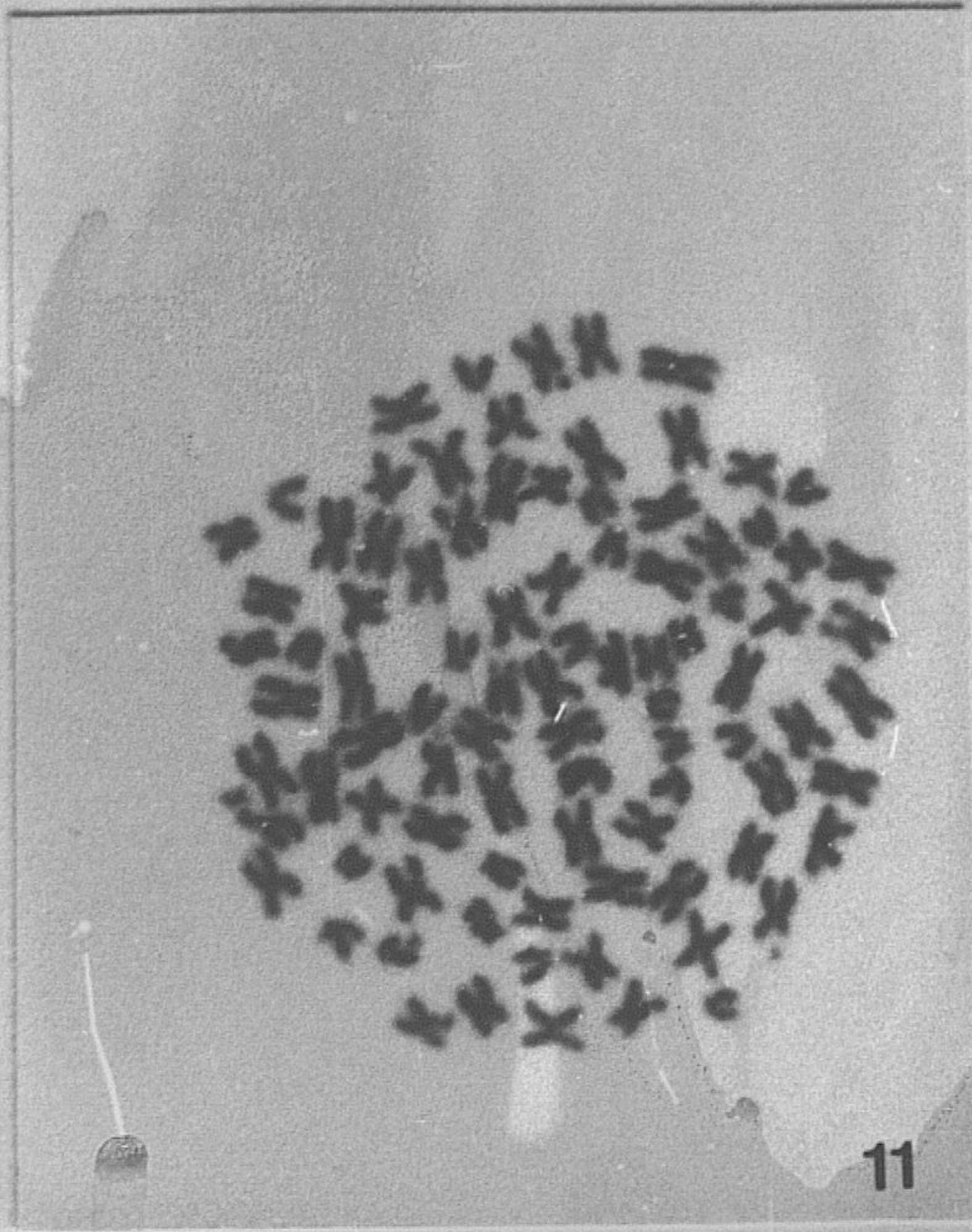
FIGURA 9.- Bando con distintos enzimas de restricción de cromosomas fijados en *Salmo gairdneri*, Alu I (a), Hinf I (b), Hae III (c) y Dra I (d). La figura a corresponde a un individuo triploide y las tres restantes a individuos diploides.



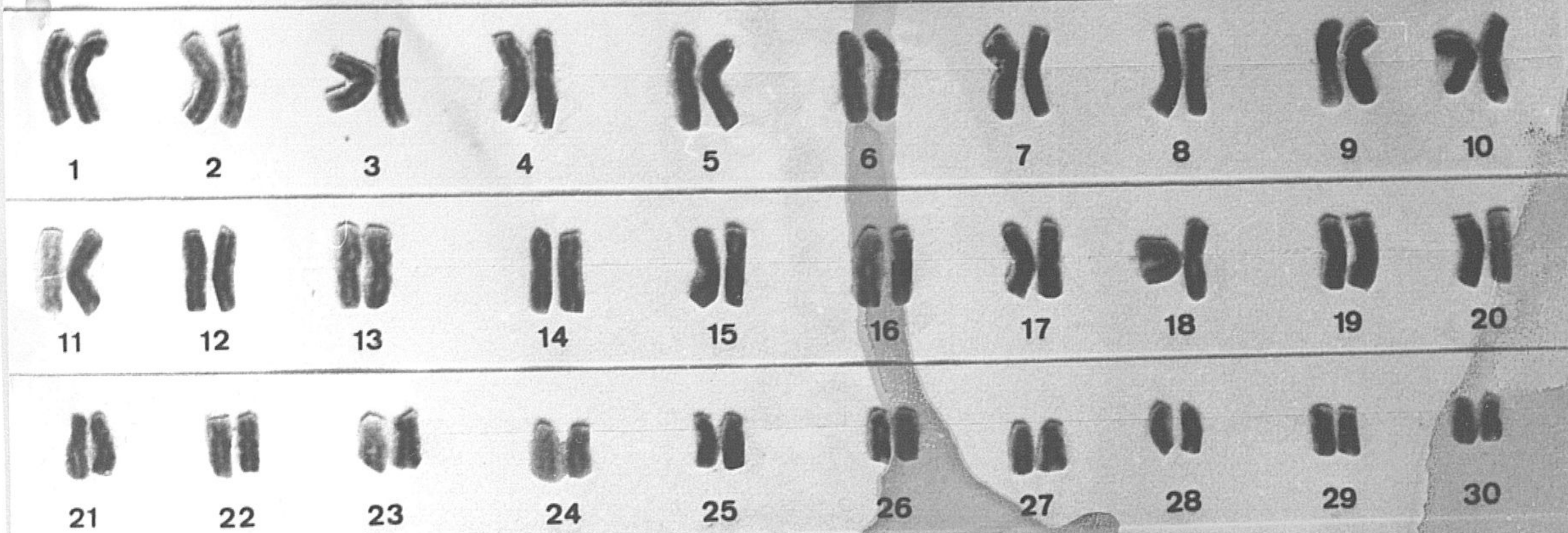
FIGURAS 10-12.- Metafasas mitóticas correspondientes a un individuo diploide ($2n=60$, Fig.10) y a otro triploide ($3n=90$, Fig.11) y cariotipo estándar ($2n=60$, Fig.12) en el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*).



