

**UN METODO CITOGENETICO PARA LA OBTENCION DE
CROMOSOMAS PARA ESTUDIOS DE BANDEO Y DE MORFOLOGIA
FINA DE LOS CARIOTIPOS DE MOLUSCOS BIVALVOS DE LA
FAMILIA OSTREIDAE**

**A CYTOGENETIC METHOD TO OBTAIN CHROMOSOMES FOR
STUDIES OF BANDING AND FINE MORPHOLOGY
OF KARYOTYPES IN BIVALVE MOLLUSKS OF THE
FAMILY OSTREIDAE**

Faustino Rodríguez-Romero¹
Margarita Gasca Montes de Oca¹
Jorge de la Rosa Vélez²

¹ Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-305
México 04510, D.F.

² Facultad de Ciencias Marinas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado Postal 453
Ensenada, B.C., 22800, México

Ciencias Marinas (1991), Vol. 17, No. 4, pp. 1-10.

RESUMEN

Los estudios de los patrones de bandeado en los cromosomas de moluscos bivalvos de la familia Ostreidae no han sido desarrollados lo suficiente debido a la carencia de un método apropiado que permita la obtención de cromosomas en condiciones adecuadas para su realización. La producción de campos cromosómicos en frío mediante una modificación al procedimiento de goteo y secado al aire a partir de embriones y larvas obtenidos por fertilización *in vitro* y el control del grado de espiralización de los cromosomas se logra por la aplicación de pulsos de colchicina por períodos de 30, 45 y 60 minutos. Estos cromosomas presentan cierto grado de sincronización debido al uso de embriones tempranos y larvas de ostiones en los cuales las divisiones celulares son muy frecuentes.

La separación de las células en división fue lograda con una solución de ácido acético al 50% a 37°C. Los cromosomas así obtenidos pueden ser teñidos con éxito para los distintos tipos de bandas que se deseen estudiar.

ABSTRACT

The studies of banding patterns of chromosomes in bivalve mollusks of the family Ostreidae have not been developed satisfactorily due to the lack of a suitable method that enables the obtention of chromosomes in a proper condition.

The production of chromosomal fields in cold by means of a modification to the dripping and air drying method from embryos and larvae obtained from *in vitro* fertilization, and the control of the spiralization degree of the chromosomes, are achieved by the application of colchicine pulses for periods of 30, 45 and 60 minutes. These chromosomes show a certain degree of synchronisation due to the use of oyster early embryos and larvae in which the cell division is very frequent.

Separation of cells in division was achieved with a 50% acetic acid solution, at 37°C. Chromosomes obtained in this manner can be stained successfully for the several different bands willing to be studied.

INTRODUCCION

Los estudios cromosómicos en organismos del medio marino, estuarino y limnético ofrecen enormes posibilidades de aplicación en la resolución de problemas biológicos y ecológicos. En particular, es relevante su aportación de criterios sólidos en apoyo a la taxonomía, evolución y filogenia a través de la citotaxonomía.

En ecología y contaminación coadyuvan a la identificación y seguimiento de las poblaciones y a la vigilancia de la calidad del medio a través de la toxicología genética aportando uno de los criterios más sólidos que permiten relacionar en forma cuantitativa a los contaminantes con su impacto en el material genético de las especies (Vogel y Beaknecht, 1976).

En maricultura, cumplen una función primaria en la toma de decisiones para el inicio de cultivos, el seguimiento de fenómenos adaptativos y mejora genética de las especies en explotación, incluyendo estrategias de ingeniería genética por manipulación de las ploidias y de formación de bancos de genes (Chevassus y Coche, 1986).

No obstante lo anterior, en el presente son muy escasos los estudios cromosómicos en especies marinas y estuarinas. Los estudios de bandedo cromosómico son prácticamente nulos en crustáceos y en moluscos son raros.

En los moluscos bivalvos de la familia Ostreidae, los estudios de citogenética conducentes al conocimiento profundo de la morfología y de los patrones de bandedo de los cromosomas que constituyen los cariotipos de las diversas especies son aún insuficientes y los trabajos hasta ahora publicados (Longwell *et al.*, 1967; Menzel 1968a 1968b; Ahmed 1973; Stiles y Choromanski, 1987) utilizan en forma preponderante la técnica de aplastamiento (squash) y tinción con orceína. Esta metodología, si bien es de utilidad para el estudio

INTRODUCTION

The chromosomal studies in organisms from the marine, estuarine and limnetic environments render huge possibilities of application to the solution of biological and ecological problems. In particular, they contribute to establish a solid base to support taxonomy, evolution and phylogenetics studies through cytotaxonomy.

