

DEFICIENCIA DE HETEROCIGOTOS EN UNA COHORTE DE *OSTREA CHILENSIS* (PHILIPPI, 1845)

HETEROZYGOTE DEFICIENCY IN A COHORT OF *OSTREA CHILENSIS* (PHILIPPI 1845)

Jorge Toro, Ana Vergara y Ricardo Galleguillos*

RESUMEN

Una cohorte de *Ostrea chilensis* fijada en colectores artificiales en el estuario Quempillén, Chiloé, fue utilizada para determinar las frecuencias genotípicas a los 6, 18 y 30 meses de edad, de las enzimas polimórficas: leucin-aminopeptidasa (LAP), fosfoglucoisomerasa (PGI) y anhidrasa carbónica (AC). Se analizó cada locus, utilizando la prueba de Chi-cuadrado para bondad de ajuste, expresando los resultados a través del índice relativo de desviación del valor esperado de heterocigotos (D). No se encontró valores negativos de D en los individuos de 6 meses de edad. Se encontró una deficiencia significativa de heterocigotos para los loci LAP (D= -0.260) y AC (D= -0.153) en los individuos de 18 meses de edad. En los adultos se observó valores negativos para D en todos los loci, presentando valores significativos para LAP (D= -0.243) y AC (D= -0.353). Considerando que la mortalidad entre los 6 y 18 meses y entre 18 y 30 meses fue de un 25 % y 17 % respectivamente, se puede concluir que en esta cohorte existiría un proceso de selección en contra de los heterocigotos en la etapa de juveniles, lo cual concuerda con lo registrado en la literatura para otras especies de moluscos bivalvos.

Palabras claves: Heterocigosidad, ostra chilena, Chile.

ABSTRACT

A cohort of *Ostrea chilensis* settled on artificial collectors in the Quempillén estuary, Ancud, Chiloé was used to investigate genotype frequencies at the LAP, PGI and CA loci, in random samples of oysters taken at 6, 18 and 30 months of age. Individual testing of each locus, using the χ^2 goodness of fit test was carried out, using "D" as an index of heterozygote deviation. In 6 months old oysters no negative values for D were found. Significant deficiency of heterozygotes were found at LAP (D= -0.260) and AC (D= -0.153) loci in oysters 18 months old. In adults (30 months) negative values of D were present at all analyzed loci presenting significant values at LAP (D= -0.243 and AC (D= -0.353). Considering that mortality between 6 and 18 months and between 18 and 30 months was 25 % and 17 % respectively, we conclude that there is a selection against heterozygotes in juvenile oysters, which is in agreement with the reports in the literature for other mollusc species.

Key words: Heterozygosity, Chilean oyster, Chile.

Fecha de recepción: 2 - 5 - 94. Fecha de aceptación 21 - 7 - 95

INTRODUCCION

En estudios electroforéticos llevados a cabo en bivalvos marinos, un fenómeno muy común reportado en la literatura es el de una deficien-

cia de heterocigotos, es decir, que el número de individuos heterocigotos observados para un determinado locus es significativamente menor al que se esperaría de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg (Skibinski *et al.*, 1983; Zouros & Foltz, 1984a; Guíñez & Galleguillos, 1985; Beaumont, 1991). Explicaciones que no involucran procesos selectivos para este fenómeno incluyen la presencia de endogamia, el efecto Wahlund, presencia de alelos nulos y aneu-

Instituto de Biología Marina, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

* Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Casilla 297, Concepción, Chile.

ploidía. Sin embargo, la mayoría de las explicaciones mencionadas anteriormente han sido descartadas como factores importantes en la producción de deficiencias de heterocigotos en moluscos bivalvos (Gaffney *et al.*, 1990; Gosling, 1992), y por lo tanto la causa de este fenómeno podría deberse a procesos de selección en contra de los heterocigotos.

Este fenómeno ha sido estudiado utilizando cultivos de laboratorio de *Mytilus edulis* (Mallet *et al.*, 1985; Beaumont, 1991) y en individuos de la misma especie provenientes de asentamientos producidos en la naturaleza (Gosling & Wilkins, 1985; Gosling & McGrath, 1990). Específicamente en la ostra chilena, Guíñez & Galleguillos (1985) reportan una deficiencia de heterocigotos para el locus anhidrasa carbónica (AC) en una población proveniente de la localidad de Melinka (Islas Guaitecas).

