

Determinación del número de cromosomas de *Polymesoda solida* (Bivalvia: Corbiculidae) utilizando dos métodos citogenéticos

Patricia E. Molleda^{1*}, Yajaira G. de Severeyn¹, Hector Severeyn³ y Julia Molina²

¹Laboratorio de Cultivo de Invertebrados Acuáticos. ²Laboratorio de Citogenética.

³Laboratorio de Sistemática de Invertebrados Acuáticos.

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, La Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo 4011, Venezuela

Recibido: 27-02-98 Aceptado: 05-02-99

Resumen

Con la finalidad de conocer el número cromosómico de la almeja estuarina *Polymesoda solida*, se llevó a cabo un estudio citogenético utilizando la técnica de secado al aire para la preparación de los frotis. Se emplearon dos soluciones hipotónicas diferentes (KCl y Citrato de Sodio), para observar con cuál de las dos se lograba mejor visualización de las metafases mitóticas; se tomaron en cuenta diferentes rangos de tamaños con el objeto de conocer cual era el ideal para obtener mayor porcentaje de células mitóticas. De las dos soluciones probadas, el KCl resultó ser la más apropiada. El rango de tamaño valvar se encontró entre 20-24 y 28-32 mm de longitud del animal. El número cromosómico de *Polymesoda solida* es aparentemente variable oscilando entre $2n=22$ y $2n=30$.

Palabras clave: Citogenética; metafases mitóticas; *Polymesoda solida*.

Chromosome number estimation in *Polymesoda solida* (Bivalvia: Corbiculidae) using two cytogenetic methods cytogenetic study of mollusca bivalvia

Abstract

In order to know the chromosomal number of the estuary mussel *Polymesoda solida*, it was carried out a cytogenetic study utilizing the air-drying technique for slide preparation. Two different hypotonic solutions were employed: potassium chloride and sodium citrate, both 1%, to the end of determining with which of these solutions it was obtained a better observation of the mitotic metaphase. Potassium chloride (KCl) was the best hypotonic solution. Several ranges of size were considered for the purpose of knowing which is the most convenient in order to reach the higher percentage of mitotic cells, finding these ranging between 28-32 mm and 20-24 mm. A chromosomal number ranging between $2n=22$ and $2n=30$ was established in *P. solida*.

Key words: Cytogenetic; metaphase mitotic; *Polymesoda solida*.

* Autor para la correspondencia. Teléfono: 578492. E-mail: molleda@solidos.ciens.luz.ve / patmoll@hotmail.com

Introducción

Los moluscos bivalvos revisten notable importancia ya que representan un importante recurso en la alimentación humana. Estos moluscos ofrecen amplias e interesantes perspectivas por las diversas especies de distribución mundial y de interés comercial (1,2). Además, el costo de producción de estos organismos, comparado con el de otros grupos zoológicos, no es muy elevado en relación a la inversión requerida para su producción (1,3).

La importancia comercial que representan los moluscos bivalvos hace necesario el estudio citogenético de los mismos, como un aspecto importante para la biología, ya que el desarrollo de la acuicultura no se logrará alcanzar en su totalidad mientras no sea posible ejercer un control de todos los aspectos biológicos, incluyendo la genética (1).

La familia *Corbiculidae* agrupa almejas de hábitat marino, estuarino y dulceacuícola, que en áreas tropicales de Asia y Sur América frecuentemente son utilizadas como alimento. Entre sus representantes estuarinos esta *Polymesoda solida* especie ampliamente distribuida a lo largo de todo el Lago de Maracaibo. Sus conchas son fuertes, y trigonales, especialmente en adultos. Las valvas externamente, presentan un típico brillo porcelanizado, y estrías concéntricas. Esta almeja puede encontrarse en sedimentos desde arenosos a fangosos, y es capaz de tolerar amplios rangos de salinidades (desde aguas completamente dulces 0‰ hasta casi marinas 25‰). Debido a la densidad poblacional de los bancos encontrados en el Estrecho del Lago de Maracaibo y la Laguna de Sinamaica, existen altas posibilidades de su explotación comercial (4).