In ecology and pollution studies they help in the identification and monitoring of populations, and to oversee the environment quality by means of the genetic toxicology, achieving a solid criterium that relates, in a quantitative way, the pollutants with the impact affecting the genetic material of the species (Vogel and Beaknecht, 1976).

In mariculture they accomplish a primary function when it is precise to adopt a decision in order to start a culture, to monitor the adaptive phenomena and to carry on genetic improvement of the species in use, including strategies of genetic engineering by means of ploidies manipulation and formation of gene banks (Chevassus and Coche, 1986).

None the less, in the present time, chromosomal studies in marine and estuarine species are very scarce. The studies of chromosomal banding are practically absent in crustaceans and rare in mollusks.

In bivalve mollusks of the family Ostreidae, studies in cytogenetics conducive to the deep knowledge on morphology and the banding patterns of karyotypes of the several species are not enough, and the research published up to now (Longwell *et al.*, 1967; Menzcl, 1968a, 1968b; Ahmed, 1973; Stiles and Choromanski, 1987) use, mainly, the squash technique and orcein staining. This method, useful for the chromosome number studies, is not artful enough for a high performance analysis of chromosomal morphology.

de los números cromosómicos de los organismos, no es lo suficientemente refinada para el análisis con alta resolución de la morfología cromosómica.

Uno de los obstáculos de mayor importancia que ha limitado la obtención de laminillas con campos cromosómicos adecuados para la realización de estudios de patrones de bandeado cromosómico en estos organismos, es el bajo porcentaje de divisiones mitóticas y la tendencia a la fuerte condensación de los cromosomas por la acción poco controlada del mitostático. Asimismo, hasta ahora ha sido muy difícil obtener células en mitosis con algún grado de sincronización en el proceso de espiralización cromosómica en estos organismos.

En el presente trabajo, se ha desarrollado un procedimiento por el cual se obtiene un número suficiente de divisiones celulares con cierto grado de sincronización y cromosomas de buena calidad para estudios de bandas y otros similares, mediante la habilitación de un procedimiento modificado basado en la técnica de obtención de cromosomas por goteo y secado al aire y con fundamento en los avances que en esta especialidad han sido logrados por Smith (1965), Kato y Moriwaki (1972), Yunis (1976), Yunis *et al.* (1978), Franke y Olivier (1978), Rodríguez-Romero *et al.* (1978) y De Braekeleer *et al.* (1986).

MATERIALES Y METODOS

La fertilización *in vitro* de óvulos de *Crassostrea virginica* Gmelin, 1791 y *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828, se realizó de acuerdo con lo propuesto por Loosanoff y Davis (1963) en presencia de agua de mar filtrada, esterilizada con luz ultravioleta a una salinidad de 20-25‰ y adicionada con antibióticos penicilina (500 µg/ml) y estreptomicina (500 µg/ml). Los gametos fueron obtenidos mediante el desgarramiento de las gónadas de ejemplares adultos, sanos y sexualmente maduros o por inducción al desove. Los óvulos obtenidos fueron tratados con una solución de NH₄OH al 0.1 N adicionada a razón de 3 ml por cada 100 ml de suspensión celular, por cinco minutos y lavados con agua de mar filtrada y esterilizada antes de ser fertilizados, con el fin de remover los restos de vesícula germinal y otros tejidos indeseables que pudieran permanecer adheridos al óvulo. En este estudio, la fertilización *in vitro* se realizó

A most important impediment that has limited the obtention of slides with chromosomal fields useful for banding pattern studies is the low percentage of mitotic divisions and the chromosomal strong condensation trend exerted by the mitostatic. Also, up to now, it has been very difficult to obtain mitotic cells with a given synchronization degree in the chromosomal spiralization process, in these organisms.

In the present paper a procedure that obtains enough cell divisions has been developed, with a good synchronization degree and acceptable quality chromosomes for banding studies and similars, by means of a modification based on the technique of dripping and air drying, founded on the advances achieved by Smith (1965), Kato and Moriwaki (1972), Yunis (1976), Yunis *et al.* (1978), Franke and Olivier (1978), Rodríguez-Romero *et al.* (1978) and De Braekeleer *et al.* (1986).