10



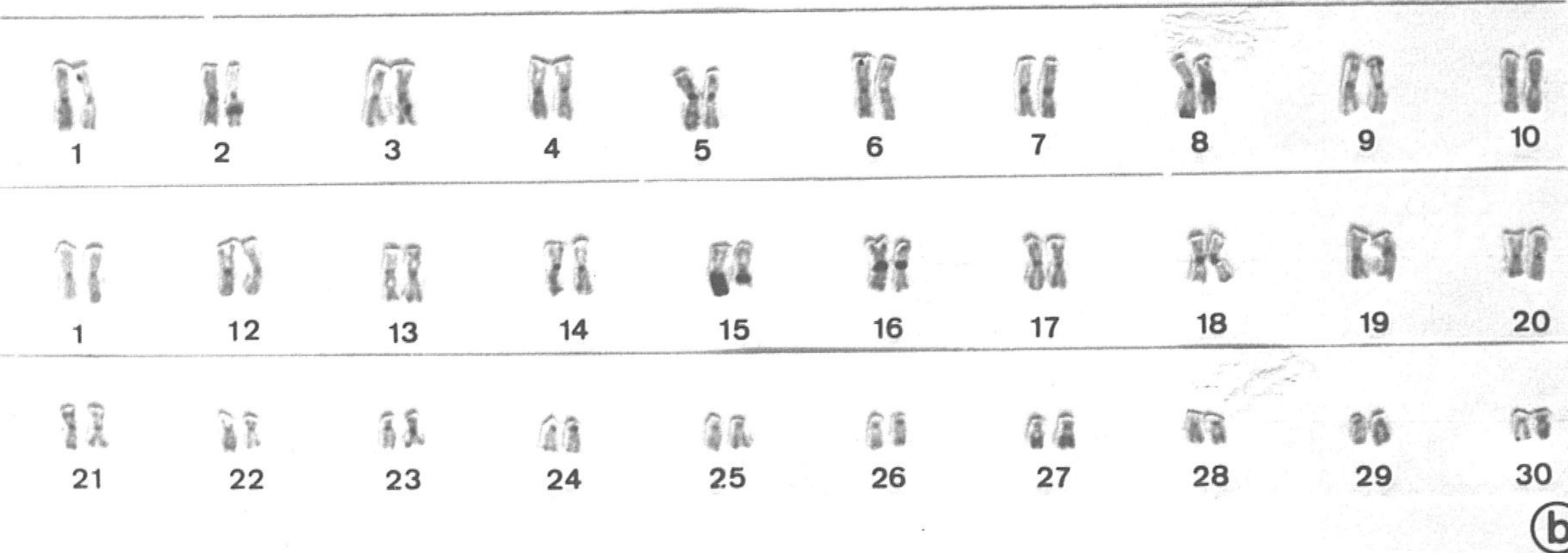
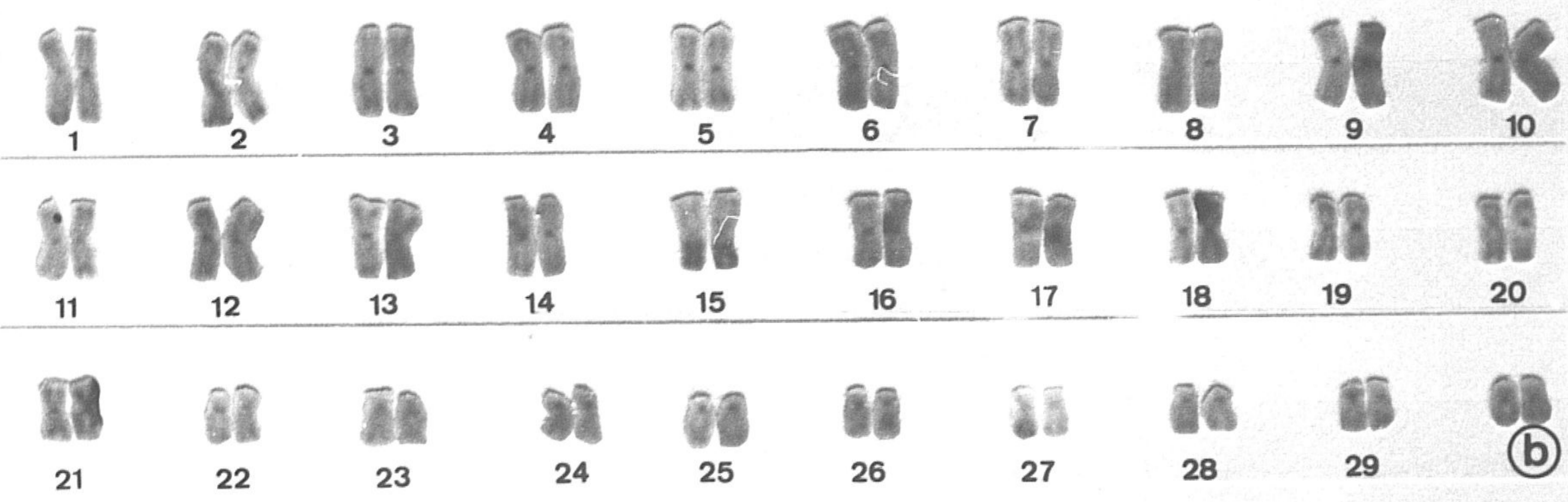
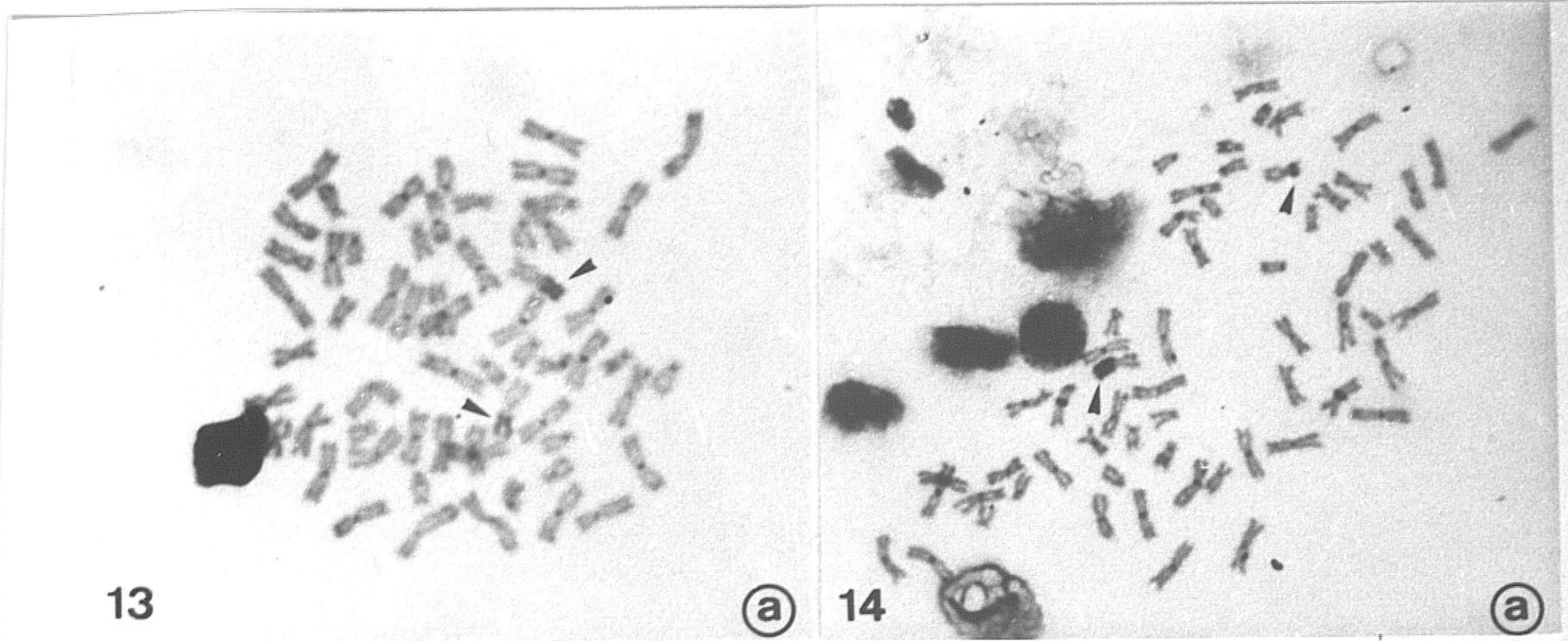
11



10 μ

12

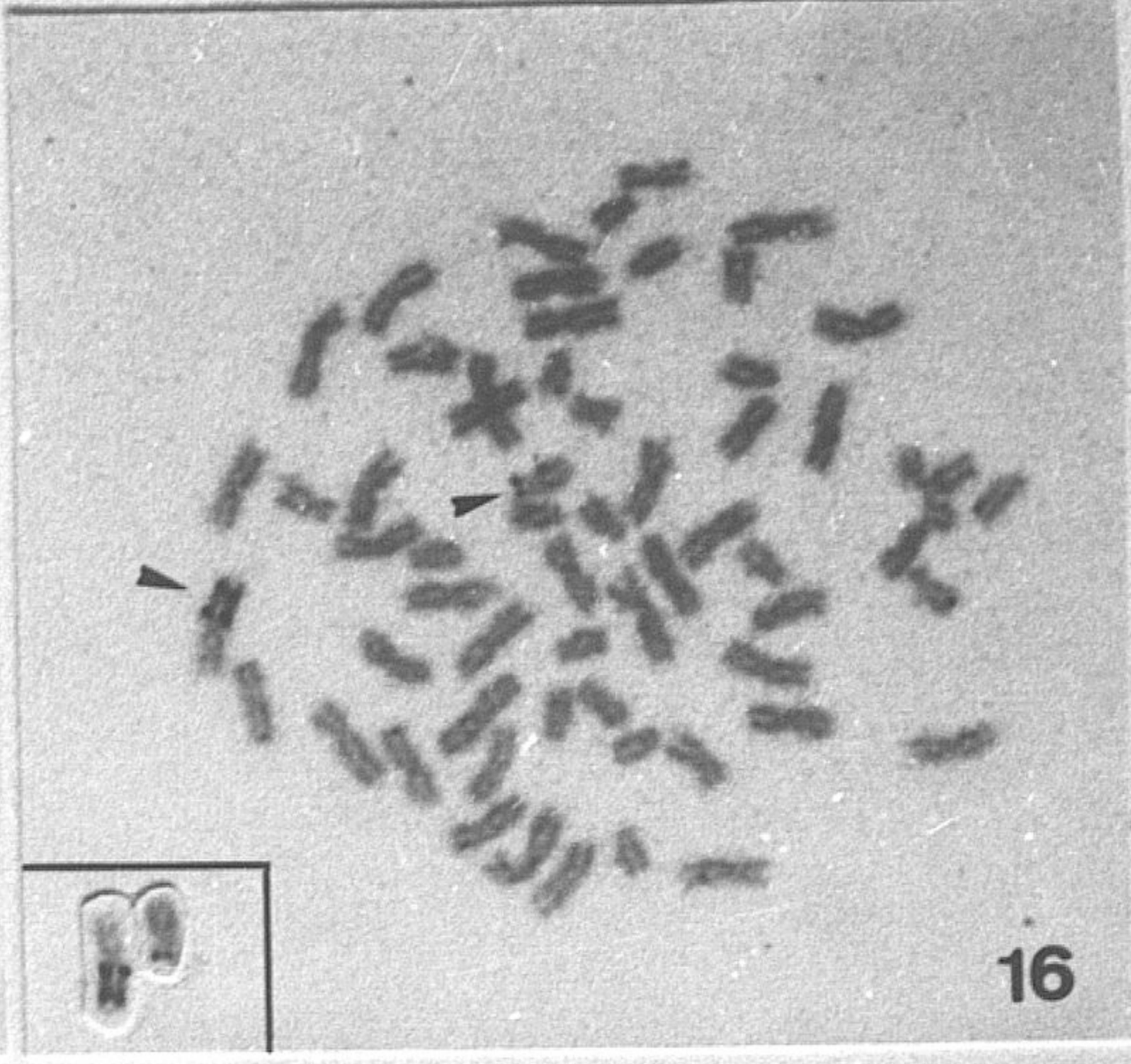
FIGURAS 13 Y 14.- Bando C y cariotipo correspondiente de dos individuos distintos de salmón coho, uno homocigoto estándar (Fig.13a y b) y otro heterocigoto para una deleción en el par 15 (Fig.14a y b). Nótese en ambas figuras las regiones C⁺ del par 15 (flechas).



