

## Efecto de la alimentación sobre la condición fisiológica del mejillón *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae), según el cociente ARN/ADN

María Angélica Bracho B.<sup>1</sup>, M.I. Segnini de Bravo<sup>2</sup>, Iris Viñoles<sup>1</sup> y K.S. Chung<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Escuela Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

<sup>2</sup> Departamento de Biología Marina, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente.  
Telefax: (58-93) 512017, 512276; fbravo@raudo.udo.edu.ve

Recibido 29-VI-2000. Corregido 3-VII-2000. Aceptado 6-VIII-2000.

**Abstract:** The green mussel, *Perna viridis*, became widespread in the northern coast of Sucre State since its arrival to Venezuela in 1993. RNA/DNA and Protein/DNA ratios were used to study the effect of starvation on its instantaneous growth. The mussels were collected in La Esmeralda and Chacopata, acclimatized in the laboratory for four weeks and maintained for another six weeks in two groups: one fed *ad libitum* and another without food (this later group was later fed for two additional weeks). Protein (colorimetric method), and nucleic acid concentrations (RNA and DNA, fluorometric method with ethidium bromide) were measured in adductor muscle, digestive gland and gills. The instantaneous growth was assessed using RNA/DNA and Protein/DNA ratios. These indexes were always higher in the fed organisms. Animals from Chacopata were in better physiological condition than those from La Esmeralda during the abstinence time (six weeks). Muscle was the best tissue to determine instantaneous growth. The RNA/DNA ratio is a reliable index to determine the physiological condition and instantaneous growth of this species.

**Key words:** Biochemical index, starvation, physiological condition, *Perna viridis*.

En las costas venezolanas, se encuentran dos especies exóticas de mejillones del género *Perna*: el mejillón marrón (sub-tropical), *Perna perna* el cual se estableció hace algunas décadas, y el mejillón verde (Indopacífico), *Perna viridis*, que apareció en 1993 en las costas del Golfo de Paria frente a Trinidad (Rylander *et al.* 1996). Desde entonces, la colonización se ha extendido a toda la costa norte del Estado Sucre así como también a las líneas costeras de las penínsulas de Araya y Paria. En la actualidad, poco se conoce acerca de esta especie, solamente se encuentra información sobre su biología (Sreenivasan *et al.*

1989); como indicador de estrés producido por metales pesados (Mathew & Damodaran 1997); su aspecto genético como un invasor marino (Hick & Tunnell 1993; Holland 1997), su distribución ecológica (Agard *et al.* 1992; Rylander *et al.* 1996) y su tolerancia térmica y salina (Segnini de Bravo *et al.* 1998).

Entre los índices que incorporan variables bioquímicas y significados fisiológicos en bivalvos indicando su estado metabólico se encuentra el cociente ARN/ADN (Lucas & Beninger 1985). Este índice está relacionado con el crecimiento instantáneo de los organismos. El crecimiento involucra la formación

mos. El crecimiento involucra la formación de tejido, lo cual se lleva a efecto a través de la biosíntesis de proteínas, proceso dependiente del contenido de ARN en las células. Por lo tanto, el contenido de éste en una muestra de tejido podría ser usado para estimar la tasa de crecimiento. Por otra parte, la biosíntesis de proteínas puede variar dependiendo de las condiciones nutricionales u otros factores ambientales (Lodeiros *et al.* 1996). Wright & Hetzel (1985) señalaron que la concentración de proteínas es reducida por el ayuno debido a una disminución en la concentración de ARN. El ADN es un indicador del tamaño celular porque sus valores cuantitativos no cambian en respuesta a las alteraciones ambientales agudas en términos cortos de variación de las condiciones alimenticias (Bullow 1987). El cociente ARN/ADN ha sido usado con este fin en otros bivalvos: Frantzis *et al.* (1993) indicaron que en la almeja *Abra ovata* el índice ARN/ADN responde rápidamente a cambios en la tasa de crecimiento y es muy sensible a los efectos ambientales, especialmente a la disponibilidad de alimento; Nusetti & Morales (1988) determinaron el crecimiento de diferentes tejidos de *Perna perna* en función del cociente ARN/ADN y Proteína/ADN; Betancourt *et al.* (1995) trabajaron con juveniles de la vieira *Euvola zizac* utilizando el cociente ARN/ADN como indicadora del crecimiento instantáneo en retrocruces y Gómez *et al.* (1998) en *Lima scabra*, sometida a un medio con  $\text{Cu}^{++}$ , observaron que éste compromete sus proteínas musculares de reserva debido al estrés provocado por el tóxico.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la privación de la dieta sobre la condición fisiológica y el crecimiento instantáneo de *Perna viridis*, recolectados en dos localidades de las costas nororientales de Venezuela, midiendo las concentraciones de ARN, ADN y proteínas en el músculo aductor, la glándula digestiva y las branquias y expresadas como índices ARN/ADN y Proteína/ADN.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de *Perna viridis* utilizados en esta investigación fueron recolectados en La Esmeralda (10° 40' N, 63° 30' W) y Chacopata (10° 40' N, 63° 50' W), Estado Sucre, Venezuela, y trasladados al laboratorio, para su adaptación por un período de cuatro semanas, donde fueron aclimatados a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  en acuarios de 60 litros (2 organismos/l), alimentados *ad libitum* con una mezcla de monocultivos microalgales (*Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis aff.* y *Tetraselmis chuii*), a una concentración de 30 000 cél/ml. Al finalizar este período de adaptación, los ejemplares con tallas comprendidas entre 30 y 35 mm de longitud (medidos antero-posteriormente) fueron distribuidos equitativamente en acuarios de 60 litros de capacidad y mantenidos en dos regímenes alimenticios por un período de seis semanas: un grupo alimentado *ad libitum* en las mismas condiciones anteriores y el otro mantenido en ayunas. Posteriormente, a este último grupo se le suministró alimento *ad libitum* por dos semanas adicionales para conocer el tiempo que necesitaban estos bivalvos para alcanzar el contenido inicial de ácidos nucleicos. Durante todo el período experimental, el agua de mar fue filtrada para remover partículas de diámetro mayores de 1  $\mu\text{m}$  y tratada por 15 minutos en un filtro UV. La concentración de oxígeno se mantuvo a más del 90% de saturación y el pH fluctuó entre 7 y 8. Cada semana se disectaron 10 organismos de cada grupo, separando en cada uno dellos, el músculo aductor, la glándula digestiva y las branquias, los cuales se congelaron inmediatamente en gas carbónico y se guardaron en envases previamente rotulados a la temperatura de  $-17^\circ\text{C}$  para su análisis posterior.