MATERIALS AND METHODS

Ovule fertilization *in vitro* of *Crassostrea virginica* Gmelin, 1791 and *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828, was undertaken according to Loosanoff and Davis (1963), in filtered and ultraviolet sterilized sea water, at a salinity of 20-25‰. Penicilin (500 µg/ml) and streptomycin (500 µg/ml) were added. Gametes were obtained by ripping the gonads of adult animals that were healthy and sexually mature, or by spawning induction. The ovules were treated with a 0.1 N NH₄OH solution (3 ml per each 100 ml of cell suspension) for five minutes, and washed with filtered and sterilized sea water prior to fertilization, to remove rests of germinal vesicle and other undesirable tissues that could be stuck to the ovule. In this study, fertilization *in vitro* was undertaken successfully using suspensions of 350-400 ovules per millilitre. Once gametae joining started, settling was allowed in darkness for 5-8 hours, at 25°C. At the end of this period an embryonic development is reached up to the blastula-gastrula stages.

Cytogenetic procedure (Fig. 1)

Previous treatment. Embryos and larvae were concentrated by centrifugation at 1,000 rpm for five minutes. A 0.04% (w/v) mitostatic colchicine (Sigma Chemical) solution was

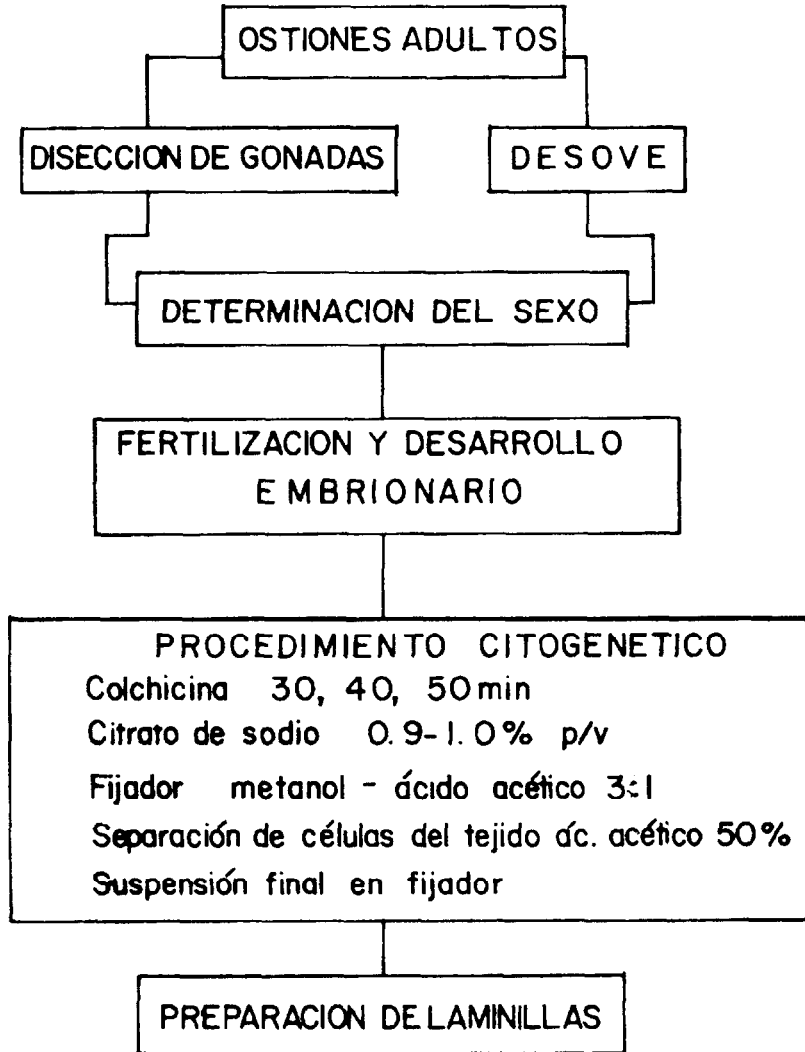


Figura 1. Procedimiento general para la obtención de cromosomas a partir de embriones y larvas de moluscos bivalvos.

Figure 1. General procedure for the obtention of chromosomes from embryos and larvae of bivalve mollusks.

con éxito utilizando suspensiones de 350-400 óvulos por mililitro. Una vez iniciada la unión de gametos, se dejaron reposar en la oscuridad a 25°C por 5-8 horas. Al final de este período se alcanza un desarrollo embrionario hasta los estadios de blástula-gástrula.