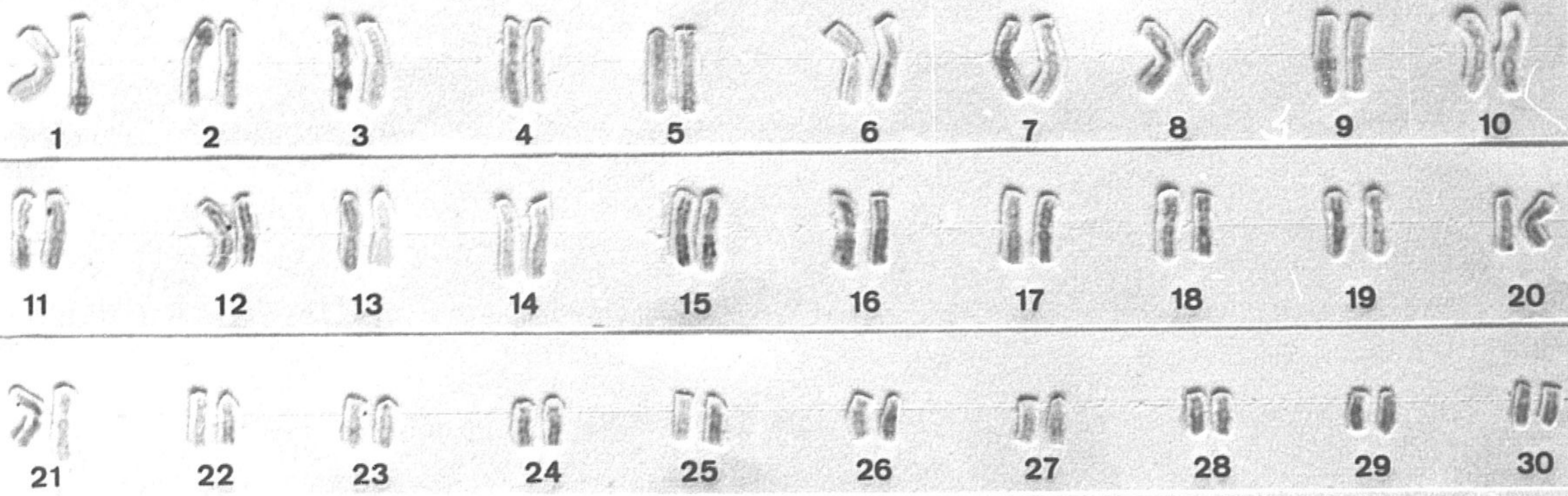
FIGURAS 15-17.- Metafasas mitóticas de *Oncorhynchus kisutch* teñidas con nitrato de plata pertenecientes a un individuo homocigótico (Fig.15) y otro heterocigótico (Fig.16) para la posición de los NORs (flechas), y cariotipo del primero de ellos (Fig.17). En este último se observa la localización de los NORs en el par 15.



