

VARIACIONES DE LA HETEROCIGOSIDAD EN EL
LOCUS ENZIMATICO ANHIDRASA CARBONICA
ENTRE CLASES DE TAMAÑO EN POBLACIONES
DE LA OSTRAS CHILENA, *TIOSTREA CHILENSIS*
(PHILIPPI, 1845)

Heterozygosity variations at the Carbonic
Anhydrase enzyme locus among size classes
in populations of the Chilean oyster,
Tiostrea chilensis (Philippi, 1845)

Ricardo Guíñez(1) y Ricardo Galleguillos(1).

RESUMEN.

Se analizan genéticamente por medio de electroforesis en gel de almidón muestras de ostras de cinco localidades geográficas. Los estadísticos genéticos obtenidos se analizan en función de la talla máxima, encontrándose que los heterocigotos están más representados en las tallas mayores. Para una de las localidades fuimos capaces de determinar la edad de los individuos, lo que nos permitió encontrar diferencias genéticas dentro de edades y entre edades. Dentro de edades las diferencias se pueden explicar por una mayor tasa de crecimiento de los heterocigotos. Entre edades las diferencias se pueden explicar porque los heterocigotos pueden ser extraídos selectivamente por procesos pesqueros extractivos.

INTRODUCCION

En una serie de estudios realizados en poblaciones de moluscos bivalvos se ha descubierto correlaciones entre heterocigosis y longitud o tamaño de la concha (Zouros et al., 1983; Guíñez et al., 1986), en la mayoría de los casos las correlaciones han sido positivas, existiendo sin embargo tendencias contrarias (Wilkins,

ABSTRACT.

Samples of oysters from five geographic localities were analyzed genetically by means of starch gel electrophoresis. We compared the genetic statistics with respect of the maximum length, and we found that the heterozygous are more represented among the longer individuals. At one locality we were able to determine the age of the individuals, which permit us to find genetic differences within ages and between ages. Within ages the differences could be explained by a greater growth rate of the heterozygous. Between ages the differences are explained because the heterozygous could be selectively caught by an extractive fishery process.

KEYWORDS: Genetic structure. Carbonic anhydrase. *Tiostrea chilensis*. Oyster. Growth rate.

1978). En algunos estudios los componentes: edad diferencial y crecimiento diferencial, se han podido separar en su efecto sobre el tamaño, de tal modo que han podido diferenciar los efectos del creci-

(1) Laboratorio de Genética de organismos marinos. Área de Biología y Tecnología del mar (BIOTECMAR). Casilla 127, Pontificia Universidad Católica de Chile, Sede Regional Talcahuano, Chile.

miento diferencial (Zouros et al., 1980; Koehn y Gaffney, 1984) de los efectos de la sobrevivencia diferencial (Zouros et al., 1983). Foltz et al. (1983) encuentran que el efecto de la heterocigosidad sobre la tasa de crecimiento tiene un componente de sobredominancia (interacción de alelos del mismo locus) y demuestran que cada locus agrega su efecto sobre el crecimiento. Sin embargo, a la fecha son relativamente pocos los estudios en que se han reportado correlaciones o al menos cambios asociados entre la heterocigosidad aloenzimática uni-locus o multi-locus y la viabilidad en poblaciones naturales.

La ostra chilena, *Tiostrea chilensis*, y en general los moluscos marinos son un grupo particularmente útil para estudios poblacionales. Las condiciones del entorno pueden variar marcadamente en distintas escalas geográficas. Se les puede recolectar en forma relativamente fácil y en grandes números, pudiéndoseles marcar y estudiar *in situ*, o transferirlos a otras áreas geográficas. En algunos casos es posible determinarles la edad; así en el caso de la ostra chilena los ostricultores mantienen grupos anuales o cohortes de edad conocida en distintos parques de crecimiento dentro de sus ostriculturas. El utilizar información de ostras mantenidas en cultivos nos permite comprender aspectos genéticos básicos de la adaptación de los organismos marinos, y por otra parte, nuestros resultados pueden ser de una gran utilidad práctica para el ostricultor.

En este trabajo, reportamos algunas asociaciones observadas entre longitud de la concha y la heterocigosidad genética en el locus aloenzimático CA (Anhidrasa carbónica), en distintas localidades, y adicionalmente se discute el efecto que la edad o la tasa de crecimiento pueden tener sobre la asociación.

MATERIALES Y METODOS.