Procedimientos de citogenética (Fig. 1)

Pretratamiento. Los embriones y larvas fueron concentrados por centrifugación a 1,000 rpm durante cinco minutos. Se agregó el mitostático colchicina (Sigma Chemical) en solución al 0.04% p/v a razón de 1 ml por cada 100 ml de suspensión. Se dejó reposar por períodos de 30, 45 y 60 minutos según el grado de espiralización deseado de los cromosomas. Se centrifugó a 1,000 rpm/5 min y se decantó el sobrenadante.

Choque hipotónico. Se agregó una solución hipotónica de citrato de sodio (5 ml) al 0.9-1.0% p/v; se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Se centrifugó y desechó el sobrenadante.

Fijación. El botón celular fue fijado tres veces con 5 ml de una solución de metanol-ácido acético glacial (3:1). Se centrifugó y se desechó el sobrenadante cada vez. El tiempo total empleado en esta operación fue de 15 minutos.

Disociación de tejidos. Se agregaron 5 ml de ácido acético diluido al 50%, a 37°C al botón celular; se dejó reposar por tres minutos y se resuspendió con sacudidas moderadas del tubo para disgregar los tejidos cuidando de no romper las células en división. Se centrifugó a 500 rpm/5 min y se decantó el sobrenadante. Se agregaron 5 ml de fijador, se resuspendió y se guardó en refrigeración a 4°C por 24 horas con la finalidad de lograr la máxima fijación de las células.

Elaboración de laminillas. Se centrifugó a 500 rpm/5 min, el sobrenadante fue decantado y se agregó 0.5-1.0 ml de fijador recién preparado. Se resuspendió cuidadosamente y se elaboraron las laminillas por goteo desde una altura de 30-40 cm. Se recomienda el uso de portaobjetos nuevos previamente enfriados sumergidos en una solución de etanol al 70% a 4°C. Las laminillas elaboradas se dejan secar a temperatura ambiente y se guardan por una semana protegidas del polvo en vista de que se ha observado que el envejecimiento moderado de éstas, produce mejores resultados en su procesamiento pos-

added in 1 ml per each 100 ml of suspension. Settling was allowed for 30, 45 or 60 minutes, depending on the chromosomal spiralization degree wanted. The mixture was centrifuged at 1,000 rpm for five minutes, and the supernatant was discarded.

Hypotonic shock. Five millilitres of a 0.9-1.0% (w/v) sodium citrate hypotonic solution was added. Settling was allowed for 30 minutes at room temperature (25°C). The mixture was centrifuged, and the supernatant was discarded.

Fixation. The cell button was fixed three times with 5 ml of a methanol-acetic acid (3:1) solution. It was centrifuged and the supernatant was discarded each time. The total time was 15 minutes.

Tissue dissociation. Five millilitres of acetic acid 50% diluted were added to the cell button, at 37°C. Settling was allowed for three minutes, and resuspended with moderate shakings to disgregate the tissue, being careful not to break the cells in division. It was centrifuged at 500 rpm for five minutes, and the supernatant was decanted. Five millilitres of the fixing solution were added, the cell button resuspended and stored at 4°C for 24 hours, to achieve the maximum cell fixation.

Slide elaboration. The suspension was centrifuged at 500 rpm for five minutes. The supernatant was decanted and 0.5-1.0 ml of fresh fixing solution was added. The cell button was carefully resuspended and slides were elaborated by dripping from a height of 30-40 cm. The use of new slides previously cooled and sunk in a 70% ethanol solution, at 4°C, is recommended. Preparations are dried at room temperature and are kept for a week protected from the dust. It has been noted that a moderate aging renders better results in the posterior process. To assess the procedure, some slides can be stained with a 4% Giemsa solution, at pH 6.8 in phosphates buffer, during 25-30 minutes, an hour before they have been dripped.

RESULTS AND DISCUSSION

The use of embryos and larvae obtained by means of *in vitro* fertilization in an algae and bacteria free medium, enabled the preparation of slides with cells in mitotic division (Figs. 2.1- 2.6).