15



16

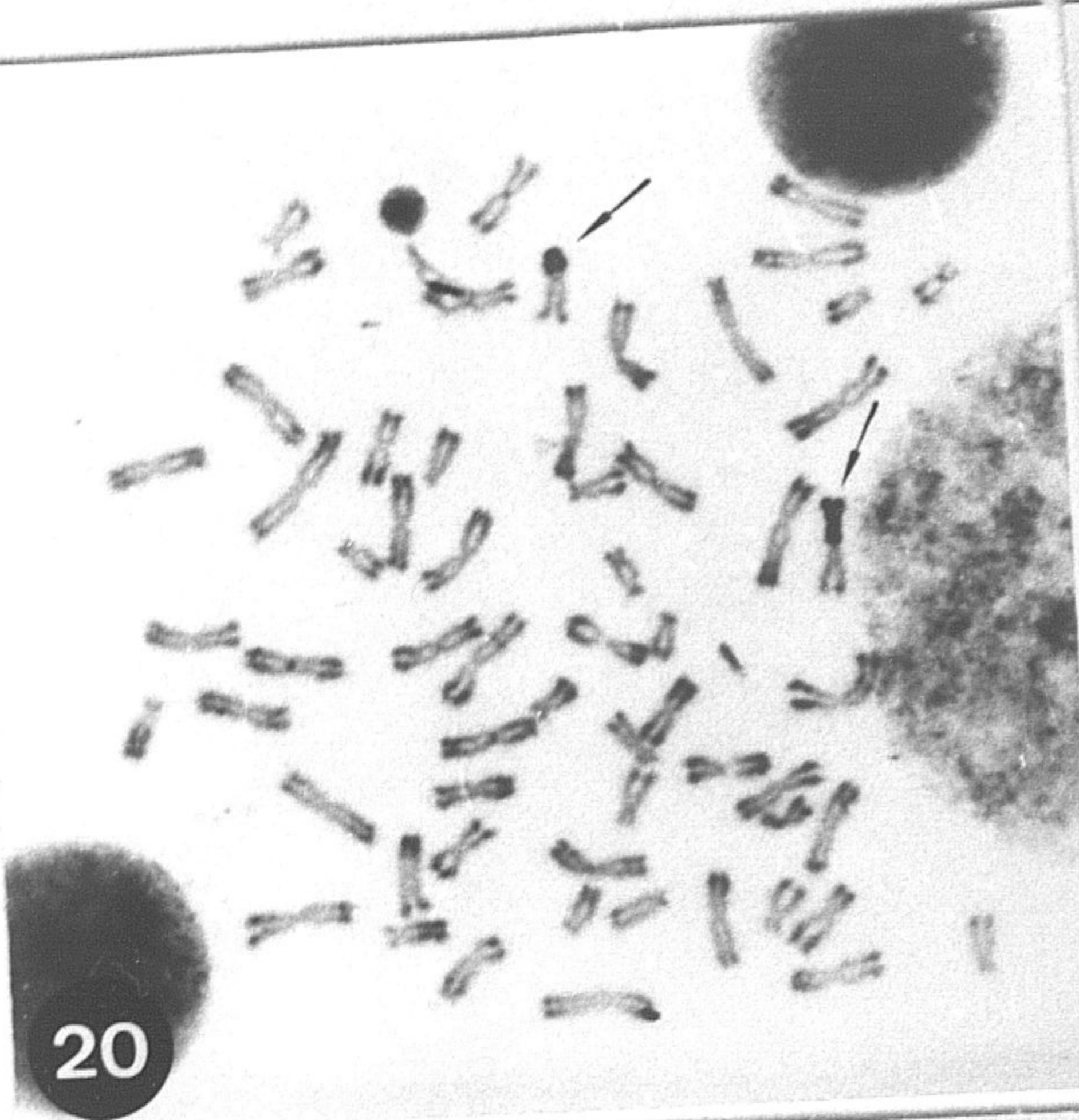


17

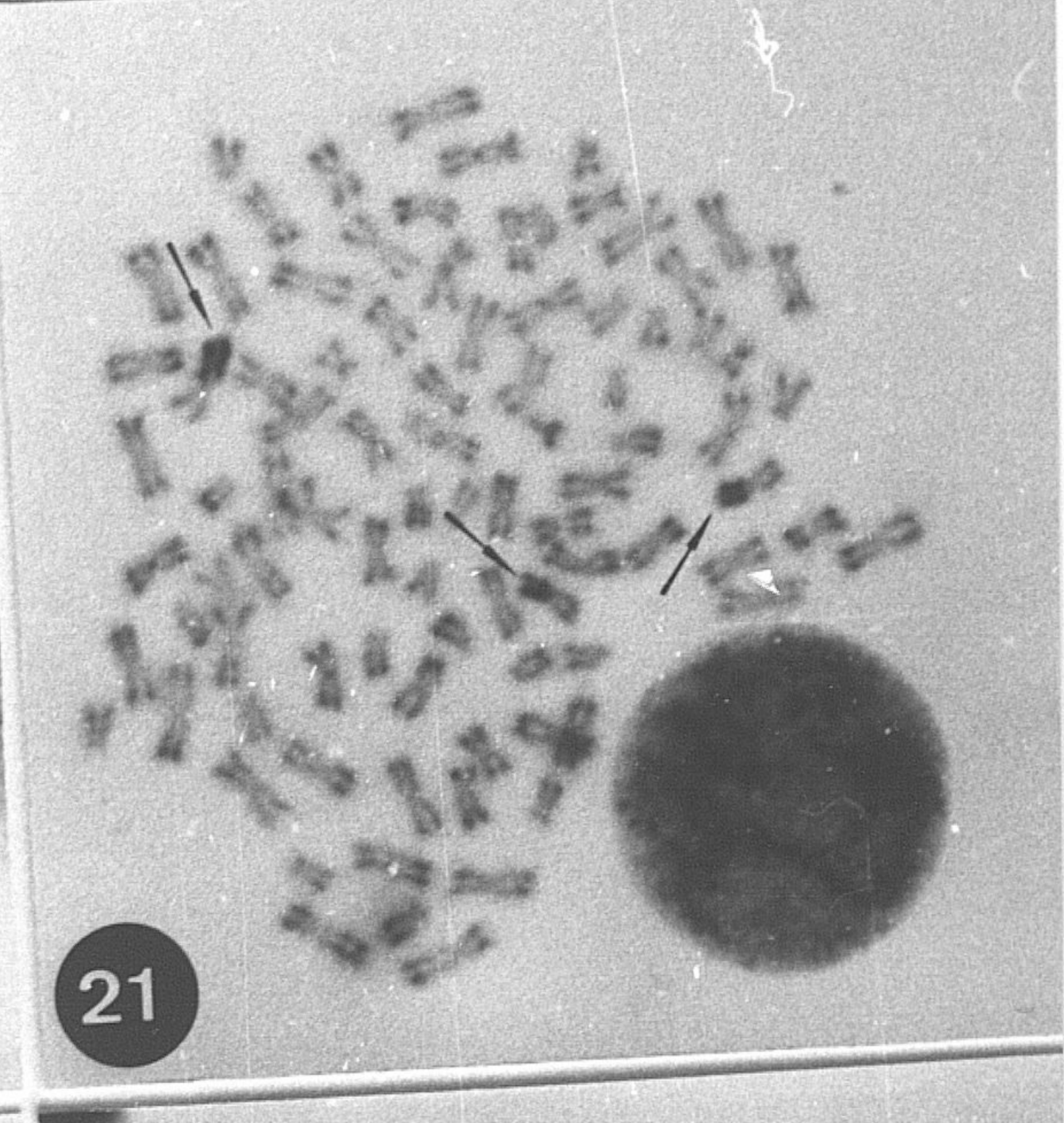
FIGURA 18.- Tinción secuencial NOR(a) - CMA/DA(b) en el salmón coho. Nótese que las zonas NORs son CMA⁺ (flechas pequeñas) y que éstas a su vez, flanquean la zona NOR en algún caso (flechas grandes).

FIGURA 19.- Tinción secuencial NOR(a) - DAPI/AMD(b) en una metafase triploide de salmón coho. Se aprecia el comportamiento neutro para el DAPI de las zonas NOR (flechas) y una zona NOR activa que aparece *de novo* en los triploides.

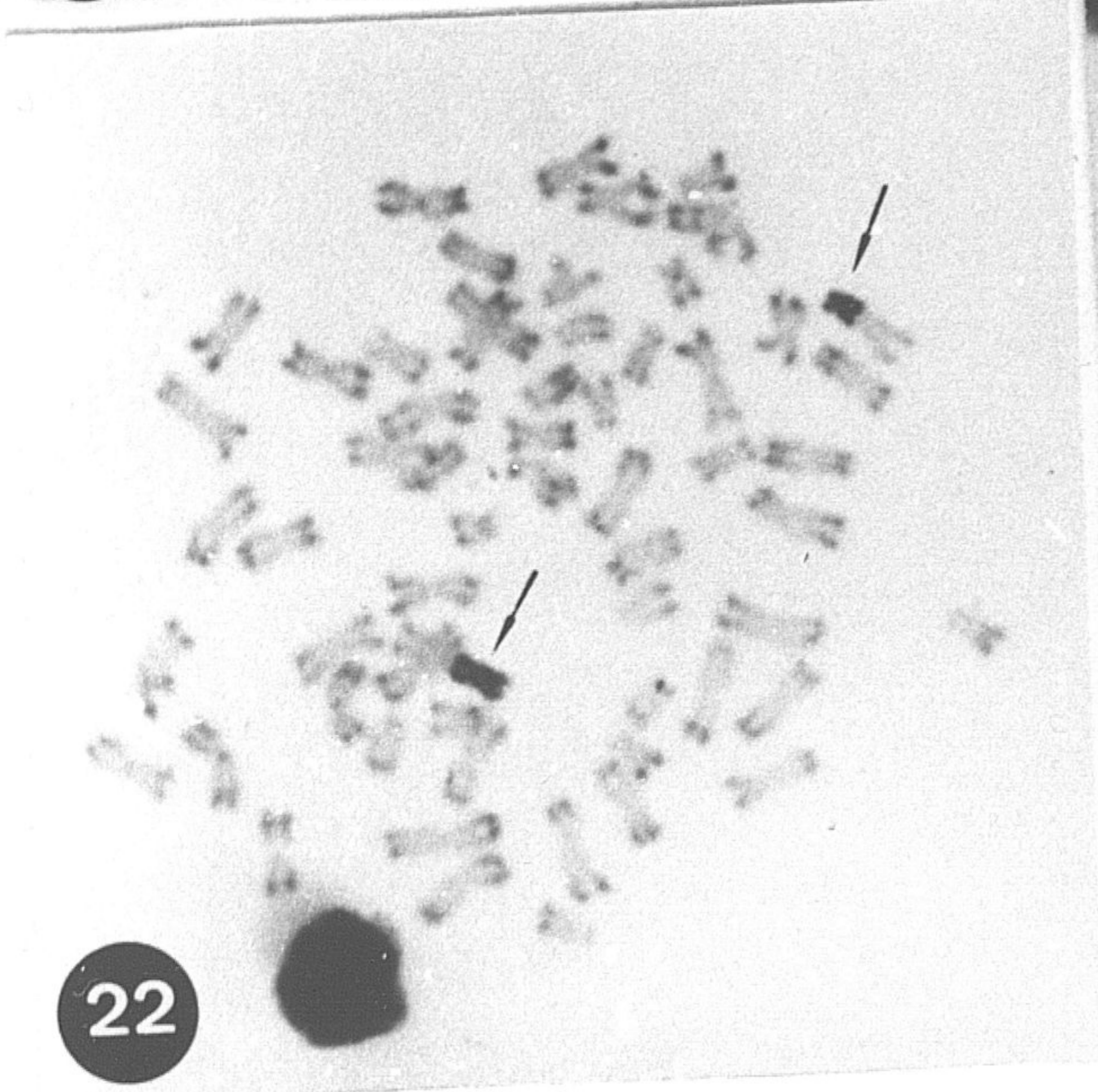
FIGURAS 20-23.- Bando cromosómico con distintas endonucleasas de restricción en el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), Alu I (Fig.20, metafase diploide), Mbo I (Fig.21, metafase triploide), Rsa I (Fig.22, metafase diploide), y Hae III (Fig.23, metafase diploide). Las flechas señalan las regiones resistentes o digeridas diferencialmente con alguno de los enzimas.