Los ácidos nucleicos (ARN, ADN) se determinaron por el método fluorométrico con bromuro de etidio y heparina (Karsten & Wolleberger 1972, 1977). Para ello, se tomaron entre 10 y 20 mg de cada tejido y se homogeneizaron en 3 ml de un buffer fosfato salino (PBS), pH: 7,5 con un homogeneizador

de alta velocidad durante 30 s en tres tiempos de 10 s cada uno. Esto se realizó en tubos de ensayos sumergidos en hielo a temperatura de aproximadamente 4 °C. Inmediatamente el homogeneizado fue centrifugado a 10 000 g por 2 min en una centrifuga y el sobrenadante obtenido fue usado para determinar las concentraciones de las biomoléculas en estudio (ARN, ADN y proteínas).

Para la determinación de la fluorescencia de ADN se tomaron 300 µl del sobrenadante y se unieron con 300 µl de PBS, 300 µl de heparina y 300µl de ARNasa. Igual procedimiento se utilizó para determinar la fluorescencia de ADN+ARN pero sin agregar la ARNasa. Los tubos con las muestras fueron incubados a 37 °C por 30 min en un baño de agua termoregurable, seguidamente se dejaron a temperatura ambiente por 2 min. A cada muestra, excepto el blanco, se le añadió bromuro de etidio y se agitó con un agitador magnético dejándola reposar por 3 o 4 min para que ocurriera la reacción electrostática entre el bromuro de etidio y las macromoléculas de ADN y ARN. Los tubos que se utilizaron fueron de borosilicato desechable (12 x 12 mm) y los reactivos se prepararon según lo indicado por Karsten & Wolleberger (1972, 1977). Cada muestra fue analizada por triplicado. La lectura de la fluorescencia de las muestras se llevó a cabo usando un fluorómetro digital con longitudes de onda de excitación y emisión de 585 y 360 nm, respectivamente. La fluorescencia del ARN se determinó por diferencia entre la obtenida para ARN+ADN y ADN. La cuantificación se estimó tomando una curva estándar de un ADN y/o un ARN comercial; a los cuales se les determinaron los valores de las pendientes e interceptos mediante el método de los mínimos cuadrados. La concentración de los ácidos nucleicos fue expresada en µg/mg de tejido húmedo.

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford (1976). Para ello, 50 µl del sobrenadante del homogeneizado de cada uno de los tejidos se colocó en 2 950 µl del reactivo "Comassie Blue", se agitó la muestra

y se dejó reposar por 10 min (se hicieron cinco réplicas por cada muestra). Posteriormente, la absorbancia fue medida en un Spectronic 20-D a una longitud de onda de 590 nm. La cuantificación de las proteínas se obtuvo por interpolación en una curva estándar utilizando suero de albúminas de bovino como patrón. La concentración de proteínas se expresó en µg/mg de peso húmedo.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un tratamiento estadístico, con un nivel de confiabilidad del 95%, empleando un análisis de varianza y una prueba *a posteriori* por el método de las comparaciones simultáneas de Duncan con el objeto de establecer diferencias significativas entre las medias de cada uno de los índices ARN/ADN y Proteína/ADN con respecto a la condición alimenticia, localidad, tejidos y el tiempo de exposición

## RESULTADOS

En el Cuadro 1, se muestran las concentraciones de ADN, ARN y proteínas (µg/mg) y los cocientes ARN/ADN y Proteína/ADN de los ejemplares recolectados en Chacopata y La Esmeralda al momento de la captura, observándose que la glándula digestiva a pesar de presentar la mayor concentración de proteínas, fue el tejido con menor crecimiento instantáneo (relación ARN/ADN:  $1.35 \pm 0.11$  para la Esmeralda y  $1.77 \pm 0.07$  para Chacopata). El mayor índice Proteína/ADN fue encontrado en el tejido muscular ( $255.93 \pm 20.16$  en La Esmeralda y  $931.42 \pm 10.51$  en Chacopata).

Los cocientes ARN/ADN y Proteína/ADN (Cuadros 2 y 3) presentaron diferencias altamente significativas (Anova,  $P < 0.001$ ) entre las localidades de La Esmeralda y Chacopata, el tiempo de exposición y el tipo de tejido estudiado. Las pruebas *a posteriori* arrojaron la formación de dos grupos para el tiempo de exposición y tres grupos independientes para el tipo de tejido. Estos índices fueron siempre mayores en los mejillones alimentados que en los mantenidos en abstinencia.

CUADRO 1

Valores promedio obtenidos de las concentraciones de ADN<sub>SD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), ARN<sub>SD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) y proteína<sub>SD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) y los cocientes ARN/ADN<sub>SD</sub> y Proteína/ADN<sub>SD</sub> en el músculo aductor, glándula digestiva y branquias de *Perna viridis*, para el momento de su recolecta en La Esmeralda y Chacopata..  $n = 10$  organismos/estación.

TABLE 1

Mean values obtained from DN<sub>ASD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), RN<sub>ASD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) and protein<sub>SD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), and RNA/DN<sub>ASD</sub> and Protein/DN<sub>ASD</sub> indexes in the adductor muscle, digestive gland and gills of *Perna viridis*, at the time they were collected in La Esmeralda and Chacopata.

Tejido	ADN	ARN	Proteínas	ARN/ADN	Proteína/ADN
<b>LA ESMERALDA</b>					
Músculo	$1.50 \pm 0.13$	$2.05 \pm 0.35$	$383.90 \pm 10.15$	$1.37 \pm 0.15$	$255.93 \pm 20.16$
Glándula	$2.40 \pm 0.25$	$3.24 \pm 0.40$	$608.71 \pm 71.85$	$1.35 \pm 0.11$	$253.63 \pm 28.45$
Branquias	$2.12 \pm 0.25$	$3.08 \pm 0.41$	$403.73 \pm 40.30$	$1.45 \pm 0.25$	$190.44 \pm 18.82$
<b>CHACOPATA</b>					
Músculo	$0.43 \pm 0.08$	$1.08 \pm 0.20$	$400.51 \pm 22.14$	$2.51 \pm 0.12$	$931.42 \pm 10.51$
Glándula	$3.33 \pm 0.18$	$5.88 \pm 0.75$	$748.38 \pm 24.53$	$1.77 \pm 0.07$	$224.74 \pm 12.15$
Branquias	$0.66 \pm 0.02$	$1.56 \pm 0.90$	$339.99 \pm 30.26$	$2.36 \pm 0.10$	$515.14 \pm 32.98$