The microscopical observation of slides showed that cell divisions presented frequently

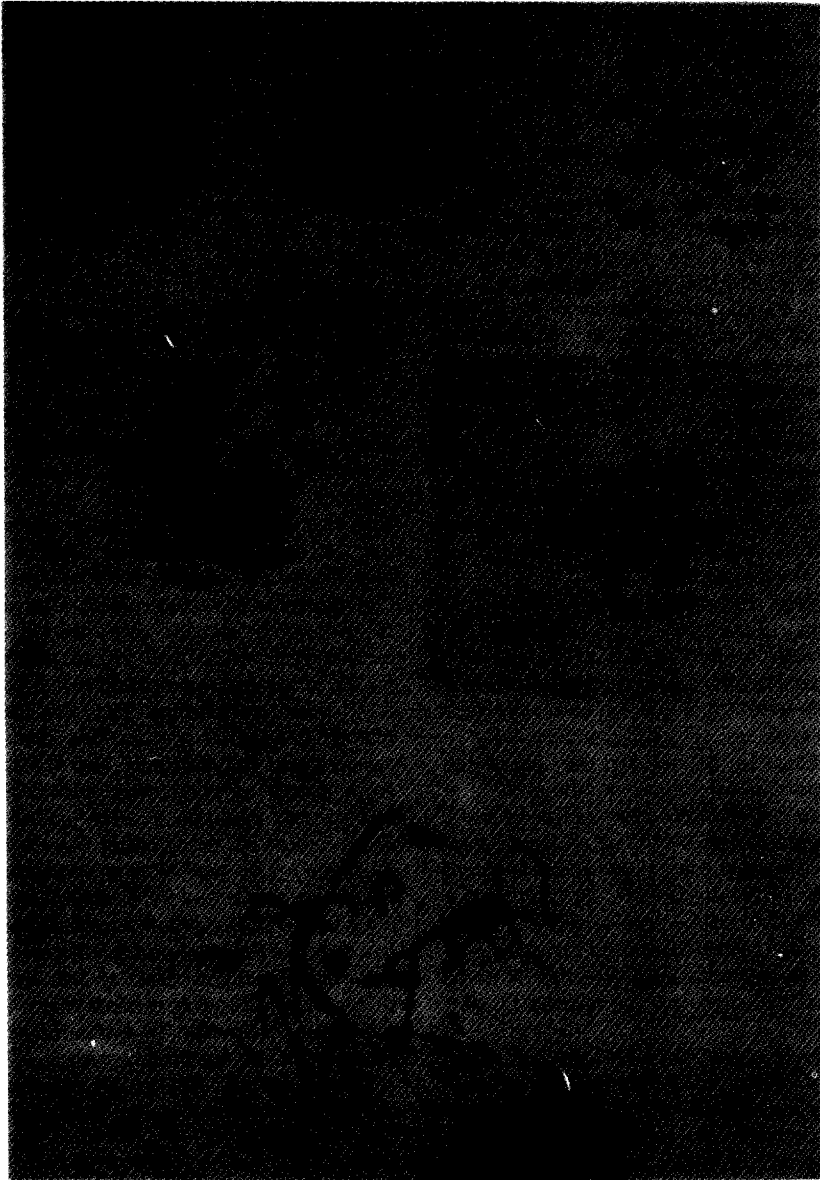


Figura 2. Mitosis con cromosomas condensados selectivamente después de 60 min (2.1-2.3); 45 min (2.4-2.5) y 30 min (2.6) de acción de la colchicina (100x).

Figure 2. Mitosis with chromosomes condensed selectively after 60 min (2.1-2.3); 45 min (2.4-2.5) and 30 min (2.6) of the action of colchicine.

2.1 *C. virginica*, 2.2 *C. rhizophorae*, 2.3 *C. rhizophorae*, 2.4 *C. virginica*, 2.5 *C. rhizophorae*, 2.6 *C. virginica*.

terior. Con el fin de evaluar el procedimiento, se pueden teñir algunas laminillas de prueba con una solución al 4% de colorante Giemsa a pH 6.8 en amortiguador de fosfatos durante 25-30 minutos, una hora después de que han sido goteadas.

RESULTADOS Y DISCUSION

El uso de embriones y larvas obtenidos por fertilización *in vitro* en un medio libre de algas y bacterias permitió la obtención de laminillas con células en división mitótica (Figs. 2.1-2.6).