Antes de 1969 los estudios citogenéticos realizados a moluscos bivalvos se enfocaban principalmente hacia el número cromosómico. Desde hace poco las técnicas basadas sobre las tinciones convencionales de los cromosomas y las técnicas de bandeado (G, C y NOR) además de la cuantificación de las

longitudes relativas de los cromosomas, radio de los brazos e índice centromérico, han aportado información necesaria sobre la morfología cromosómica, permitiendo la comparación de los diferentes cariotipos (5, 6). Entre los moluscos bivalvos, las ostras y los mejillones han sido los más intensamente estudiados desde el punto de vista citogenético, por su importancia comercial y su fácil manipulación genética (1, 5-7), pero muy poco se ha hecho con almejas.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el número de cromosomas de *Polymesoda solida* estandarizando la técnica citogenética de visualización de cromosomas en fase mitótica mediante secado al aire utilizando dos soluciones hipotónicas (KCl y Citrato de Sodio).

Materiales y Métodos

Sitio de muestreo

Polymesoda solida fue colectada en la zona noroccidental del Lago de Maracaibo, al Norte de San Rafael del Moján, específicamente en el sector Nazareth (10° 55' latitud Norte y 71° 45' longitud Oeste).

Esta área fue seleccionada debido a que esta especie se encuentra allí en mayor abundancia (4), y en los rangos de tamaño (15-35 mm), necesarios para realizar los ensayos citogenéticos planteados. La salinidad y temperatura en el sitio de muestreo oscilan entre 15-16‰ y 29-30°C, respectivamente.

Colección y transporte de especímenes

Se realizaron un total de 12 muestreos, uno cada mes, en los cuales se colectaron 40 animales, cuyos tamaños oscilaron entre 15-35 mm. La colecta se realizó de forma manual, colocando los animales en recipientes de plástico con agua del sitio donde fueron colectadas y posteriormente fueron trasladados al laboratorio.

Aclimatación

Una vez en el laboratorio, los especímenes eran colocados en acuarios con agua a la salinidad de la colecta y alimentados diariamente con microalgas (*Isochrysis*) para estimular la división celular, durante un máximo de 3 a 4 días, tiempo después del cual se procedió a realizar el estudio citogenético.

Ensayo citogenético

Una vez aclimatados, los especímenes fueron separados en dos peceras, en grupos de 20, los cuales fueron colocados en las soluciones hipotónica de KCl al 1% y citrato de sodio al 1%.

Técnica para la obtención de cromosomas mitóticos

Los especímenes juveniles fueron medidos y procesados según la técnica de Okamoto y Arimoto (8) con ligeras modificaciones. Los animales fueron colocados en un beaker con 0,1 mL de colcemid (Gibco BRL Karyomax colcemid) en agua de mar, e incubados por un período de 4 a 5 horas. Posteriormente, las branquias eran separadas del animal y maceradas en un mortero con unas gotas de solución salina fisiológica (solución isotónica), y posteriormente alrededor de 5 mL de KCl al 1% o de Citrato de Sodio 1% (solución hipotónica) a una temperatura de 37°C durante un período de 1 hora. Este material fue centrifugado (centrifugadora Clay Adams) a 800 r.p.m. Luego de 10 minutos a la suspensión celular se le agregó, con agitación constante, 15 mL del fijador Carnoy (Metanol: Ácido Acético) en una proporción 3:1, para luego guardar en la nevera por un periodo de 15 min. Posteriormente se centrifugó nuevamente adicionando 15 mL de fijador a la suspensión celular, con agitación constante, para después ser almacenado en la nevera hasta el otro día. Los botones celulares fueron centrifugados y extendidos en láminas portaobjeto, se dejaron secar al aire y posteriormente fueron teñidas con Giemsa (Riedel-de Haen) en buffer fosfato

durante 10 minutos; las láminas fueron lavadas con agua destilada y posteriormente secadas al aire, para ser observadas al microscopio.