Se han propuesto en la literatura varios modelos para explicar el fenómeno de deficiencia de heterocigotos en poblaciones naturales, entre los cuales están los descritos por Zouros & Foltz (1984a; 1984b). En estudios de laboratorio con *Mytilus edulis*, se ha observado (Beaumont, 1991) que en semillas recién fijadas (< 5 mm de longitud de la valva) no hay desviaciones significativas con respecto a lo esperado de acuerdo a Hardy-Weinberg. Sin embargo, la desviación es significativa en juveniles (10 - 20 mm de longitud de valva) provenientes del mismo experimento, lo cual sugeriría que la deficiencia de heterocigotos sería un fenómeno característico de etapas tempranas del desarrollo, cuando los individuos están recién fijados.

En el presente trabajo se analiza electroforéticamente distintas etapas del ciclo de vida de una cohorte de *Ostrea chilensis*, con el fin de establecer el período en que esta deficiencia de heterocigotos se estaría generando.

MATERIALES Y METODOS

Los individuos de *Ostrea chilensis* utilizados en el presente estudio fueron captados en colectores artificiales durante la temporada de reproducción 1989/1990 utilizando ostras provenientes de un banco natural de dicha especie presente en el estuario del río Quempillén, Ancud, Chiloé (41° 52' S y 73° 46' W). A los 6 meses de edad, 3.000 juveniles fueron despren-

didados de los colectores y transferidos a pearl-nets para continuar su crecimiento en forma suspendida en la bahía de Hueihue. Con el propósito de realizar un estudio de variación alozímica en diferentes estados del ciclo de vida de *O. chilensis*, una muestra aleatoria de 150 individuos de la cohorte se tomó a los 6, 18 y 30 meses de edad. Estos individuos experimentales fueron congelados a -30 °C para su posterior análisis enzimático. Se utilizó análisis de electroforesis horizontal sobre gel de almidón, en buffer Tris Cítrico discontinuo, pH 5.1-6.0 para la enzima LAP y pH 6.3-6.7 para las enzimas PGI y AC (Shaw & Prasad, 1970; Selander *et al.*, 1971). Se determinó las frecuencias genotípicas de las siguientes enzimas polimórficas: leucin-aminopeptidasa (LAP, EC 3.4.1.1), fosfo-glucoisomerasa (PGI, EC 5.3.1.9) y anhidrasa carbónica (CA, EC 4.2.1.1). En los loci analizados, los alelos fueron identificados por un número, el cual correspondió al porcentaje de movilidad en relación al alelo más común. Se realizaron análisis individuales para cada locus, utilizando la prueba de Chi-cuadrado para bondad de ajuste, expresando los resultados a través del índice relativo de desviación de heterocigotos (D) del valor esperado. Las desviaciones a partir del modelo se expresaron como $D = (H_o - H_e) / H_e$ (Selander, 1970), en donde H_o = número observado, y H_e = número esperado de heterocigotos asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg.

RESULTADOS

El porcentaje de mortalidad fue de un 25 % para el período entre los 6 y 18 meses y de 17 % para el período comprendido entre los 18 y 30 meses.

La Tabla 1 presenta las frecuencias de heterocigotos para los loci estudiados en la cohorte de *Ostrea chilensis*, e incluye la proporción de heterocigotos observados (H_o), la proporción de heterocigotos esperados (H_e) bajo equilibrio Hardy-Weinberg, el índice relativo de desviación de heterocigotos del valor esperado (D) y la probabilidad para la prueba de Chi-cuadrado de bondad de ajuste con el equilibrio Hardy-Weinberg (p). En la Tabla 1, que resume el análisis para cada locus, se observa que los valores de D son positivos, lo que indica que no

Tabla 1. Frecuencias de heterocigotos para los loci estudiados en la cohorte de *Ostrea chilensis* fijada en la temporada 1989/1990. Proporción de heterocigotos observados (H_o), proporción de heterocigotos esperados (H_e) bajo equilibrio Hardy-Weinberg, índice relativo de desviación de heterocigotos del valor esperado (D) y la probabilidad para la prueba de Chi-cuadrado para bondad de ajuste con el equilibrio Hardy-Weinberg (p).