La observación de las laminillas al microscopio, indicó que las divisiones celulares frecuentemente presentaron un buen grado de sincronización con campos cromosómicos con niveles de condensación más o menos semejantes de acuerdo con los tiempos de acción de la colchicina seleccionados. Una mayor cantidad de cromosomas alargados en profases tempranas fueron obtenidos con 30 minutos de pretratamiento con este alcaloide (Fig. 2.6); cromosomas con un grado intermedio de condensación fueron logrados con un tiempo de 45 minutos (Figs. 2.4 y 2.5). Estos cromosomas son los más adecuados para los estudios de bandeado C, G, Nor, etc., tradicionales, mientras que en el primer caso, se definen con ventaja las bandas G de alta resolución. Los cromosomas más condensados fueron observados con un tiempo de 60 minutos de pretratamiento con el mitostático (Figs. 2.1-2.3). Al respecto, estudios de bandeado cromosómico utilizando el procedimiento que aquí se presenta, han sido recientemente realizados; uno de ellos (Rodríguez-Romero, 1990), con la finalidad de caracterizar los patrones normales de bandas C y Nor en el cariotipo de *C. virginica* y el otro (Rodríguez-Romero *et al.*, 1990), está relacionado con la evaluación del impacto de la contaminación por petróleo crudo en un banco ostrícola silvestre de *C. virginica* en el sureste de México. En este trabajo, se hace patente la bondad del procedimiento que aquí se describe en detalle para determinar el grado de alteración cariotípica que pueden sufrir las ostras y otros pecelípodos sésiles ante la presencia de derivados de hidrocarburos fósiles durante los derrames petroleros que se registran con cierta frecuencia en el presente, en el medio marino. Finalmente, un cuidadoso estudio citogenético sobre diferencias y similitudes de la morfología

a good degree of synchronization with chromosomal fields, in almost similar condensation levels, according to the selected times of action of colchicine. A greater amount of elongated chromosomes in early prophase were obtained within 30 minutes of this alkaloid treatment (Fig. 2.6). Chromosomes with a medium degree of condensation were achieved with a 45 minute treatment (Figs. 2.4 and 2.5). These chromosomes are the most suitable for traditional C, G, Nor, etc. banding studies, while in the first case high resolution G bands are the best defined. The most condensed chromosomes were observed in a mitostatic pretreatment time of 60 minutes (Figs. 2.1-2.3). In this respect, chromosomal banding studies by the procedure presented here, have been undertaken recently. One of them (Rodríguez-Romero, 1990), was developed with the aim of characterizing the normal patterns of C and Nor bands in the *C. virginica* karyotype, and the other (Rodríguez-Romero *et al.*, 1990) is related with the assessment of pollution impact by crude oil in a wild *Crassostrea virginica* oyster bank in southwestern Mexico. In this latter paper the goodness of the procedure here described is shown, in order to determine the karyotypic alteration degree that oysters and other sessile pelecypods can suffer in the presence of fossil hydrocarbon derivatives during oil spillings. Finally, a careful cytogenetic study about differences and similarities of fine morphology and patterns of G, C and Nor bands in normal karyotypes of *C. virginica* and *C. rhizophorae* was undertaken recently by Gasca-Montes de Oca (1990), with the aim of providing more information to the taxonomy and phylogenetics of this taxa. This work has enabled a better karyotypic typification, and complemented the former information obtained by Rodríguez-Romero *et al.* (1978, 1979a, 1979b) for these species, by means of the analysis of chromosomes obtained by the method here presented.

Among other things, the presence of satellites in pair 2 of the *C. virginica* karyotype has been verified. This finding is considered of great importance for the chromosomal mapping in this species, and will be described in a future contribution.

In general, after the staining, every mitotic field was found well contrasted, free of microorganisms and debris, with a good separation between chromosomes.

fina y de los patrones de bandas G, C y Nor en los cariotipos normales de *C. virginica* y *C. rhizophorae*, ha sido realizado recientemente por Gasca-Montes de Oca (1990) con la finalidad de aportar mayor información a la taxonomía y filogenia de estos taxa. Este trabajo, basado en el análisis de cromosomas obtenidos por el procedimiento que aquí se expone, ha permitido una mejor tipificación cariotípica y complementado la información anteriormente obtenida por Rodríguez-Romero *et al.* (1978, 1979a, 1979b) para estas especies. Entre otras cosas, se ha verificado la presencia de satélites en el par 2 del cariotipo de *C. virginica*; este hallazgo se considera de importancia fundamental para el mapeo cromosómico en esta especie y será descrito en forma extensa en una contribución posterior.

En general, después de la tinción, todos los campos mitóticos presentes se observaron bien contrastados, libres de microorganismos y de restos de tejidos, con buena separación entre cromosomas.