**Relaciones ARN/ADN y Proteína/ADN en el músculo aductor de *Perna viridis* sometidos a diferentes regímenes alimenticios:** los resultados de las concentraciones de los ácidos nucleicos se presentan en el Cuadro 4. En la figura 1A se observa un incremento gradual del índice ARN/ADN:  $1.40 \pm 0.15$  hasta  $2.70 \pm 0.29$  para la estación de La Esmeralda, y  $1.61 \pm 0.03$  hasta  $5.34 \pm 1.14$  para Chacopata, y una disminución continua, en todo el período experimental, en condiciones de estrés alimenticio ( $1.80 \pm 0.10$  hasta  $0.89 \pm 0.09$  en la Esmeralda y desde

$3.64 \pm 0.46$  hasta  $0.93 \pm 0.09$  en Chacopata). Las mayores diferencias se obtuvieron en Chacopata, cerca de 4 veces su valor inicial para los no alimentados y aproximadamente 3,5 veces su valor inicial para los alimentados. El cociente Proteína/ADN (Fig. 1B) para los organismos alimentados, presentó un aumento progresivo en La Esmeralda ( $269.86 \pm 9.80$  a  $610.73 \pm 23.72$ ), y se mantuvo relativamente constante, con pequeñas fluctuaciones para los de Chacopata ( $1\ 326.18 \pm 60.34$  a  $1\ 454.27 \pm 79.23$ ). Para los no alimentados, se observó un decrecimiento pro-

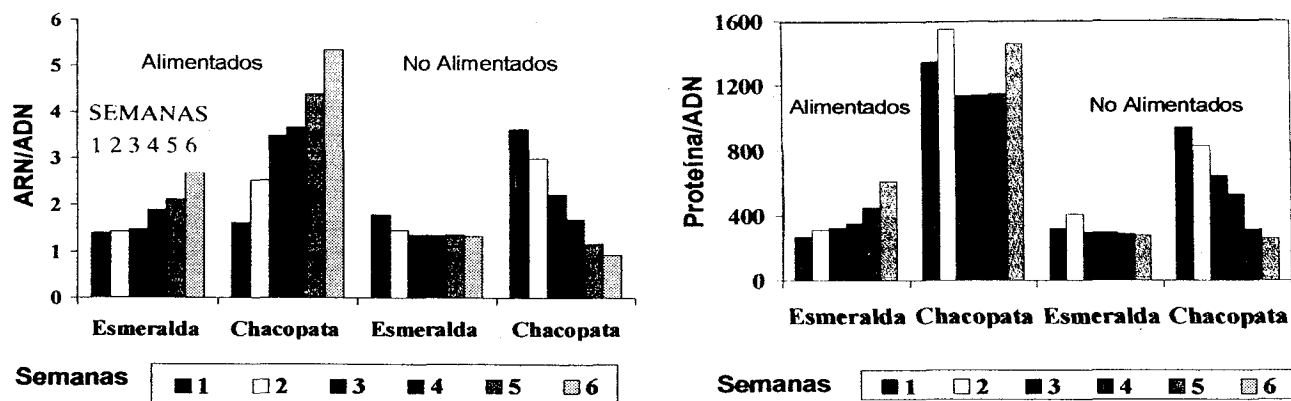


Fig. 1. Índices de crecimiento en el músculo de *Perna viridis* cultivados durante seis semanas en dos regímenes alimenticios y recolectados en las localidades de La Esmeralda y Chacopata. A. ARN/ADN. B. Proteína/ADN

Fig. 1. Growth ratio for the adductor muscle of *Perna viridis* cultured for six weeks under two feeding regimes and collected in La Esmeralda and Chacopata. A. RNA/DNA. B. Protein/DNA.

CUADRO 2

Resumen estadístico para el cociente ARN/ADN en el músculo aductor (M), glándula digestiva (G) y branquias (B) de *Perna viridis*, alimentados y no alimentados; recolectados en Chacopata y La Esmeralda.

TABLE 2

Statistical summary for the RNA/DNA index in the adductor muscle (M), digestive gland (G) and gills (B) of *Perna viridis*, fed and not fed, collected in La Esmeralda and Chacopata.

Fuente de Variación	G.L.	F <sub>S</sub>	Nivel de significación	Duncan
Estación	1	382.628	***	
Régimen	1	273.720	***	
Tiempo (Semana)	5	4.574	***	3 2 1 4 5 5 6
Tejido	2	28.158	***	G B M

p < 0.001 = altamente significativo  
n = 720

Los promedios conectados no son significativamente diferentes.

gresivo en ambas estaciones ( $320.16 \pm 23.30$  a  $185.60 \pm 15.40$  en la Esmeralda y  $941.85 \pm 60.43$  a  $259.91 \pm 23.54$  en Chacopata).

#### Relaciones ARN/ADN y Proteína/ADN

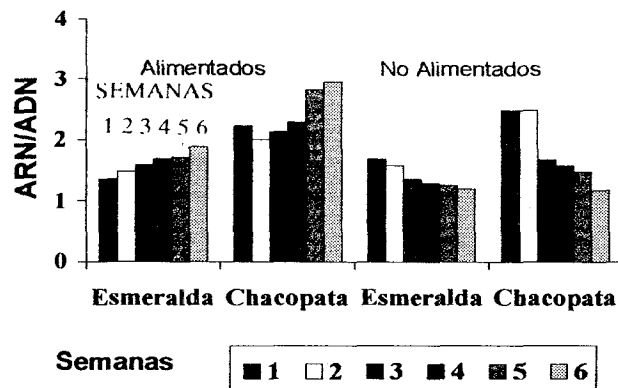


Fig. 2. Índices de crecimiento en la glándula digestiva de *Perna viridis* cultivados durante seis semanas en dos regímenes alimenticios y recolectados en las localidades de La Esmeralda y Chacopata. A. ARN/ADN. B. Proteína/ADN

Fig. 2. Growth ratio for the digestive gland of *Perna viridis* cultured for six weeks under two feeding regimes and collected in La Esmeralda and Chacopata A. RNA/DNA. B. Protein/DNA.

CUADRO 3

Resumen estadístico para el cociente proteína/ADN en el músculo aductor (M), glándula digestiva (G) y branquias (B) de *Perna viridis*, alimentados y no alimentados; recolectados en Chacopata y La Esmeralda.