Las láminas preparadas fueron observadas al microscopio de campo claro, con objetivo de mayor aumento o abertura numérica (100 X), en un fotomicroscopio Zeiss Axioskop. Las mejores metafases mitóticas fueron fotografiadas usando rollo de película blanco y negro (400 asas).

Resultados y Discusión

De un total de 40 especímenes se analizaron 573 metafases mitóticas. Durante la realización de este estudio, se usó tejido de las branquias las cuales presentaron elevada división celular en los especímenes juveniles adaptados a las condiciones del laboratorio y bien alimentados. En la Figura 1 se observa que el rango de tamaño ideal de la almeja para obtener un mayor porcentaje de células mitóticas se encuentra entre 20-24 y 28-32 mm. Estos rangos de tamaño podrían considerarse por lo tanto ideales para realizar estudios citogenéticos en *Polymesoda solida*. Según Okamoto y Arimoto (8) los moluscos empleados para el estudio directo de los cromosomas deben ser especímenes juveniles, aunque no reportan el tamaño preciso de los mismos. Thiriot-Quievreux (12), quien ha realizado numerosos estudios citogenéticos a ostras y mejillones, sugiere que los organismos empleados para el estudio directo de los cromosomas deben ser juveniles y de tamaños entre 10 y 25 mm. En el caso de las almejas no se habían reportado rangos de tamaño óptimo hasta el presente estudio.

En general, se sugieren especímenes juveniles para este tipo de estudios, debido a que deben utilizarse los tejidos que posean normalmente un número elevado de células en división que no precisen del uso de agentes mitogénicos o que faciliten su acción (9-11).

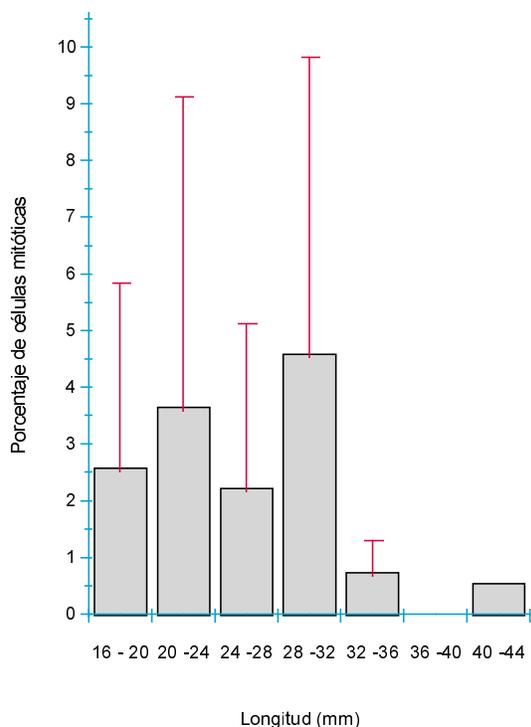


Figura 1. Porcentaje de células mitóticas analizadas y relacionadas con el Tamaño de los especímenes de *Polymesoda solida*.

La mitad de los especímenes procesados durante este estudio fueron tratados con KCl y la otra mitad con Citrato de Sodio a una concentración del 1%. En la Figura 2 se observa el porcentaje de células mitóticas obtenidas mediante el empleo de ambas soluciones observándose un 78,71% de células mitóticas en las preparaciones realizadas con el KCl y un 36,71% en las tratadas con Citrato de Sodio. Estos resultados indican que el KCl permitió visualizar mejores metafases que el Citrato de Sodio (Figura 3). Es evidente que las células de este molusco bivalvo son más sensibles a la acción hipotónica del KCl que a la del Citrato de Sodio.