Para los estudios cromosómicos en moluscos bivalvos se ha utilizado en forma extensiva el método de aplastamiento (squash) y tinción con orceína. Este método ha sido de utilidad en el análisis y determinación de las características morfológicas gruesas en los cariotipos de diversas especies de moluscos bivalvos (Ahmed y Sparks, 1967, 1970; Ahmed, 1973; Ieyama e Inaba 1974; Longwell *et al.*, 1967; Menzel 1968a, 1968b; Nakamura 1985; Stiles y Choromanski, 1987). No obstante, uno de los problemas persistentes que ha limitado los estudios más críticos de la morfología y bandeado cromosómico en estos organismos, ha sido la falta de un procedimiento citogenético que produzca eficazmente las mitosis abundantes con cromosomas prometáfásicos, de condensación adecuada, que son indispensables para este tipo de análisis.

Como resultado del método aquí empleado, se han eliminado todos los inconvenientes mencionados. Por la utilización de embriones y larvas y la desintegración de sus tejidos por acción del ácido acético al 50%, se ha evitado la presencia de estructuras endurecidas y de restos de tejidos y con el procesamiento de células sueltas, se ha mejorado notablemente la calidad de las preparaciones. Por otra parte, dado que en etapas tempranas del desarrollo embrionario la organogénesis apenas se inicia, los tejidos no han alcanzado

For the chromosomal studies in bivalve mollusks, the squash method and the orcein staining have been widely used. This method has been useful for the analysis and determination of the gross morphologic characteristics of several bivalve mollusk species (Ahmed and Sparks, 1967, 1970; Ahmed, 1973; Ieyama and Inaba, 1974; Longwell *et al.*, 1967; Menzel, 1968a, 1968b; Nakamura, 1985; Stiles and Choromanski, 1987). However, one persisting problem that has limited the most critical studies on morphology and chromosomal banding in these organisms, has been the lack of a cytogenetic procedure that yields abundant mitosis with prometaphasic chromosomes properly condensed, which are indispensable for this kind of analysis.

Because of this method, all the mentioned problems have been eradicated. The presence of hardened structures and debris has been avoided using embryos and larvae, and the disintegration of their tissues by means of a 50% solution of acetic acid. The quality of the preparation has been noticeably improved by the processing of loose cells. Besides, since in early stages of the embryonic development the organogenesis just begins, tissues have not reached complex levels of differentiation and specialization, and cell divisions are very frequent and synchronized by the mitostatic action applied in the pretreatment. Finally, the obtention of slides at room temperature by dripping and air drying, gives the opportunity to treat these according to the technical necessities for every chromosomal banding study required.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Lino Díaz and Adolfo Molina-Cruz for laboratory facilities and to Rocío Vargas-Sanders and Ernesto Guerrero-Padilla for technical assistance.

This work was financed through project No. PCECBNA 021433 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-MEXICO). Contribution No. 592 of the Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

English translation by the authors.

niveles complejos de diferenciación y especialización y las divisiones celulares son muy

frecuentes y accesibles a cierto grado de sincronización por acción del mitostático aplicado en el pretratamiento.

Finalmente, la obtención de laminillas a temperatura ambiente por goteo y secado al aire, ofrece la posibilidad de que éstas sean posteriormente tratadas de acuerdo a las necesidades técnicas por cada uno de los estudios de bandeado cromosómico que se desee realizar.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a Lino Díaz y Adolfo Molina-Cruz por las facilidades de laboratorio y a Rocío Vargas-Sanders y Ernesto Guerrero-Padilla por su ayuda técnica.

Este trabajo fue financiado por el CONACYT a través del proyecto PCECBNA 021433.