TABLE 3

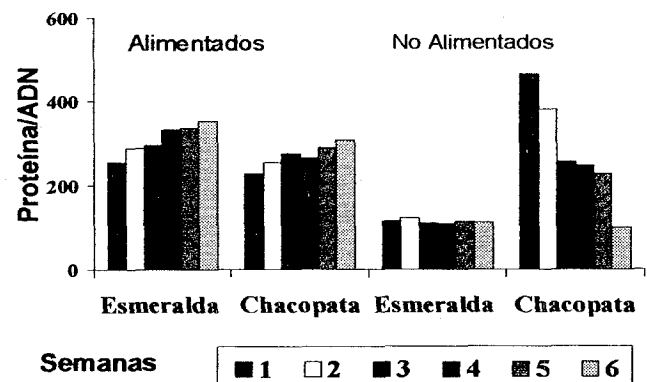
Statistical resume for RNA/DNA index in the adductor muscle (M), digestive gland (G) and gills (B) of *Perna viridis*, fed and not fed, collected in La Esmeralda and Chacopata

Fuente de Variación	G.L.	F <sub>S</sub>	Nivel de significación	Duncan
Estación	1	625.549	***	
Régimen	1	249.000	***	
Tiempo (semana)	5	8.904	***	6 4 5 3 2 1
Tejido	2	475.774	***	G B M

p < 0.001 = altamente significativo  
NS = No significativo  
n = 720

Los promedios conectados no son significativamente diferentes.

en la glándula digestiva de *Perna viridis* sometidos a diferentes regímenes alimenticios: con respecto a este tejido los resultados de las concentraciones de los ácidos nucle-



CUADRO 4

Valores promedio de las concentraciones de ADN<sub>SD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), ARN<sub>SD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) y Proteínas<sub>SD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) en el músculo aductor de *Perna viridis*, alimentados y no alimentados, recolectados en Chacopata y La Esmeralda. n = 10 organismos/semana/estación

TABLE 4

Mean values obtained from DN<sub>ASD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), RN<sub>ASD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) and Proteins<sub>SD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), in the adductor muscle of *Perna viridis*, fed and not fed, collected in La Esmeralda and Chacopata

Semana	ADN	ARN	Proteínas
<b>LA ESMERALDA</b>			
Alimentados			
1	1.43 ± 0.09	2.00 ± 0.29	385.90 ± 9.55
2	1.92 ± 0.43	2.73 ± 0.45	599.77 ± 43.30
3	1.91 ± 0.23	2.83 ± 0.48	628.17 ± 33.80
4	1.79 ± 0.27	3.40 ± 0.24	635.72 ± 13.50
5	1.34 ± 0.13	2.82 ± 0.26	599.37 ± 77.50
6	0.93 ± 0.07	2.51 ± 0.27	567.98 ± 24.10
No alimentados			
1	1.93 ± 0.13	3.47 ± 0.14	617.90 ± 72.60
2	1.17 ± 0.12	1.72 ± 0.27	477.32 ± 34.40
3	1.34 ± 0.13	1.83 ± 0.32	399.08 ± 64.10
4	1.31 ± 0.14	1.77 ± 0.11	389.32 ± 30.40
5	1.25 ± 0.11	1.70 ± 0.28	363.72 ± 33.50
6	1.77 ± 0.09	1.57 ± 0.11	328.52 ± 25.20
<b>CHACOPATA</b>			
Alimentados			
1	0.33 ± 0.06	0.53 ± 0.13	437.64 ± 39.50
2	0.31 ± 0.03	0.78 ± 0.11	480.30 ± 40.90
3	0.45 ± 0.08	1.59 ± 0.16	517.32 ± 17.10
4	0.48 ± 0.06	1.77 ± 0.27	552.52 ± 34.40
5	0.48 ± 0.08	2.13 ± 0.38	557.85 ± 41.40
6	0.41 ± 0.12	2.19 ± 0.29	596.25 ± 44.60
No Alimentados			
1	0.53 ± 0.05	1.93 ± 0.15	499.18 ± 23.50
2	0.57 ± 0.01	1.72 ± 0.89	476.04 ± 42.30
3	0.66 ± 0.05	1.49 ± 0.22	429.85 ± 14.50
4	0.66 ± 0.11	1.13 ± 0.10	353.05 ± 27.40
5	0.76 ± 0.08	0.88 ± 0.12	239.02 ± 77.30
6	0.87 ± 0.09	0.81 ± 0.06	226.12 ± 20.90

icos se presentan en el Cuadro 5. Los índices ARN/ADN y Proteína/ADN (Fig. 2 A y B) mostraron fluctuaciones relativamente pequeñas en ambas localidades, para los mejillones alimentados (ARN/ADN: La Esmeralda:  $1.36 \pm 0.15$  a  $1.89 \pm 0.32$ , Chacopata:  $2.02 \pm 0.29$  a  $2.96 \pm 0.49$ ; para el índice Proteína/ADN:  $255.95 \pm 33.24$  a  $352.00 \pm 29.78$  y  $228.54 \pm 79.84$  a  $308.08 \pm 84.16$  en las estaciones antes mencionadas, respectivamente). Esta conducta se mantuvo para los no alimentados en La Esmeralda en el ARN/ADN:  $1.68 \pm 0.23$  a  $1.20 \pm 0.09$ , y

para el cociente Proteína/ADN:  $117.82 \pm 36.93$  a  $113.98 \pm 32.90$  y hubo una disminución progresiva en Chacopata durante las seis semanas de ayuno (ARN/ADN:  $2.48 \pm 0.27$  a  $1.18 \pm 0.15$ ; Proteína/ADN:  $464.91 \pm 34.40$  a  $102.06 \pm 24.15$ ).