Para el análisis del número cromosómico es necesario el uso de buenas metafases mitóticas, a través de las cuales se logre observar de manera clara y precisa los cromosomas. A pesar de haber obtenido un alto

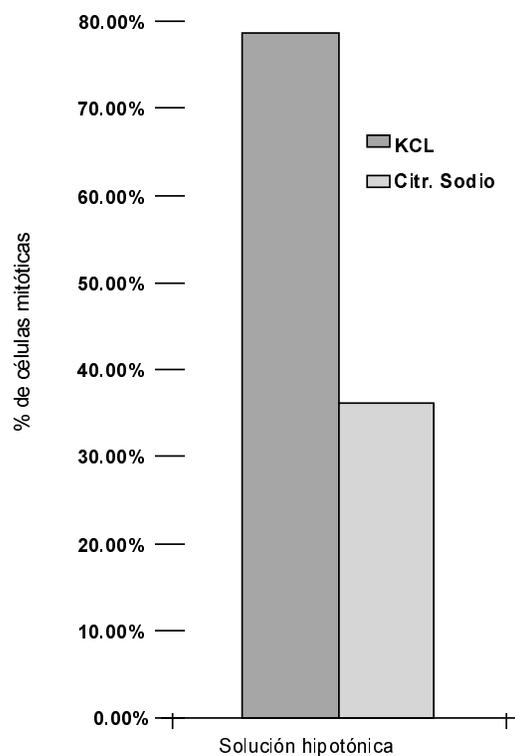


Figura 2. Porcentaje total de células de *Polymesoda solida* obtenidas mediante el uso de las soluciones hipotónicas.

número de buenas metafases mitóticas en este estudio, se encontró que el número cromosómico de *Polymesoda solida* varía entre $2n=22$ y $2n=30$. Este rango se observó indistintamente de la acción de las dos soluciones hipotónicas. Esta variación puede considerarse como consecuencia de una alta incidencia de aneuploidia, tanto como por la existencia de más de un cromosoma homólogo (trisomía) como por ausencia de pares cromosómicos (monosomía) (12).

Según Thiriot-Quievreux (12), los invertebrados, y en particular los moluscos bivalvos, presentan señales aneuploides o mitosis cromosómicas anormales causadas por la contaminación a la que se hallan expuestos. Un ejemplo lo constituye *Macoma balthica*, especie con alta frecuencia de metafases con un número elevado de células aneuploides (61 metafases con número en-

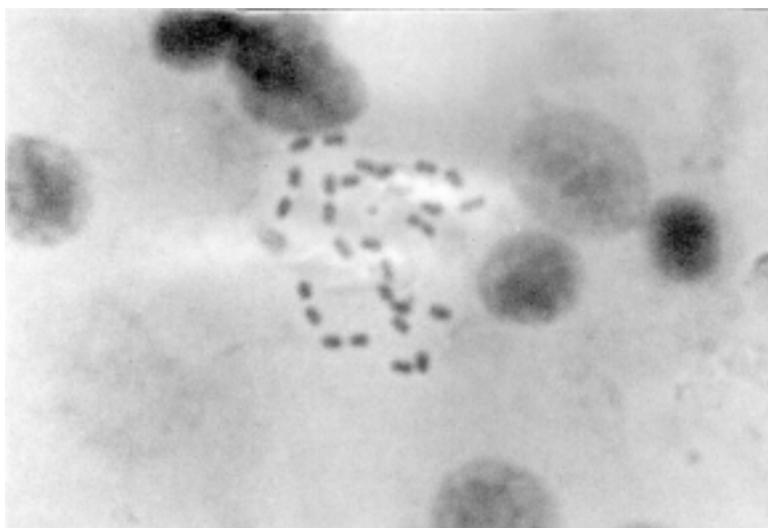


Figura 3. Cromosomas de *Polymesoda solida* observados con la solución hipotónica KCl. 1000X.

tre 70 y 98 cromosomas), siendo el número normal $2n=38$. Este autor sugiere que las aberraciones numéricas de los cromosomas observadas son producidas por tres tipos de contaminantes (metales pesados, hidrocarburos aromáticos y sustancias radioactivas) presentes en el hábitat donde vive este molusco (13).

En base a esto, se puede hipotetizar que lo observado en *Polymesoda solida* sea debido a la presencia de contaminantes en las aguas del Lago de Maracaibo. En este sentido, la evidencia sugiere una elevada alteración genética de esta especie.