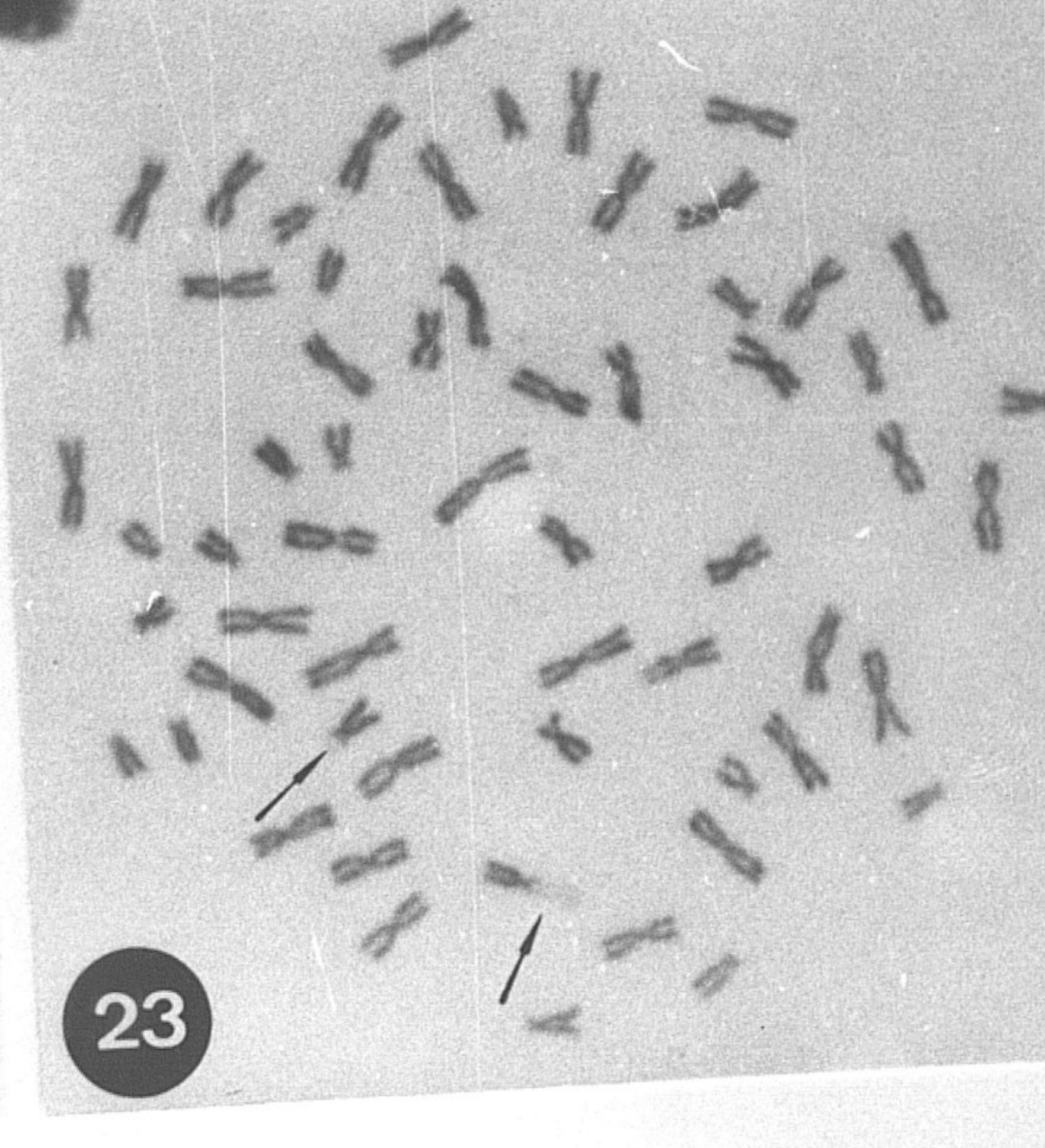
20



21



22



23

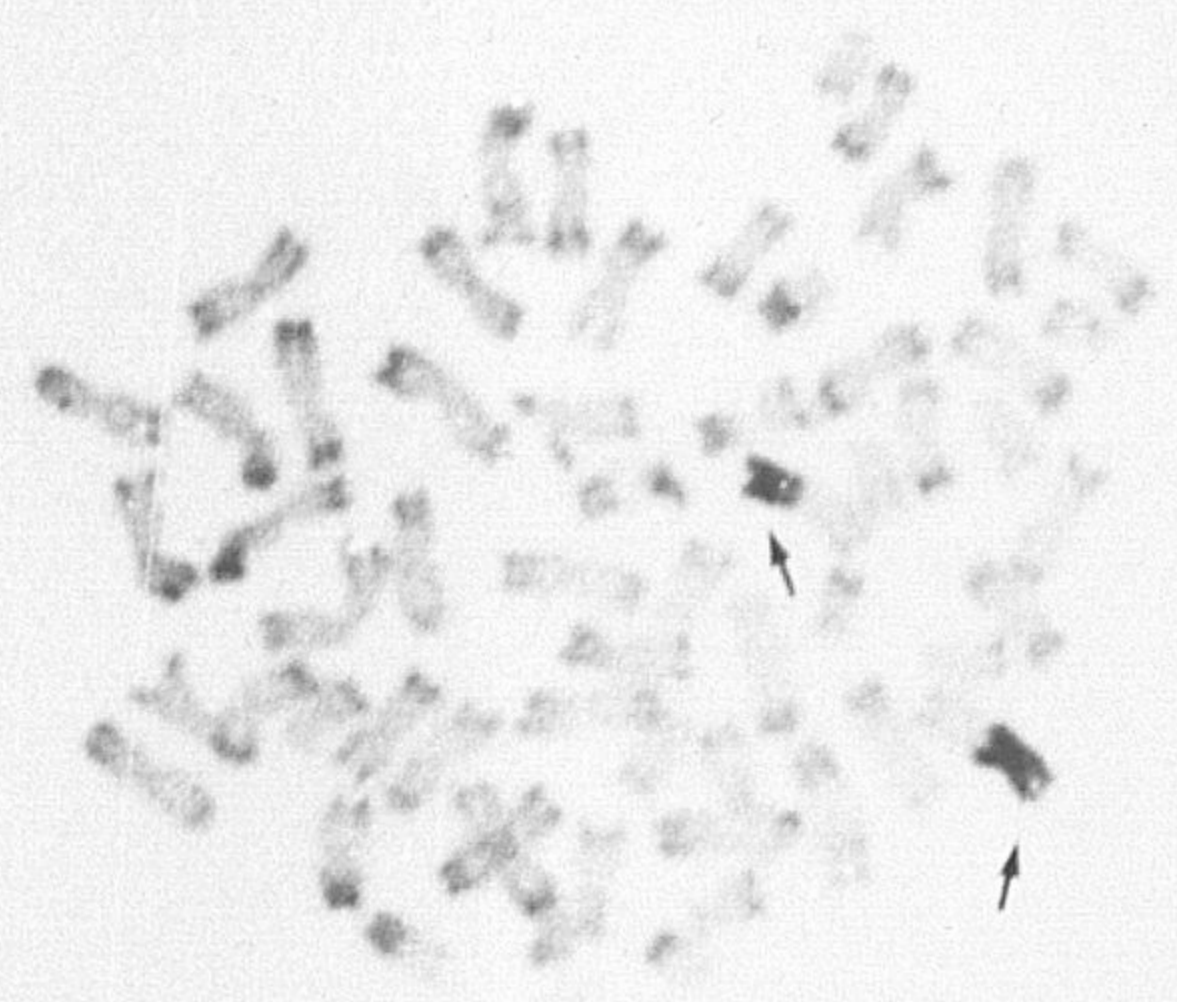
FIGURA 24.- Digestión con Alu I y tinción con Giemsa (a) y CMA₃ (b) de cromosomas fijados de salmón coho.

FIGURA 25.- Digestión con Hae III y tinción con Giemsa (a) y CMA₃ de cromosomas fijados de salmón coho.

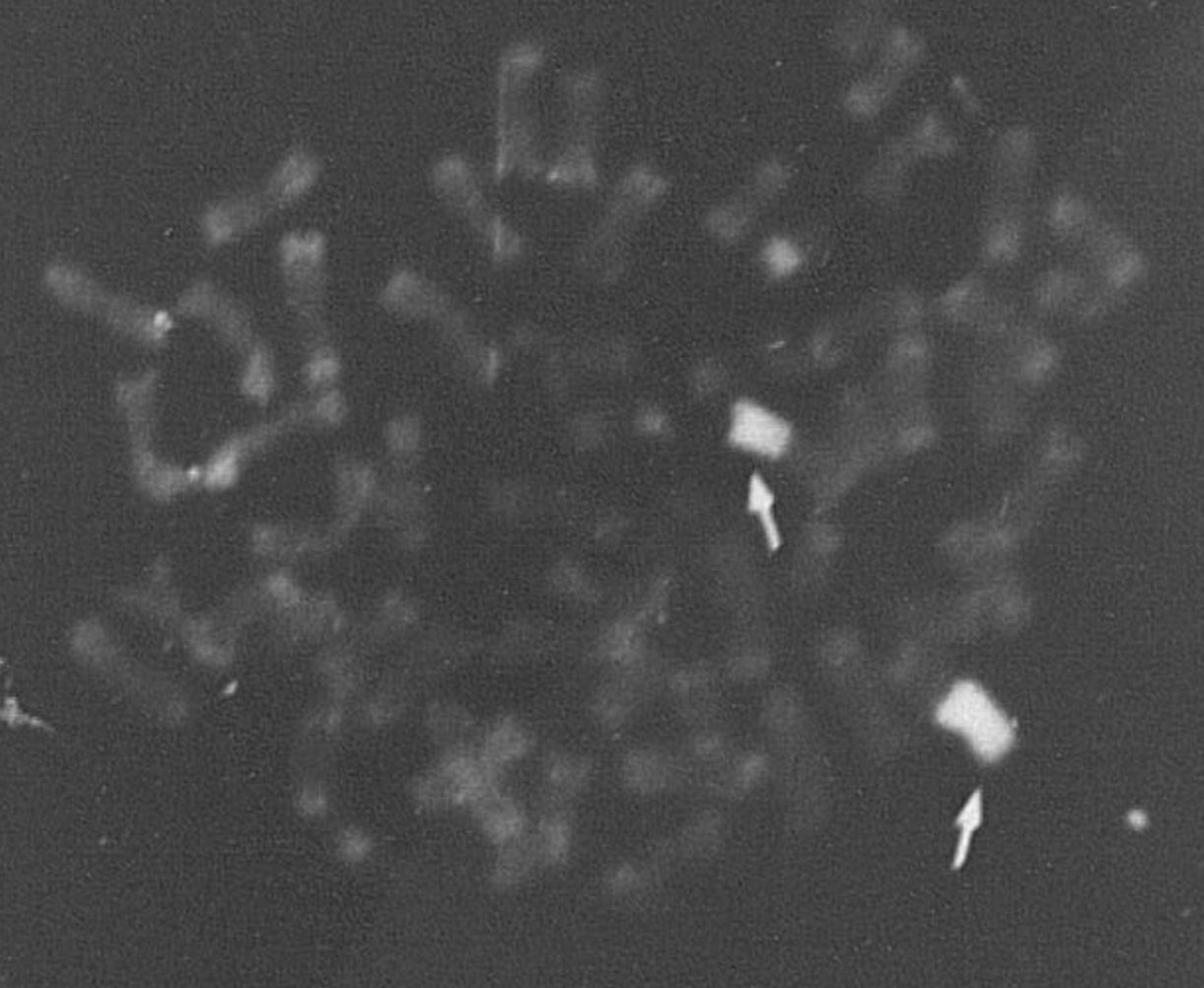
Nótese la diferencia entre ambas figuras en lo que respecta a las zonas de heterocromatina asociada a los NORs (flechas)

FIGURAS 26 Y 27.- Digestión con dos endonucleasas de restricción, Alu I (Fig.26) y Hae III (Fig.27) de metafases pertenecientes a individuos triploides de salmón coho. Las flechas señalan el distinto patrón de digestión de las regiones heterocromáticas asociadas a los NORs.