Los datos analizados aquí fueron colectados por Guiñez y Galleguillos (1985),

quienes sobre la base del locu CA, encuentran una variación clinal de la distancia morfológica entre homocigotos y heterocigotos. El análisis presente se basa en una muestra de 589 individuos colectados de 5 localidades geográficas (Quihua, Quetalmahue, Hueihue, Butachauques y Melinka), medidos para su largo máximo (eje antero-posterior) y se procesaron por electroforesis en gel de almidón (Connaught) para la enzima anhidrasa carbónica (CA; E.C. 4.2.1.1) de acuerdo a los procedimientos descritos por Guiñez y Galleguillos (1985).

Para cada muestra se formaron las correspondientes distribuciones de frecuencia, tal que el número mínimo de individuos para cada clase de tamaño no fuera menor que 10 individuos. Para cada clase se calculó la heterocigosidad observada contando todos los individuos heterocigotos. Las desviaciones de las proporciones genóticas de aquellas esperadas de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg se estimaron utilizando el índice D definido como: $D = (H_o - H_e)/H_e$, donde H_o representa el número de heterocigotos observados, y H_e , el número esperado de acuerdo a las expectativas de Hardy-Weinberg para muestras pequeñas (Levene, 1949). Valores negativos de D indican una deficiencia de heterocigotos y valores positivos un exceso respecto de lo esperado.

Otros estadísticos generales siguen a Sokal y Rohlf (1981).

RESULTADOS.

La Tabla I resume las frecuencias del alelo más común y la heterocigosidad observada entre todos los individuos. Sólo la muestra de Quihua presentó heterogeneidad de las frecuencias genéticas ($X^2 = 10.29$, g.1.=2, $P < .01$) ente las clases de tamaño. Por otra parte ninguna de las comparaciones realizadas dentro de cada clase de tamaño se desvió significativamente de Hardy-Weinberg. Es evidente que en general las frecuencias génicas no muestran tendencias claras en relación a

TABLA I. La frecuencia del alelo más común (p), la heterocigosidad observada (Ho), y el índice D (ver texto) para el locus CA, entre clases de talla de *Tiostrea chilensis* provenientes de 5 localidades.

Muestra	Clases de Longitud	Promedio dentro de Clases	2N	p	Ho	D
QUIHUA	< 50	46.8	38	0.947	0.105	+0.028
	> 50	52.8	42	0.735	0.529	+0.222
QUETALMAHUE	< 37	34.8	24	0.750	0.333	-0.148
	37-43	41.1	34	0.882	0.235	+0.100
	> 43	44.3	32	0.813	0.375	+0.192
HUEIHUE 2	< 34	30.7	20	0.750	0.300	-0.240
	34-42	39.7	30	0.800	0.400	+0.145
	42-48	46.0	34	0.882	0.235	+0.073
	> 48	51.5	28	0.750	0.500	+0.204
HEIHUE 3	< 50	49.0	32	0.625	0.375	-0.285
	50-54	52.9	30	0.867	0.133	-0.458
	54-58	56.7	44	0.773	0.364	-0.034
	> 58	63.1	24	0.708	0.417	-0.080
BUTACHAUQUES	< 44	41.5	42	0.881	0.238	+0.108
	44-50	47.3	44	0.864	0.182	-0.246
	50-56	53.8	58	0.897	0.207	+0.079
	> 56	62.1	36	0.861	0.278	+0.129
MELINKA	< 48	47.4	34	0.647	0.471	-0.093
	48-51	50.1	66	0.712	0.515	+0.174
	51-54	52.9	116	0.707	0.379	-0.137
	54-57	55.7	66	0.667	0.424	-0.125
	> 57	58.3	20	0.550	0.700	+0.243

2N = Número de genes muestreados.

p = Frecuencia génica del alelo más común.

Ho = Heterocigosidad observada.

D = Índice D (ver texto).

TABLA II. Estadísticos locus específicos de la localidad de Hueihue, para dos clases anuales.

Estadísticos	N	CV	p	Ho	D
HUEIHUE (2 años)	56	17.39	0.804	0.357	+0.075
HUEIHUE (3 años)	65	8.99	0.746	0.323	-0.190

N = Tamaño muestral.

CV = Coeficiente de variación.

p = Frecuencia del alelo más común.

Ho = Heterocigosidad observada.

D = Índice D (ver texto).

la distribución de frecuencias dentro de cada muestra.