Existen evidencias de que fenómenos similares al observado en este estudio se presentan en otras especies. Por ejemplo, *Ostrea desenlamellosa* posee un número cromosómico de $2n = 20$, pero 16,5% de sus células son aneuploides (5). En algunas especies de mejillones también se han observado aberraciones cromosómicas como es el caso del mejillón *Mytilus edulis* ($2n = 28$) que de 5 a 10 de las mitosis estudiadas poseen un número cromosómico anormal (entre 27 y 30) (12, 14). La presencia de células aneuploides (monosómicas) descritas en las familias Mytilidae y Ostreidae, es un fenómeno que una vez que se manifiesta per-

siste durante todo su desarrollo. (12). En embriones de *Mytilus edulis* se ha observado aneuploidía hasta en un 8%, siendo esto también asociado a procesos contaminantes (12).

Conclusiones

El número cromosómico de *Polymesoda solida* se encuentra entre $2n= 22$ y $2n=30$.

El tamaño ideal para obtener mayor porcentaje de células mitóticas en branquias de la almeja *Polymesoda solida* es el comprendido entre 20-24 mm y 28-32mm de longitud valvar.

El uso de la solución hipotónicas de KCl produjo la mejor ruptura de los núcleos y mejor visualización de las células metafásicas.

Debido al alto porcentaje de células aneuploides observadas, se puede inferir que la contaminación del Lago de Maracaibo ha afectado genéticamente a esta especie.

Agradecimiento

Al personal de la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia, y al per-

sonal de los Laboratorios de Culvo de Invertebrados Acuáticos y Sistemática de Invertebrados Acuáticos, por su apoyo moral y logístico, sin el cual no hubiera sido posible este estudio.

Referencias Bibliográficas

1. BAUTISTA C. **Moluscos: Tecnología de Cultivo**, Ediciones Mundi Prensa, Madrid (España), pp. 167, 1989.
2. BUSSANI M. **Guía Práctica del Cultivo del Mejillón**, Editorial Acribia S.A., Zaragoza (España), pp. 189, 1983.
3. REHDER H.A. **The Audubon Society Field Guide to North American Seashells**. Alfred A. Knopf. (Ed.) The Audubon Society. N.Y. (USA), pp. 894, 1981.
4. GARCIA, Y.H. Biología y Ecología de *Polymesoda arctata* (Deshaye) almeja presente en el Lago de Maracaibo. (Trabajo Especial de Grado). La Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela), pp. 95, 1984.
5. ISUA A., THIRIOT-QUIEVREUX C. **Aquaculture** 97:317-325, 1991.
6. LI X.X., HAVENHAND J.N. **Marine Biology** 127: 443-448, 1997.
7. KOEHN R. **Aquaculture** 94: 125-145, 1991.
8. OKAMOTO A., ARIMOTO B. **Venus, The Japanese Journal of Malacology**. 45(3): 193-202, 1986.
9. ESGOCUEZ J. **Técnicas en Citogenética** 1era Edición. Editorial Espaxz, Barcelona (España), pp.142, 1971.
10. BARTALOS M., BARAMKI T. **Citogenética Médica**, 1ª ed., Editorial Universitaria, Buenos Aires (Argentina), pp. 474, 1972.
11. GARCIA VELÁZQUEZ A. **Técnicas y Procedimientos de citogenética vegetal**, 3ª ed., Talleres Gráficos de la Nación, México, pp. 500, 1990.
12. THIRIOT-QUIEVREUX C. **Genética** 70: 225-231, 1986.
13. THIRIOT-QUIEVREUX C., WOLOWICZ M. Etude cariologique d' une néoplasie braquiale chez *Macoma balthica* (Mollusca, Bivalvia). **Acad Sci Paris Sciences de la vie/Life sciences** 319:887-92, 1996.
14. THIRIOT-QUIEVREUX C., AYRAUD N. **Marine Biology** 70: 165-172, 1982.