LITERATURA CITADA

- Ahmed, M. (1973). Cytogenetics of oysters. *Cytologia*, 38: 337-346.
- Ahmed, M. and Sparks, A.K. (1967). A preliminary study of chromosomes of two species of oysters (*Ostrea lurida* and *Crassostrea gigas*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 24: 2155-2159.
- Ahmed, M. and Sparks, A.K. (1970). Chromosome number, structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *The Biol. Bull.*, 138(1): 1-13.
- Chevassus, B. and Coche, A.G. (eds.) (1986). Report of the Symposium on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture of Fish and Shellfish for Consumption and Stocking. Bordeaux, France, 27-30 May, 1986. EIFAC. Tech. Pap. CECPI, (50): 52 pp.
- De Braekeleer, M., Keushning, M. and Lin, C.C. (1986). A high-resolution C-banding technique. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28: 317-322.
- Franke, U. and Olivier, N. (1978). Quantitative analysis of high-resolution trypsin-Giemsa bands on human prometaphase chromosomes. *Human Genetics.*, 45: 137-165.
- Gasca-Montes de Oca, M. (1990). Evaluación celular del híbrido de dos especies de ostras comerciales de México: Estudios cromosómicos. Tesis Profesional, Fac. Ciencias, UNAM, 189 pp.
- Ieyama, H. and Inaba, A. (1974). Chromosome number of ten species in four families of Pteriomorphia (Bivalvia). *Venus, Jpn. J. Malacol.*, 33: 129-137.
- Kato, H. and Moriwaki, K. (1972). Factors involved in the production of banded structures in mammalian chromosomes. *Chromosoma*, 38: 105-120.
- Longwell, A.C., Stiles, S.A. and Smith, D.G. (1967). Chromosome complement of the American oyster *Crassostrea virginica*, as seen in meiotic and cleaving eggs. *Can. J. Genet. Cytol.*, 9: 845-856.
- Loosanoff, F.L. and Davis, H.C. (1963). Rearing of bivalve mollusks. In: F.S. Russell (ed.), *Advances in Marine Biology*, Vol. 1. Academic Press, New York and London, pp. 1-136.
- Menzel, R.W. (1968a). Cytotaxonomy of the species of clams (*Mercenaria*) and oysters (*Crassostrea*). *Proc. Symp. on Mollusca*, Part I: Jan. 12-16, 1968; Cochin, India: *Mar. Biol. Assoc. of India*, pp. 75-84.
- Menzel, R.W. (1968b). Chromosome number in nine families of marine pelecypod mollusks. *Nautilus*, 82(2): 45-58.
- Nakamura, H.K. (1985). A review on molluscan cytogenetic information based on the CISMOCH-computerized index system for molluscan chromosomes. *Bivalvia, Polyplacophora and Cephalopoda*. *Venus, Jpn. J. Malacol.*, 44(3): 180-184.
- Rodríguez-Romero, F. (1990). Chromosomic "C" and Nor-banding patterns in the karyotype of *Crassostrea virginica* (Mollusca-ostreidae). *Proc. Unitas Malacol. Tenth Intl. Malacol. Congress (accepted)*.
- Rodríguez-Romero, F., Alcocer, M.U. and Figueras, A.L. (1978). Cytogenetic study of an oyster population of the species *Crassostrea virginica* (Gmelin) from coasts of Tabasco, México. *Venus, Jpn. J. Malacol.*, 37(2): 83-86.

- Rodríguez-Romero, F., Figueras, A.L., Alcocer, M.U. and Rojas, M.L. (1979a). Distribution of "G" bands in the karyotype of *Crassostrea virginica*. Venus, Jpn. J. Malacol., 38(3): 180-184.
- Rodríguez-Romero, F., Alcocer, M.U., Figueras, A.L. and Diupotex, M.E. (1979b). The karyotype of *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828). Venus, Jpn. J. Malacol., 38(2): 135-140.
- Rodríguez-Romero, F., Gasca-Montes de Oca, M. y Rosa-Vélez, J. (1990). Alteraciones cromosómicas en embriones y larvas de una población silvestre de ostiones *C. virginica* de la Laguna de Términos, Campeche, con relación al derrame de hidrocarburos del Pozo Yum II en noviembre de 1987. Mem. IV Reun. Nal. de Malacol. y Conquiliol. La Paz, B.C.S. (México), 9-12 octubre de 1990 (aceptado).
- Smith, S.G. (1965). Heterochromatin, colchicine and karyotype. Chromosoma, 16: 9-12.
- Stiles, S. and Choromanski, J. (1987). A method for cytogenetic and cytological examination of small shelled larvae of bivalves and other zooplankton. Stain Tech., 62: 113-117.
- Vogel, W. and Beaknecht, T. (1976). Differential chromatid staining by *in vivo* treatment as a mutagenicity test system. Nature, 260: 448-449.
- Yunis, J. (1976). High resolution of human chromosomes. Science, 19: 1268-1270.
- Yunis, J., Sawyer, R. and Ball, D.W. (1978). The characterization of high-resolution G banded chromosomes of man. Chromosoma, 67: 293-307.