24



a

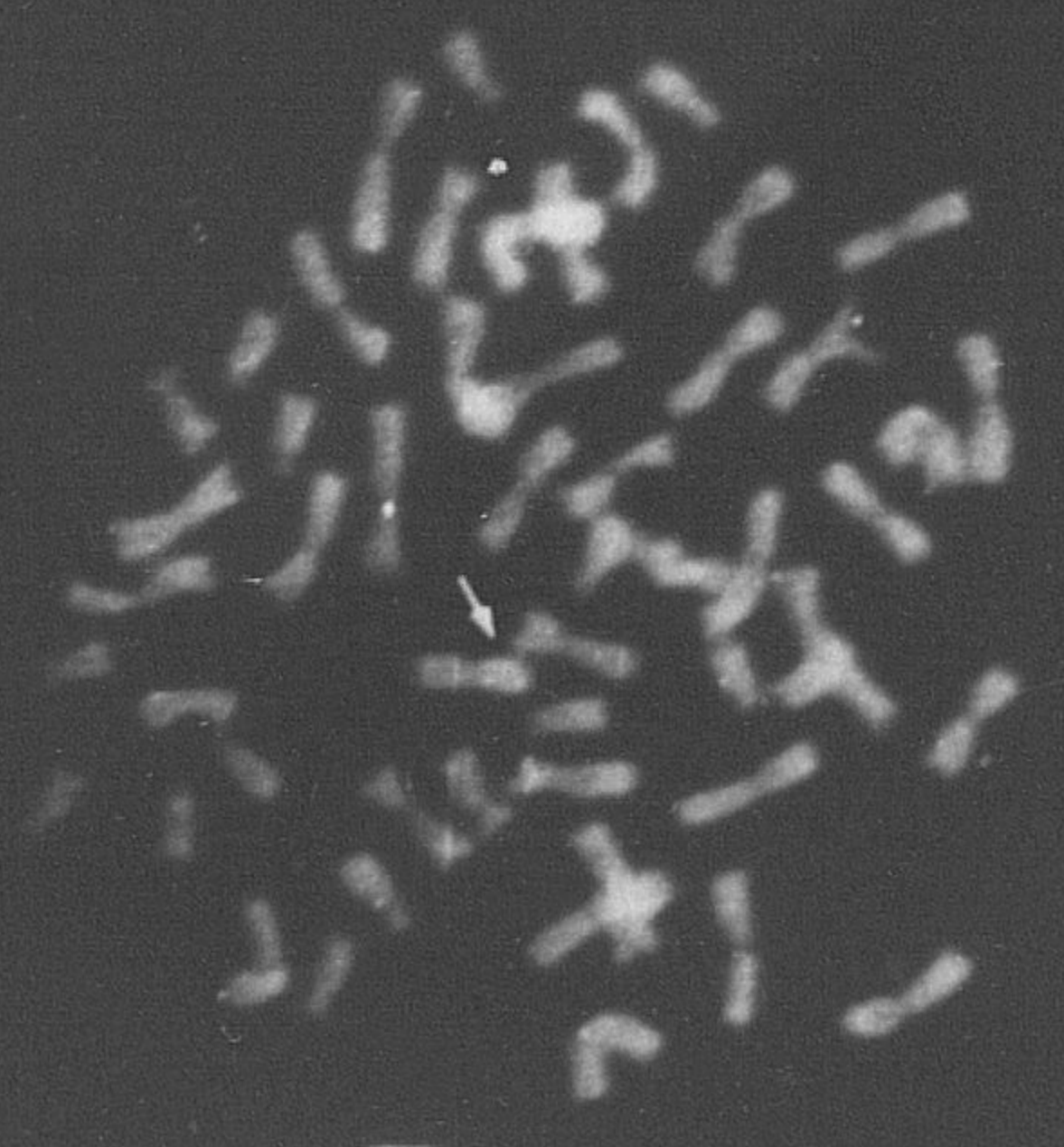


b

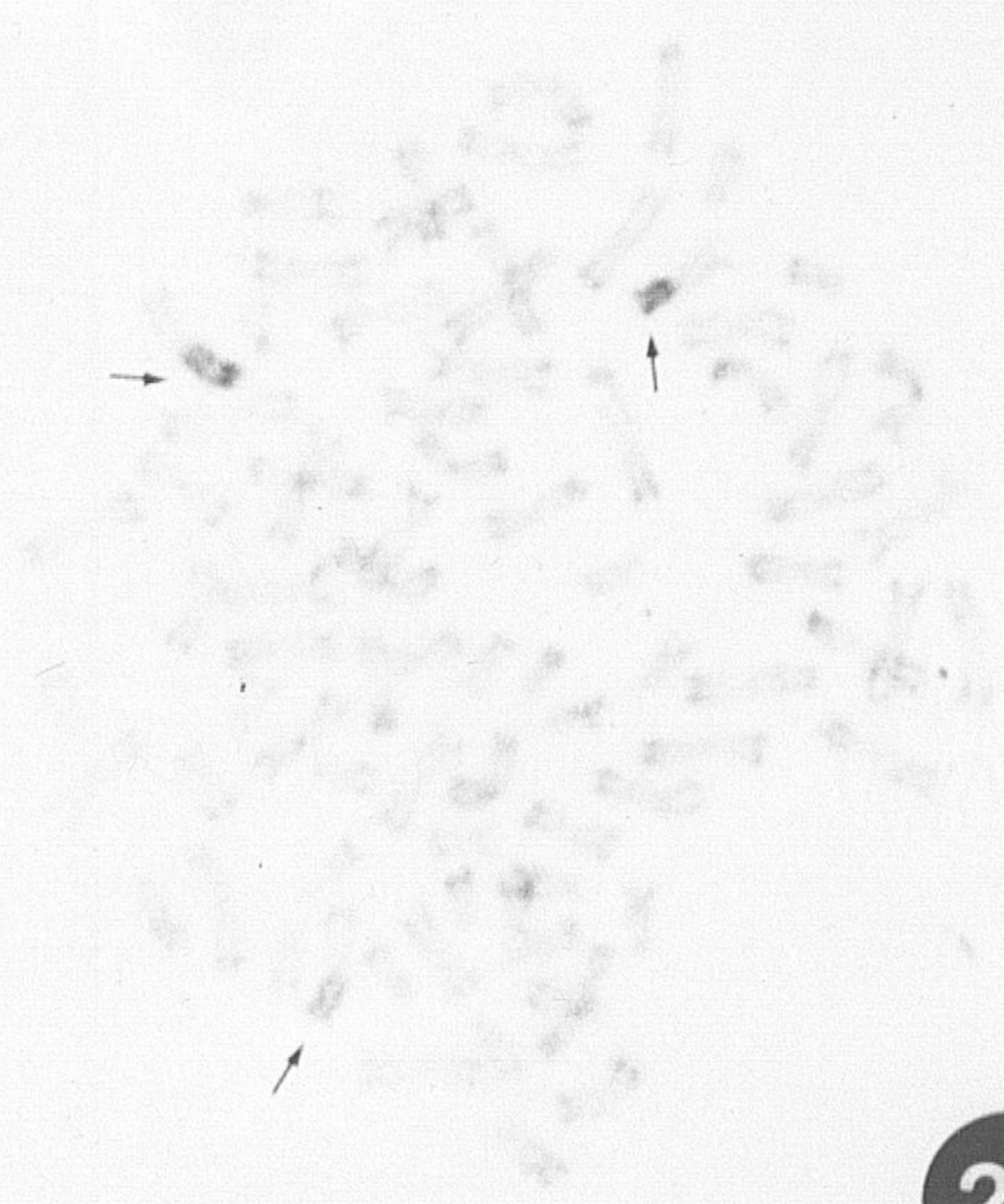
25



a



b



26



27

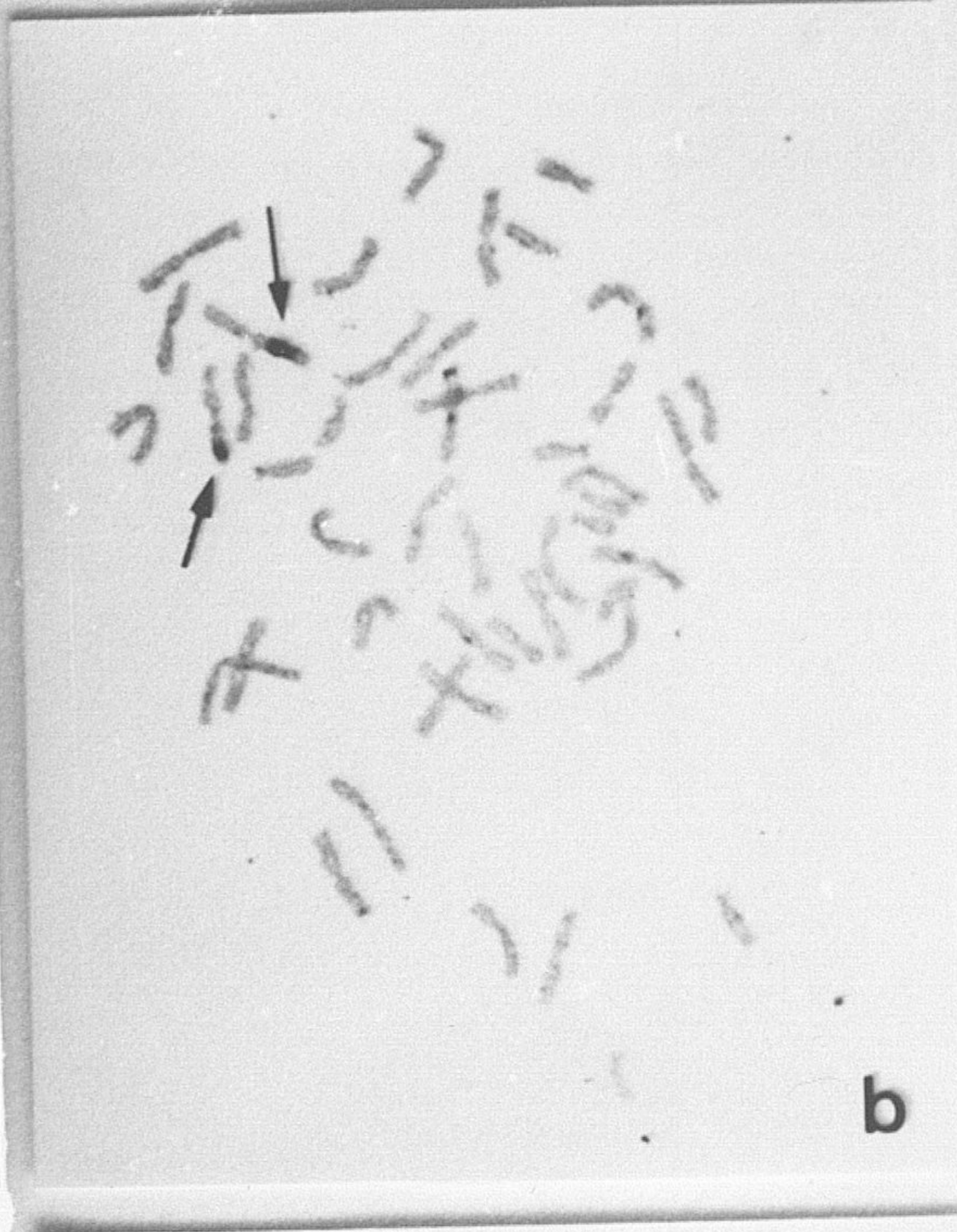
FIGURA 28.- Digestión con Alu I y tinción secuencial con CMA₃/DA (a) y nitrato de plata (b) de una metafase somática de salmón coho. La actividad NOR persiste en las zonas resistentes a la digestión con dicho enzima (flechas).

FIGURA 29.- Digestión con Hae III y tinción con Giemsa (a) y nitrato de plata (b) de una metafase somática de