**Relaciones ARN/ADN y Proteína/ADN en las branquias de *Perna viridis* sometidos a diferentes regímenes alimenticios:** los resultados obtenidos para las concentraciones de ácidos nucleicos y de proteínas se exponen en el Cuadro 6. Para los organismos alimentados de ambas localidades el cociente

## CUADRO 5

Valores promedio de las concentraciones de ADN (µg/mg), ARN (µg/mg) y Proteínas (µg/mg) en la glándula digestiva de *Perna viridis*, alimentados y no alimentados, recolectados en Chacopata y La Esmeralda. n = 10 organismos/semana/estación

TABLE 5

Mean values obtained from DNASD (µg/mg), RNASD (µg/mg) and ProteinsSD (µg/mg), in the digestive gland of *Perna viridis*, fed and not fed, collected in La Esmeralda and Chacopata

Semana	ADN	ARN	Proteínas
<b>LA ESMERALDA</b>			
<b>Alimentados</b>			
1	2.39 ± 0.23	3.24 ± 0.33	611.71 ± 72.94
2	2.30 ± 0.27	3.41 ± 0.31	664.62 ± 33.84
3	2.12 ± 0.34	3.38 ± 0.51	627.63 ± 44.51
4	1.84 ± 0.32	3.10 ± 0.45	614.03 ± 56.48
5	1.89 ± 0.32	3.25 ± 0.65	634.72 ± 43.85
6	1.68 ± 0.13	3.17 ± 0.37	591.36 ± 75.10
<b>No alimentados</b>			
1	5.22 ± 1.14	8.79 ± 1.44	615.02 ± 64.23
2	4.83 ± 0.94	7.66 ± 1.48	597.00 ± 43.36
3	3.40 ± 0.26	4.61 ± 0.15	378.76 ± 49.27
4	3.27 ± 0.34	4.26 ± 0.68	359.82 ± 27.22
5	3.02 ± 0.22	3.81 ± 0.72	351.45 ± 16.95
6	3.08 ± 0.26	3.69 ± 0.39	351.05 ± 42.82
<b>CHACOPATA</b>			
<b>Alimentados</b>			
1	3.58 ± 0.35	7.94 ± 0.48	818.18 ± 93.88
2	4.49 ± 0.28	9.02 ± 1.01	1144.72 ± 77.09
3	4.33 ± 0.70	9.24 ± 0.62	1193.78 ± 55.02
4	4.52 ± 0.45	10.34 ± 1.19	1199.33 ± 85.42
5	4.55 ± 0.51	12.88 ± 0.54	1320.50 ± 44.64
6	4.49 ± 0.35	13.27 ± 0.43	1383.30 ± 60.34
<b>No Alimentados</b>			
1	3.23 ± 1.06	8.02 ± 1.13	1501.65 ± 87.09
2	3.35 ± 0.37	8.03 ± 0.65	1207.44 ± 86.92
3	4.21 ± 0.56	7.07 ± 0.93	1078.37 ± 55.94
4	4.18 ± 0.41	6.58 ± 1.72	1038.37 ± 28.09
5	4.28 ± 0.23	6.58 ± 1.78	979.81 ± 65.02
6	4.64 ± 0.33	5.47 ± 0.76	473.57 ± 92.61

ARN/ADN (Fig. 3A) exhibió un incremento continuo durante todo el período experimental. Los grupos mantenidos en ayunas en ambas localidades tuvieron un comportamiento diferente: en La Esmeralda aumentaron levemente desde  $1.04 \pm 0.13$  hasta  $1.36 \pm 0.05$  y los recolectados en Chacopata mostraron una disminución desde  $3.01 \pm 0.22$  hasta  $0.89 \pm 0.09$  desde la primera hasta la sexta semana respectivamente. Para el cociente Proteína/ADN (Fig. 3B), los organismos alimentados en ambas estaciones presentaron un incremento constante, siendo en Chacopata donde se observó el mayor cre-

cimiento. En los ejemplares mantenidos en abstinencia los valores variaron desde  $458.75 \pm 20.59$  hasta  $234.35 \pm 10.48$  y desde  $871.86 \pm 11.21$  hasta  $425.58 \pm 49.70$  en La Esmeralda y Chacopata, respectivamente.

**Realimentación después de la abstinencia:** con el objeto de conocer en cuanto tiempo estos organismos recuperaban su condición fisiológica inicial después de seis semanas de ayuno (Cuadro 7), a los ejemplares recolectados en La Esmeralda se les suministró alimento por un lapso de dos semanas adicionales, obteniéndose al cabo de este período, valores (ARN/ADN  $2.65 \pm 0.18$  y

CUADRO 6

Valores promedio de las concentraciones de ADN<sub>SD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), ARN<sub>SD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) y Proteínas<sub>SD</sub> en las branquias de *Perna viridis*, alimentados y no alimentados, recolectados en Chacopata y La Esmeralda . n = 10 organismos/semana/estación

TABLE 6

Mean values obtained from DN<sub>ASD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), RN<sub>ASD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) and Proteins<sub>SD</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), in the gills of *Perna viridis*, fed and not fed, collected in La Esmeralda and Chacopata

Semana	ADN	ARN	Proteínas
<b>LA ESMERALDA</b>			
Alimentados			
1	2.12 ± 0.16	3.17 ± 0.44	407.98 ± 43.33
2	2.03 ± 0.32	3.30 ± 0.56	400.52 ± 46.32
3	1.83 ± 0.17	3.15 ± 0.68	392.52 ± 13.82
4	1.79 ± 0.18	3.13 ± 0.39	387.72 ± 13.08
5	1.61 ± 0.21	2.88 ± 0.35	377.05 ± 21.04
6	1.35 ± 0.19	2.76 ± 0.31	332.25 ± 17.43
No alimentados			
1	2.26 ± 0.41	2.34 ± 0.42	1036.78 ± 110.70
2	2.21 ± 0.21	2.65 ± 0.36	726.54 ± 109.71
3	2.12 ± 0.34	3.11 ± 0.41	702.01 ± 136.73
4	2.08 ± 0.38	2.98 ± 0.39	490.10 ± 32.64
5	2.03 ± 0.24	2.91 ± 0.38	483.45 ± 34.45
6	1.91 ± 0.66	2.59 ± 0.34	447.61 ± 32.19
<b>CHACOPATA</b>			
Alimentados			
1	0.54 ± 0.15	1.00 ± 0.12	399.66 ± 46.38
2	0.60 ± 0.13	1.38 ± 0.32	400.62 ± 39.36
3	0.53 ± 0.08	1.32 ± 0.31	399.98 ± 41.92
4	0.50 ± 0.07	1.37 ± 0.31	420.25 ± 13.02
5	0.49 ± 0.07	1.38 ± 0.11	422.38 ± 30.25
6	0.48 ± 0.06	1.46 ± 0.19	426.97 ± 28.05
No alimentados			
1	0.69 ± 0.03	2.08 ± 0.33	601.58 ± 62.54
2	0.76 ± 0.15	1.99 ± 0.42	584.52 ± 50.36
3	0.88 ± 0.16	1.37 ± 0.15	488.41 ± 46.76
4	0.91 ± 0.02	1.17 ± 0.15	478.49 ± 22.65
5	0.90 ± 0.11	0.87 ± 0.11	469.32 ± 13.77
6	0.99 ± 0.05	0.88 ± 0.04	421.32 ± 29.96

Proteína/ADN  $634.87 \pm 46.61$ ) que superaron el valor inicial de los cocientes

Es importante hacer notar que durante todo el período experimental, la supervivencia fue casi del 100%; por otra parte, aquellos organismos que presentaron gónadas o residuos de ellas fueron descartados ya que existen evidencias de que estos organismos desvían su energía para la formación de gónadas (Lodeiros *et al.* 1996).