La asociación entre heterocigosidad y longitud fue estadísticamente significativa sólo para la población de Quetalmahue ($r = 0,997$, $P < 0.05$), para Quihua no fue posible realizar el análisis de correlación. Sin embargo, en la Tabla I se puede observar que en todos los casos la clase de tamaño mayor tiene un mayor grado de heterocigosidad que la clase de tamaño menor, la probabilidad que esta tendencia haya sido por azar y que en todas las poblaciones se haya dado exactamente la misma tendencia es de 0.0156.

En nuestros datos se incluyen individuos de edades conocidas obtenidos de la ostricultura de Hueihue, lo cual nos permite separar los efectos que sobre la longitud de la concha tienen los componentes edad y crecimiento individual. Un individuo puede ser de mayor longitud porque ha crecido más rápido o porque es más viejo. En la Tabla II, comparamos los estadísticos de locus específicos para las dos clases anuales muestreadas en Hueihue. Los individuos de 2 años presentan un exceso neto de heterocigotos ($D = + 0.075$), mientras que lo de 3 años presentan un déficit de heterocigotos ($D = - 0.19$) y al mismo tiempo hay una disminución de la frecuencia del alelo común, esto muestra que existiría una tendencia a

perderse heterocigotos entre el segundo y tercer año. Por otra parte es notoria la disminución del coeficiente de variación entre el segundo y tercer año. Es interesante notar que dentro de cada edad se mantiene la tendencia a que las clases de tallas mayores tienen una mayor heterocigosidad que las tallas menores, y entre edades los heterocigotos se tienden a perder (son menos frecuentes que lo esperado) entre el segundo y tercer año.

DISCUSION

Del análisis de nuestros datos se observa que existe una tendencia de los heterocigotos a estar más representados en las clases de tallas mayores respecto de las clases menores. Además podemos agregar que de acuerdo a lo obtenido en las muestras de Hueihue, en la tendencia aludida estarían involucrados los componentes de crecimiento diferencial (dentro de edades) y de sobrevivencia diferencial de los heterocigotos (entre edades).

Se puede criticar el hecho que hemos trabajado con un solo locus, sin embargo, de acuerdo a Foltz *et al.* (1983) es esperable que en la posible relación de la heterocigosidad con la tasa de crecimiento cada locus muestre sobredominancia, y en consecuencia cualquier locus aparece como un buen candidato como marcador

de la tasa de crecimiento. Además nos agrega mayor información acerca de los posibles componentes genómicos que afectan la tasa de crecimiento. De hecho se ha analizado (resultados no publicados) para cuatro loci, una clase anual colectada en Pullinque y transferida a la ostricultura de Apiao, y demostramos una correlación significativa entre la tasa de crecimiento y la heterocigosidad multilocus, en la cual cada locus adiciona su efecto. Por otra parte, la anhidrasa carbónica de acuerdo a Wheeler (1975) es una enzima que en moluscos participa en los procesos de mineralización de la concha, por lo cual no sería sorprendente que las distintas aloenzimas de la anhidrasa carbónica mantuvieran distintas cinéticas bioquímicas y fisiológicas en el proceso de formación de la concha. Esta proposición aparece como una buena hipótesis que puede ser contrastada experimentalmente en el futuro, lo cual al mismo tiempo permitirá decidir si el locus CA está directamente involucrado en la relación o es sólo un marcador neutral de genes íntimamente ligados.

En la literatura son escasos los estudios en los cuales ha sido posible separar los efectos del crecimiento diferencial de los efectos de la edad. Entre aquellos en que ha sido posible (ver revisión de Zouros *et al.*, 1983), no todos muestran que los heterocigotos presenten una mayor probabilidad de sobrevivencia que los homocigotos. Wilkins (1978) estudia la distribución de la heterocigosidad en el locu PGI en clases de tamaño de 2 poblaciones de *Pecten maximus*, observando que, a diferencia de lo que nosotros encontramos, en las clases de tallas más pequeñas había más heterocigotos que en las tallas mayores. Lo anterior puede ser explicado si se considera que los animales mayores pueden ser heterogéneos en edad, por lo tanto si los individuos de distintas edades tuvieran distintas frecuencias génicas, se produciría una deficiencia de heterocigotos (efecto Wahlund). En nuestro caso para las muestras de Hueihue los individuos no serían hetero-