Frequency of heterozygotes in 3 loci analyzed in a cohort of *Ostrea chilensis* settled in 1989/1990 season. Proportion of observed (H_o) and expected (H_e) heterozygotes, under Hardy-Weinberg, index of relative deviation of heterozygotes from expected value (D) and the probability, of Chi-square goodness of fit test (p).

LOCUS	6 meses			18 meses			30 meses		
	H_o	H_e	D	H_o	H_e	D	H_o	H_e	D
LAP	0.419	0.398	0.053*	0.338	0.457	-0.260**	0.447	0.591	-0.243**
PGI	0.581	0.458	0.283*	0.373	0.389	-0.041*	0.268	0.292	-0.082*
AC	0.645	0.617	0.046*	0.514	0.607	-0.153**	0.408	0.631	-0.353**
Promedio			0.127			-0.151			-0.226

* N.S.; ** $p < 0.05$

hay deficiencia de heterocigotos en las semillas de 6 meses de edad, aunque los valores de D no son estadísticamente significativos. En los individuos de 18 meses de edad, se observó dos loci con valores negativos para D, los cuales son estadísticamente significativos: LAP y AC, lo que indica que ambos loci no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. En ostras de 30 meses de edad, se observa que los tres loci presentan valores negativos para D, es decir una clara deficiencia de heterocigotos con desviaciones estadísticamente significativas para LAP y AC, lo cual explicaría su alejamiento del equilibrio Hardy-Weinberg.

DISCUSION

El hallazgo de una deficiencia de heterocigotos corresponde a un hecho común en moluscos. En efecto, Zouros & Foltz (1984a), en una amplia revisión dan cuenta de 24 especies de bivalvos marinos en las cuales se ha encontrado esta deficiencia. Estos mismos autores proponen como posibles causas la selección diferencial en estados larvales o un desove genotipo

dependiente. Otras posibles causas para este fenómeno pueden ser el efecto Wahlund o la consanguinidad (Singh & Green, 1984). Los datos obtenidos en el presente estudio sobre deficiencia de heterocigotos, demuestran que entre el período de semilla (6 meses) y juveniles (18 meses), ocurre una mortalidad diferencial entre genotipos homocigotos y heterocigotos en dos de los loci estudiados. Esta mortalidad diferencial va generando en la cohorte una deficiencia general significativa de heterocigotos, detectable ya en la etapa de juveniles (18 meses). Uno de los tres loci estudiados (PGI), no mostró deficiencia ni exceso de heterocigotos, lo cual está de acuerdo con lo citado para estudios llevados a cabo en poblaciones naturales de moluscos bivalvos (Koehn *et al.*, 1976; Zouros *et al.*, 1983).

La mayoría de las hipótesis que proponen explicar la deficiencia de heterocigotos en moluscos bivalvos, por medio de eventos que no involucran procesos selectivos, pueden ser descartadas. La alta fecundidad, fertilización externa y dispersión larval, común en la mayoría de los moluscos bivalvos, tienden a poner evidencia en contra para las hipótesis de consanguinidad y efecto Wahlund como gestoras de deficiencia de heterocigotos. A pesar de que en la especie de ostra chilena la fertilización es interna y el período larval pelágico muy reducido (Toro & Chaparro, 1990), no se observó una deficiencia de heterocigotos en los primeros estadios de su ciclo de vida, eliminando de esta forma las hipótesis de efecto Wahlund y consanguinidad como probables causas de la deficiencia de heterocigotos encontrada en esta cohorte. Estudios llevados a cabo por Gosling & Wilkins (1985), Mallet *et al.* (1985), Borsa *et al.* (1991) y Gaffney (1993), descartan la posibilidad de que la deficiencia de heterocigotos se deba al efecto Wahlund, consanguinidad o alelos nulos. Otra posible causa para el déficit de heterocigotos propuesta por Thiriott-Quievreux *et al.* (1988), es la presencia de aneuploidía, la cual, sin embargo, fue descartada a través de los resultados obtenidos en estudios llevados a cabo por Gaffney *et al.* (1990). Por lo tanto, descartando otras hipótesis alternativas, se tiende a quedar con la selección contra ciertos genotipos heterocigotos, como la causa más probable en la generación de deficiencias de heterocigotos en moluscos bivalvos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman lo reportado por Mallet *et al.* (1985) y Beaumont (1991), incrementando de esta forma la evidencia sobre la existencia de una selección en contra los heterocigotos, como la causa del fenómeno de deficiencia de heterocigotos en moluscos bivalvos, la que ocurriría durante la etapa de post-fijación.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por FONDECYT a través del Proyecto 91-0897 y la Dirección de Investigación y Desarrollo de la UACH, Proyectos: S-91-05 y S-94-18.