salmón coho. La actividad NOR permanece inalterada en las zonas digeridas por dicho enzima (flechas).

28

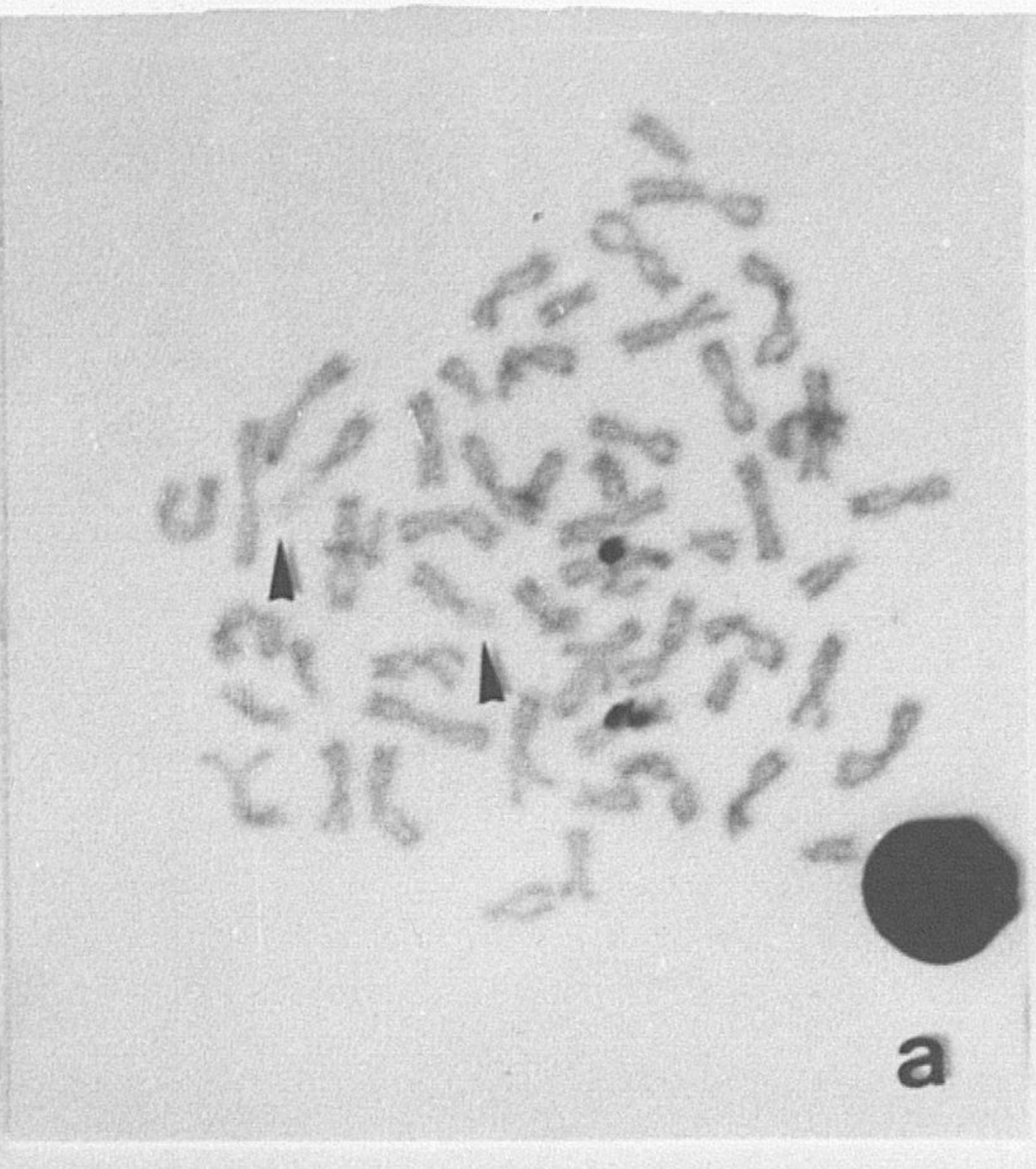


a

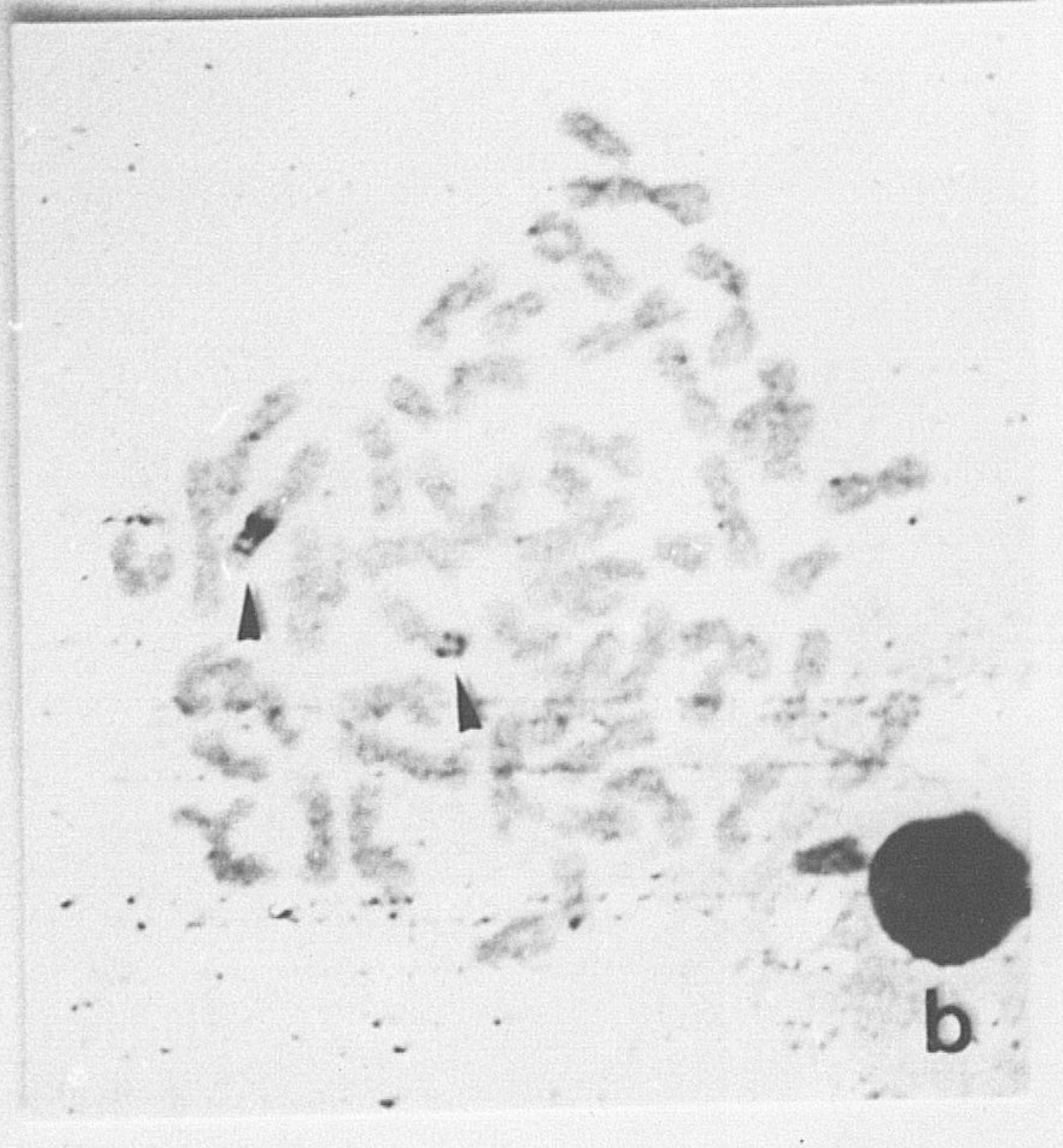


b

29



a



b

F B GRANADA

FIGURA 30.- Posibles segregaciones anafásicas (gametogénesis) de un ejemplar de trucha arco-iris de cariotipo $2n=60$ heterocigótico para dos fusiones céntricas (a), y de otro individuo de la misma especie con cariotipo $2n=63$, heterocigótico para tres fisiones céntricas (b).