## DISCUSION

La condición fisiológica y el crecimiento

de los organismos son afectados por los factores ambientales siendo la disponibilidad de alimento una de las más importantes (Frantzis *et al.* 1993, Lodeiros *et al.* 1996). De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede evidenciar que el estado nutricional está directamente relacionado con el cociente ARN/ADN, la cual es un índice fisiológico utilizado para determinar el crecimiento instantáneo en bivalvos (Lucas & Beninger 1985). Esta relación se incrementó en los organismos alimentados y disminuyó en los mejillones mantenidos en ayunas. Los resultados concuerdan con los reportados por



CUADRO 7

Valores promedio obtenidos de las concentraciones de ADNSD ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), ARN SD ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) y ProteínasSD y los cocientes ARN/ADN y Proteína/ADN en el músculo aductor, glándula digestiva y branquias de *Perna viridis*, en el período de re-alimentación de dos semanas y después de seis semanas de ayuno, recolectados en La Esmeralda.  $n = 10$  organismos/semana/estación.

TABLE 7

Mean values obtained from DNASD ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), RNASD ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) and ProteinsSD ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), and RNA/DNASD and Protein/DNASD ratio in the adductor muscle, digestive gland and gills of *Perna viridis*, re-fed for another two weeks and after six weeks of abstinence, collected in La Esmeralda.

Semana	ADN	ARN	Proteína	ARN/ADN	Proteína/ADN
<b>Músculo</b>					
1	1.93 $\pm$ 0.13	3.47 $\pm$ 0.14	617.90 $\pm$ 72.60	1.80 $\pm$ 0.10	320.16 $\pm$ 23.20
7	1.29 $\pm$ 0.29	2.13 $\pm$ 0.45	702.20 $\pm$ 11.20	1.65 $\pm$ 0.04	544.34 $\pm$ 20.52
8	1.05 $\pm$ 0.25	2.75 $\pm$ 0.29	666.61 $\pm$ 76.74	2.62 $\pm$ 0.18	634.87 $\pm$ 46.61
<b>Glándula</b>					
1	5.22 $\pm$ 1.14	8.79 $\pm$ 1.44	615.02 $\pm$ 64.23	1.68 $\pm$ 0.23	117.82 $\pm$ 36.93
7	2.78 $\pm$ 0.36	4.46 $\pm$ 0.95	873.12 $\pm$ 83.51	1.60 $\pm$ 0.22	314.07 $\pm$ 29.74
8	2.43 $\pm$ 0.22	3.68 $\pm$ 0.37	876.32 $\pm$ 24.93	1.51 $\pm$ 0.26	360.63 $\pm$ 22.21
<b>Branquias</b>					
1	2.26 $\pm$ 0.41	2.34 $\pm$ 0.42	1036.78 $\pm$ 110.70	1.04 $\pm$ 0.13	458.75 $\pm$ 20.59
7	1.06 $\pm$ 0.13	1.89 $\pm$ 0.29	628.31 $\pm$ 80.81	1.78 $\pm$ 0.24	592.75 $\pm$ 58.61
8	0.84 $\pm$ 0.31	1.91 $\pm$ 0.69	619.82 $\pm$ 94.41	2.27 $\pm$ 0.36	737.88 $\pm$ 38.31

Wright & Hetzel (1985) quienes trabajaron con la ostra *Crassostrea virginica* y encontraron que el cociente ARN/ADN fue más pequeño cuando los bivalvos fueron sometidos al ayuno y asimismo con los obtenidos en experimentos similares realizados en peces (Segnini de Bravo & Chung 1997) donde se estudió la lisa *Mugil curema* en los cuales el cociente disminuyó en un 53% después de 9

días de ayuno y un 86% a los 21 días. En este experimento, el decrecimiento en el tejido muscular del mejillón *Perna viridis* fue de un 25% en La Esmeralda a los 21 días y cerca de 50% a los 42 días de ayuno. Para la localidad de Chacopata fue de un 40% a los 21 días de ayuno y un 75% a los 42 días de ayuno. Las diferencias encontradas, entre las diferentes especies, permite sugerir que el cociente

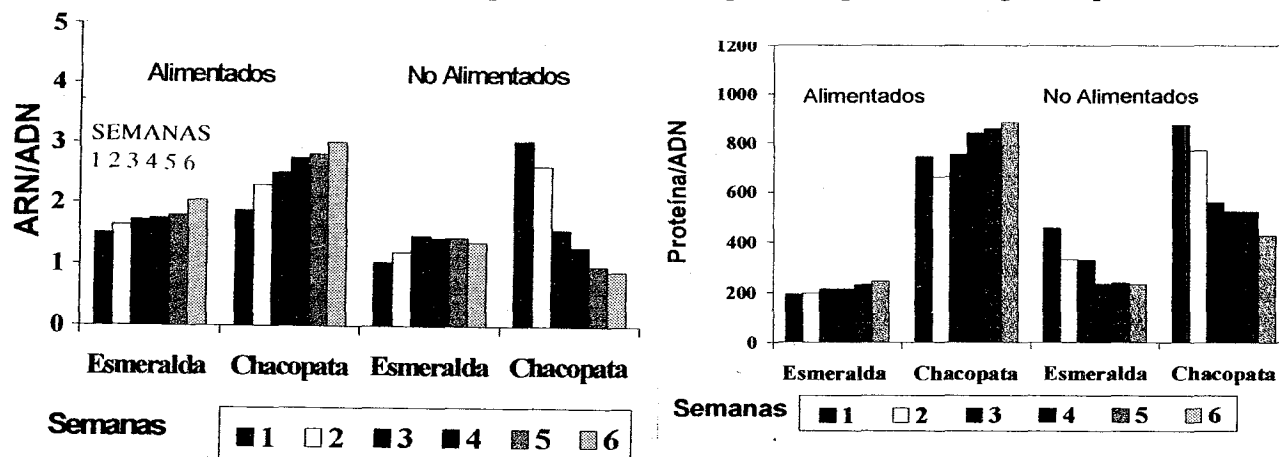


Fig. 3. Índices de crecimiento en las branquias de *Perna viridis* cultivados durante seis semanas en dos regímenes alimenticios y recolectados en las localidades de La Esmeralda y Chacopata. A. ARN/ADN. B. Proteína/ADN.