LITERATURA CITADA

- BEAUMONT, A.R. 1991. Genetic studies of laboratory reared mussels, *Mytilus edulis*: heterozygote deficiencies, heterozygosity and growth. *Biological Journal of the Linnean Society*, 44: 273 - 285.
- BORSA, P., M. ZAINURI & B. DELAY. 1991. Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*. *Heredity*, 66: 1 - 8.
- GAFFNEY, P.M. 1993. Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalve: more light? En: *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. A.R. Beaumont (editor). London, Chapman & Hall.
- GAFFNEY, P.M., T.M. SCOTT, R.K. KOEHN & W.J. DIEHL. 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the Coot Clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics*, 124: 687 - 699.
- GOSLING, E.M. 1992. Genetics of *Mytilus*. En: *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and culture*: 309- 382. E.M. Gosling (editor). Holland, Elsevier.
- GOSLING, E.M. & N.P. WILKINS. 1985. Genetics of settling cohorts of *Mytilus edulis* (L.): preliminary observations. *Aquaculture*, 44: 115 - 123.
- GOSLING, E.M. & D. MCGRATH. 1990. Genetic variability in exposed-shore mussels, *Mytilus* spp. along an environmental gradient. *Marine Biology*, 104: 413 - 418.
- GUÍÑEZ, R. & R. GALLEGUILLOS. 1985. Clinal variation in morphological distance between genotypes at the carbonic anhidrase locus in the Chilean oyster, *Tiostrea chilensis* (Philippi, 1845) Chanley and Dinamani, 1980. *Brazilian Journal of Genetics*, 8: 609-616.
- KOEHN, R.W., R., MILKMAN & J.B. MITTON. 1976. Population genetics of marine pelecypods. IV. Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Evolution*, 30: 2-32.
- MALLET, A.L., E. ZOUROS, K.E. GARTNER-KEPKAY, K.R. FREEMAN & L.M. DICKIE. 1985. Larval viability and heterozygote deficiency in populations of marine bivalves: evidence from pair matings of mussels. *Marine Biology*, 87:165-172.
- SELANDER, R.K. 1970. Behaviour and genetic variation in natural populations. *American Zoologist*, 10: 53 - 66.
- SELANDER, R.K., M.H. SMITH, S.Y. YANG, W.E. JOHNSON & J.B. GENTRY. 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the oldfield mouse (*Peromyscus polionotus*). University of Texas Publication N° 7103. *Studies in Genetics*, 6: 49-90.
- SHAW, CH., R. PRASAD. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochemical Genetics*, 4: 297-320.
- SINGH, S.M. & R.H. GREEN. 1984. Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible biological significance. *Malacologia*, 25: 569-581.
- SKIBINSKI, D.O.F., J.A. BEARDMORE & T.F. CROSS. 1983. Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae: Mollusca) in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 19: 137-183.
- TORO, J.E. & O.R. CHAPARRO. 1990. Conocimiento biológico de *Ostrea chilensis* (Philippi, 1845): Impacto y perspectivas en el desarrollo de la ostricultura en Chile. En: *Cultivo de Moluscos en América Latina*: 231-264. A. Hernández (editor). C.I.I.D., Bogotá, Colombia.
- VERGARA, A.M., J.E. TORO & K.A. PASCHKE. 1992. Relaciones entre variables fisiológicas, heterocigosidad y eficiencia de crecimiento en *Ostrea chilensis* (Philippi 1845). *Revista de Biología Marina, Valparaíso*, 27: 283-297.
- ZOUROS, E., D.W. FOLTZ. 1984a. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia*, 25: 583-591.
- ZOUROS, E. D.W. FOLTZ. 1984b. Minimal selection requirements for the correlation between heterozygosity and growth, and for the deficiency of heterozygotes, in oyster populations. *Developmental Genetics*, 4: 393 - 405.
- ZOUROS, E., S.M. SINGH, D.W. FOLTZ & A.L. MALLET. 1983. Post-settlement viability in the American oyster (*Crassostrea virginica*): an overdominant phenotype. *Genetics Research, Cambridge*, 41: 259-270.