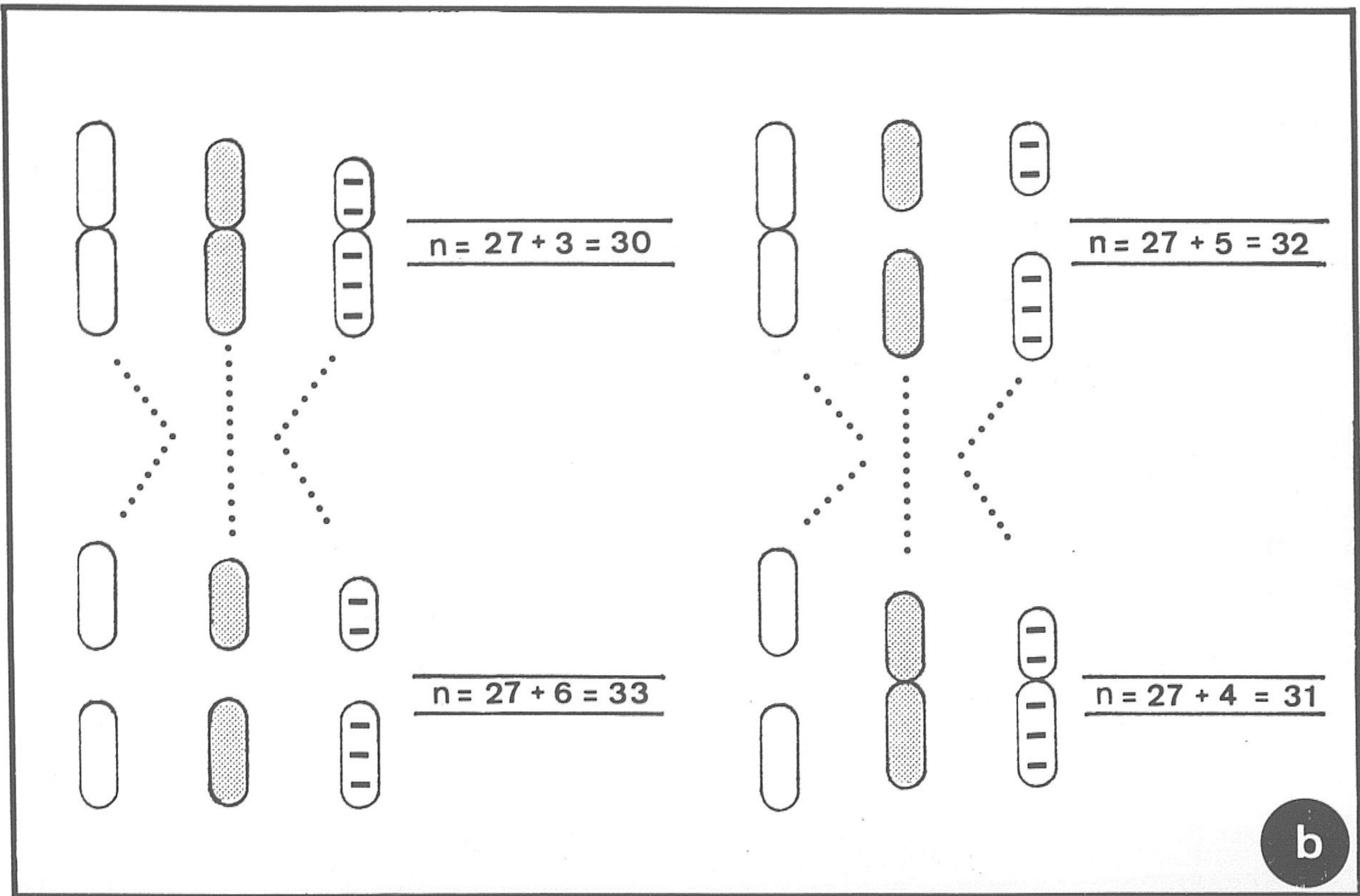
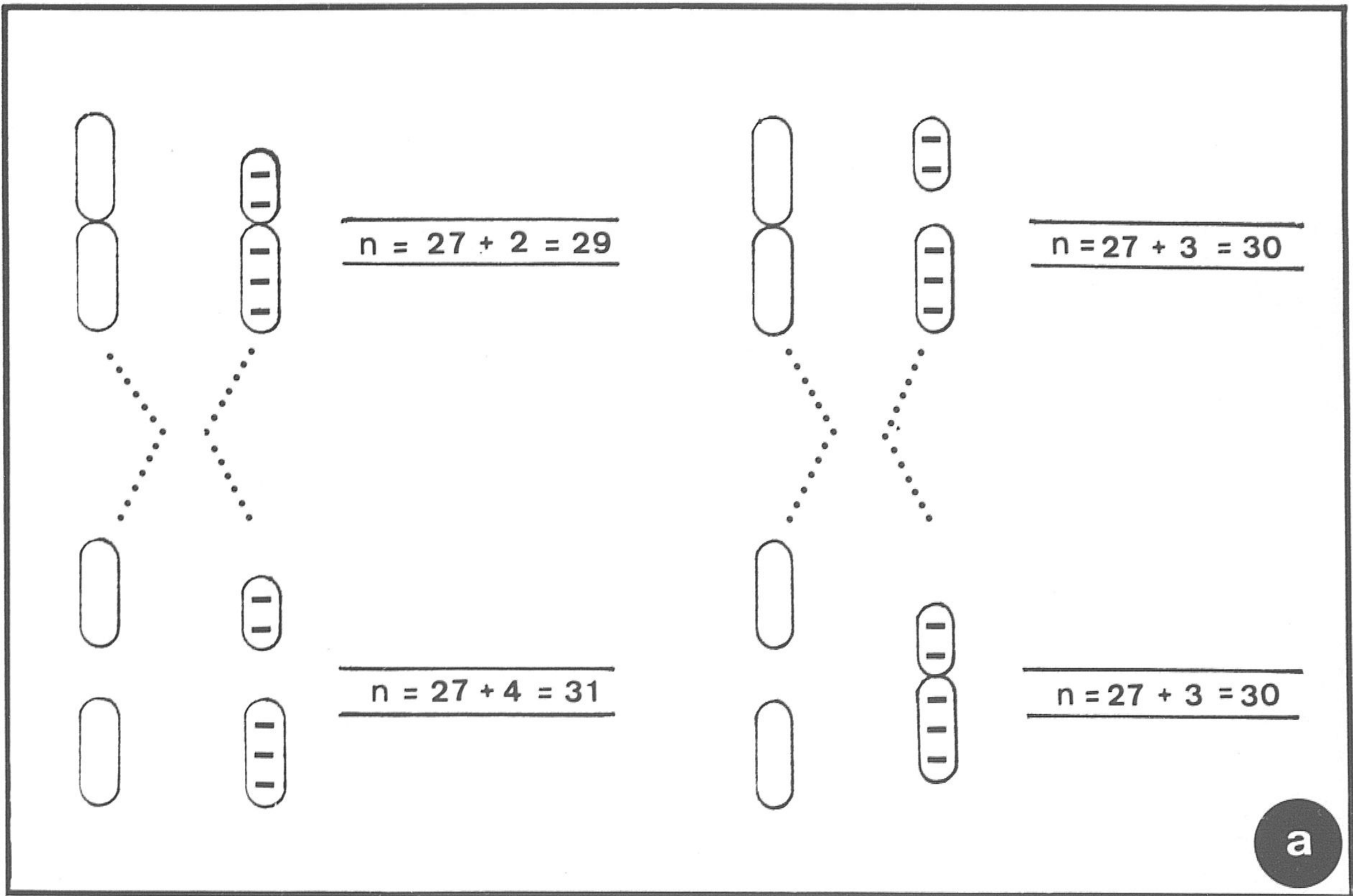


FIGURA 31.- Los incrementos en las tasas de variabilidad intraindividual que tienen lugar entre dos generaciones consecutivas podrían explicar la aparición de individuos con distintos números cromosómicos (variabilidad interindividual) en las poblaciones de trucha arco-iris (*Salmo gairdneri*).

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA



800216174
FACULTAD DE CIENCIAS