Fig. 3. Growth ratio for the gills of *Perna viridis* cultured for six weeks under two feeding regimes and collected in La Esmeralda and Chacopata. A. RNA/DNA. B. Protein/DNA

ARN/ADN en el tejido muscular en el mejillón *Perna viridis* responde más lentamente en presencia del estrés alimenticio que los vertebrados tales como peces, en los cuales a las 24 horas de abstinencia hay una caída significativa del índice (Segnini de Bravo & Chung 1997). Este descenso en el tejido muscular debido a la abstinencia indica un menor crecimiento instantáneo en este bivalvo. En Chacopata se evidenció una disminución de este índice y un declive continuo de la energía de reserva. La conducta fue diferente en La Esmeralda ya que el cociente en este tejido fue más pequeño en la primera semana de experimentación a esta condición. Posteriormente se mantuvo casi constante por cuatro semanas al cabo de las cuales se observó otra baja significativa, indicando que este organismo ante un estrés alimenticio responde utilizando su energía de reserva del tejido muscular, es decir que tiene un comportamiento metabólico de ajuste energético; pero hasta cierto tiempo, ya que después muestra una aclimatación al estrés, resultando en un uso muy lento o ninguno de la energía de reserva (Wright & Hetzel 1985).

Después de 42 días de abstinencia (Cuadro 7), al suministrarle alimento a los mejillones recolectados en La Esmeralda se determinó que el índice ARN/ADN en la primera semana posterior a este período ( $1.65 \pm 0.04$ ) alcanzó casi el nivel obtenido después de la primera semana de abstinencia ( $1.80 \pm 0.10$ ), y para la segunda semana este valor fue sobrepasado en casi un 50% ( $2.62 \pm 0.18$ ). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Wright & Hetzel (1985) para la ostra americana, en la cual, cuando los organismos fueron re-alimentados, este índice aumentó pero no con la misma magnitud que los encontrados en este trabajo. Estos mismos autores señalaron que esta relación responde rápidamente a cambios en la tasa de crecimiento y es muy sensible a los efectos ambientales, especialmente la disponibilidad de alimento. Vélez (comunicación personal) sostiene que el pectínido *Euvola ziczac* en condiciones de estrés usa sus reservas muscu-

lares, ya que este tejido es reconocido como el principal lugar de reserva de glucógeno. Por otra parte, estudios realizados en pectínidos enfatizan también la importancia del músculo aductor como el sitio de reserva energética y la relacionan con la necesidad que tiene el mejillón de una fuente de energía fácilmente disponible para abrir y cerrar las valvas (Gómez 1991).

Cuando el crecimiento se mide mediante el índice Proteína/ADN como indicador del tamaño celular (Fig.1 A y B) se encuentra que los organismos no alimentados de ambas localidades tienen una disminución de la síntesis proteica y por lo tanto un menor índice Proteína/ADN, indicando que estos organismos están en estrés por la falta de alimento y que una gran porción de las proteínas es utilizada para resolver ese problema.

Los resultados observados en los organismos no alimentados, en ambas localidades, para los cocientes ARN/ADN y Proteína/ADN en la glándula digestiva pueden ser explicados tomando el hecho de que ésta es un órgano central del metabolismo general y dirige la movilización y redistribución de energía entre los diversos órganos. Este tejido participa en la actividad metabólica presentando una mayor cantidad de ARN para la formación de nuevos tejidos en la síntesis de proteínas. Jordán (1990), describió que la glándula movilizaba sus proteínas para el mantenimiento de sus funciones básicas metabólicas y el crecimiento en el ambiente natural. Asimismo, se ha demostrado la participación de la glándula como órgano de transferencia de reserva energética (Gómez, 1991). Nusetti y Morales (1988), demostraron que la glándula digestiva en el mejillón *Perna perna* mostró un aumento de tamaño celular acompañado de una acumulación de proteínas implicando una elevada tasa de biosíntesis proteica y una baja proliferación celular. Los resultados de este trabajo concuerdan con los reportados por Pease (1976), quien estudió la ostra *Crassostrea virginica* y encontró que tanto los niveles de ARN como la síntesis de proteínas dismi-

nuían cuando había una reducción de alimentos.

Con respecto al tejido branquial, la concentración de proteínas en los organismos alimentados en ambas localidades presentó poca variación (Fig. 3 A y B); pero fue en Chacopata donde se encontraron los mayores valores. En los ejemplares mantenidos en abstinencia, el decrecimiento fue progresivo en ambas estaciones. Los organismos mantenidos en ayunas, en La Esmeralda, presentaron un índice ARN/ADN relativamente constante después de la segunda semana de experimentación. Posiblemente, esto se debe a que ellos tienen estrategias adaptativas para mantener su condición de estrés alimenticio. Para los de Chacopata ambos índices (ARN/ADN y proteína/ADN) descendieron constantemente, indicando que son más sensibles al ayuno que los grupos recolectados en La Esmeralda. Por otro lado se sabe que las branquias son órganos que están más expuestos al medio externo y continuamente sometidos a rupturas y desgastes; por lo tanto son tejidos que necesitan regenerarse constantemente y además deben mantener su crecimiento (Gómez 1991). Se ha reportado previamente que *Perna viridis* es bastante resistente a los cambios de salinidad y temperatura (Segnini de Bravo & Chung 1997).

La diferencia en ambas localidades se debe posiblemente, a que La Esmeralda está más contaminada por los efectos antropogénicos. Las corrientes que se desplazan de este a oeste y los vientos son más fuertes, existen descargas de ríos, la concentración de salinidad es más fluctuante. Por ello se puede inferir que los organismos recolectados en esta estación presentaron menor variación en sus índices debido a que estos bivalvos se están enfrentando constantemente a factores adversos y su condición fisiológica está como entrenada para luchar contra estas situaciones. Por lo tanto, un estrés alimenticio puede ser manipulado más fácilmente como estrategia adaptativa que los organismos recolectados en Chacopata, donde normalmente estos organismos gozan de mejores

condiciones ambientales, con poca o ninguna contaminación. Fuentes (1996) no encontró en la zona de Chacopata contaminación por metales pesados en el sedimento.

En definitiva, hay una clara evidencia del papel que juega la alimentación en la conducta del bivalvo *Perna viridis* y la movilización de sus reservas energéticas en períodos de bajos niveles de alimento, indicando que esta condición de ayuno no es lo suficientemente adecuada para sostener el crecimiento.

## AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente y a Miguel Gómez por la recolección de los organismos.

## RESUMEN

El mejillón verde, *Perna viridis*, se ha encontrado ampliamente en la costa norte del Estado Sucre desde su aparición en Venezuela en 1993. El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la disponibilidad del alimento sobre el crecimiento instantáneo de *Perna viridis* expresada por los cocientes ARN/ADN y Proteína/ADN. Los mejillones fueron recolectados en La Esmeralda y Chacopata (Estado Sucre), Venezuela, transportados al laboratorio, aclimatados durante cuatro semanas, mantenidos por otras seis semanas en dos condiciones de alimentación: un grupo alimentado *ad libitum* y otro mantenido en ayunas. Posteriormente este grupo fue alimentado por dos semanas adicionales. Se midió la concentración de proteínas (método colorimétrico) y de ácidos nucleicos: ARN y ADN (método fluorométrico con bromuro de etidio) en diferentes tejidos: músculo aductor, glándula digestiva y branquias. Se expresó el crecimiento instantáneo utilizando los cocientes ARN/ADN y Proteína/ADN. Los resultados indicaron que estos índices fueron siempre mayores en los organismos alimentados que en aquellos abstinentes y que los de Chacopata presentaron mejor condición fisiológica que los de La Esmeralda durante las seis semanas de ayuno. El tejido muscular es el más recomendado para estudiar el crecimiento instantáneo. Los resultados indican que el cociente ARN/ADN es un índice adecuado para determinar la condición fisiológica y el crecimiento instantáneo de esta especie.

## REFERENCIAS

- Agard, J.R., R. Kishore & B. Baine. 1992. *Perna viridis* (Linnaeus, 1758). First records of the Indo-Pacific green mussel (Mollusca: Bivalvia) in the Caribbean. *Caribb. Mar. Stud.* 3: 59-60.

- Betancourt, R., J.E. Pérez, A. Velez, L. Freitas & M.I. Segnini. 1995. Efectos de la consanguinidad en la vieira *Euvola ziczac*. (L). Bol. Inst. Oceanogr. Vzla. 34: 69-75.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing principles of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Bullow, F.J. 1987. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: A review. The Age and Growth of Fish (Summerfelt, R.C. & Hall, G.E. 1987). The Iowa State Univ. Press. Ames, Iowa. p 45-64.
- Fuentes, V. 1996. Condiciones geoquímicas de los sedimentos superficiales de la laguna de Chacopata. Tesis de Maestría. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 130 pp.
- Frantzis, A., A. Grémare & G. Vétion. 1993. Taux de croissance et rapports ARN-ADN chez le bivalve dépositivore *Abra ovata* mourri à partir différents détritux Oceanolog. Acta. 16(3): 303-313.
- Gómez, J.A. 1991. Inducción de la reproducción y cambios en la composición química de *Pecten ziczac* acondicionadas durante los períodos de reproducción activa y reposo sexual de las poblaciones naturales. Tesis de Maestría. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 65 pp.
- Gómez, J.A., M.I. Segnini & M.V. Fuentes, 1998. Efecto del cobre sobre la condición fisiológica de *Lima scabra*, medida por la relación ARN/ADN. Scientia (Panamá). 13: 27-34.
- Hicks, D.W. & J.W. Tunnell. 1993. Invasion of the South Texas coast by the edible brown mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). The Veliger, 36: 92-94
- Holland, B. 1997. Genetic aspect of a marine invasion. Quarterdeck, Vol.5, No. 3.
- Jordán, N. 1990. Relación de la temperatura, clorofila a y ácidos grasos fitoplanctónicos con la actividad gonadal anual de *Pecten ziczac* (L. 1758). Sustratos metabólicos para la reproducción. Tesis de Maestría. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 75 pp.
- Karsten, U. & A. Wolleberger. 1972. Determination of DNA and RNA in homogenized cells and tissues by surface fluorometry. Anal. Biochem. 46: 135-148.
- Karsten, U. & A. Wolleberger. 1977. Improvements in the ethidium bromide method for a direct fluorometric estimation of DNA in cell tissue homogenates. Anal. Biochem. 77: 464-470.
- Lodeiros, C., R. Fernández, A. Bonmati, J. Himmelman & K.S. Chung 1996. Relation of RNA/DNA ratios to growth for the scallop *Euvola (Pecten) ziczac* (L.) in suspended culture. Mar. Biol. 129: 3-13.
- Lucas, A. & P.G. Beninger. 1985. Use of physiological condition index in marine bivalve aquaculture. Aquacul. 44: 187-200.
- Mathew, S. & R. Damodaran. 1997. Lipofuscins. Physiological indicator of heavy metal stress in *Sunetta scripta* (yellow class) and *Perna viridis* (green mussel). Ind. J. Mar. Sci, 36: 64-67.
- Nusetti, O.A. & D. Morales. 1988. Crecimiento de algunos tejidos del mejillón *Perna perna* (L. 1758): Composición de ADN, relaciones ARN/ADN, y reservas energéticas. Acta Cient. Vzla. 39: 289-293.
- Pease, A.K. 1976. Studies of the relationship of RNA/DNA and the rate of protein synthesis to growth in the oyster *Crassostrea virginica*. Fish. Mar. Ser. Technical Report. No. 622. 78 p.
- Rylander, J., J. Pérez & J.A. Gómez, 1996. Status of green mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Mytilidae) in north-eastern Venezuela. Carib. Mar. Stud. 5: 86-87.
- Segnini de Bravo, M.I. & K.S. Chung, 1997. Influencia de los factores ambientales sobre el crecimiento instantáneo de peces tropicales evaluados por el seguimiento de la relación ARN/ADN. Bol. Inst. Oceanogr. Vzla. 36 (1 & 2): 21-29.
- Segnini de Bravo, M.I., K.S. Chung & J.E. Pérez. 1998. Salinity and temperature tolerance of green mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae). Rev. Biol. Trop. 46 (Supl. 5): 121-125.
- Sreenivasan, P.V., R. Thangavelu & P. Poovannan. 1989. Biology of the green mussel, *Perna viridis* (Linnaeus) culture in Muttukadu lagoon, Madras. Indian J. Fish, 36(2): 149-155.
- Wright, D. A. & E.W. Hetzel. 1985. Use of RNA/DNA ratios as an indicator of nutritional stress in the American oyster *Crassostrea virginica*. Mar. Ecol. 25: 199-206.