géneos en edad y por otra parte si se estuvieran mezclando individuos de distintas edades, esperábamos un aumento en el coeficiente de variación, lo cual no es verdadero. Otra posibilidad para explicar los resultados de Wilkins (1978) es suponer que los heterocigotos pueden crecer más rápido que los homocigotos, por lo cual llegan antes al tamaño mínimo legal, y pueden ser capturados con una mayor probabilidad por los pescadores. En nuestro caso esto puede estar sucediendo, pues los individuos de 3 años fueron muestreados al término de la época de comercialización (septiembre) en la ostricultura de Hueihue y estaban siendo enviados al mercado. Esto significa que se puede estar produciendo una remoción preferencial de heterocigotos, lo cual no ocurrirá en aquellas edades en que los individuos están bajo el tamaño mínimo legal, o el tamaño mínimo comercial. Lo anterior explicaría la aparente pérdida de heterocigosidad poblacional entre los individuos de tres años respecto de los de dos años. A diferencia de este resultado, Zouros *et al.* (1983) demuestran que para *Crassostrea virginica* los heterocigotos estaban más representados en las edades mayores, lo que interpretaron como una demostración que los heterocigotos tenían una mayor viabilidad que los homocigotos, sin embargo, se trataba de muestras que no fueron expuestas al proceso pesquero. Se puede argumentar que los heterocigotos pueden tener una mayor viabilidad, como una consecuencia del crecimiento diferencial, de tal modo que los animales más grandes pueden ser menos vulnerables a la predación (no humana), o a la muerte debido a fluctuaciones extremas en las condiciones del ambiente.

En las muestras en que no pudimos conocer la edad de los individuos, a pesar de provenir de localidades expuestas a pesquerías, se mantiene la tendencia al incremento de la heterocigosidad hacia las tallas mayores. Sin embargo para dar una respuesta causal es imprescindible poder determinar la edad de los indivi-

duos analizados, puesto que en una población las relaciones posibles de establecer entre la variabilidad genética y morfológica, pueden ser modulados por la interacción entre la capacidad de los heterocigotos a crecer más rápido, su mayor probabilidad de ser capturados por una pesquería que actúa selectivamente por tamaño y por la intensidad de esta presión pesquera.

Toda vez que encontremos asociaciones entre variabilidad genética y caracteres fenotípicos, como la talla máxima en recursos en explotación, es esperable que la presión pesquera afecte indirectamente la estructura genética (Guíñez *et al.*, 1986), problemática que en el próximo futuro debe considerarse en la teoría del manejo racional de los recursos renovables.

AGRADECIMIENTOS.

Trabajo parcialmente financiado por los proyectos FOMENTO DIUC 2F/84 e INB-047-R. Se agradece a Francisco Mo-

zó (ex administrador de la Ostricultura de Hueihue).

BIBLIOGRAFIA.

- Foltz, D.W.; Newkirk, G.F. y Zouros E. (1983). Genetics of growth rate in the American oyster: Absence of interaction among enzyme loci. *Aquaculture* 33: 157-165.
- Guíñez, R.; Monsalve, A. y Galleguillos, R. (1986). Correlaciones genético-morfológicas en la ostra chilena, *Tiostrea chilena* (Philippi, 1845) Chanley y Dinamani, 1980, del banco de Pullinque (Ancud, Chiloé). Enviada a *Biología Pesquera*, Chile.
- Guíñez, R. y Galleguillos, R. (1985). Clinal variation in morphological distance between genotypes at the carbonic anhydrase locus in the Chilean oyster, *Tiostrea chilensis* (Philippi, 1845). Chanley and Dinamani, 1980. *Brazil. J. Genetics* VIII (3): 609-616.
- Koehn, R.H. y Gaffney, P.M. (1984). Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 82:1-7.
- Levene, H. (1949). On a matching problem arising in genetics. *Am. Math. Statist.* 20:91-94.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1981). *Biometry*, 2nd edition, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 859 pp.
- Wheeler, A.P. (1985). Oyster mantle carbonic anhydrase: Evidence for plasma membrane-bound activity and for a role in bicarbonate transport. Ph. D. thesis, Duke University, Durham, North Carolina.
- Wilkins, N.P. (1978). Length-correlated changes in heterozygosity at an enzyme locus in the scallop (*Pecten maximus* L.). *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 9: 69-77.
- Zouros, E.; Singh, S.M. y Miles, H.E. (1980). Growth rate in oysters: An overdominant phenotype and its possible explanations. *Evolution* 34: 856-867.
- Zouros, E.; Singh, S.M.; Foltz, D.W. y Mallet (1983). Post-settlement viability in the American oyster (*Crassostrea virginica*): An overdominant phenotype. *Genet. Res. Camb.* 41: 259-270.