

# **GENÉTICA BIOQUÍMICA DE LOS ESTADIOS DE POSTLARVAS Y JUVENILES DE *Panulirus argus* (LATREILLE). I HETEROCIGOSIDAD RELACIONADA CON LA ACTIVIDAD METABÓLICA, VARIACIÓN MORFOLÓGICA Y FACTORES AMBIENTALES (1)**

Genetic biochemistry of postlarval and juvenile stages of lobster *Panulirus argus* ( Latreille ). I - Heterozygosity related to metabolic activity, morphological variation and environmental factors.

Raimundo Nonato de Lima Conceição<sup>(2)</sup>, Georgina Espinosa López<sup>(2)</sup>, Eugenio Díaz-Iglesia<sup>(3)</sup>, Marisabel Báez-Hidalgo<sup>(3)</sup>, Rogélio Díaz Fernández<sup>(3)</sup>.

## **RESUMO**

A eletroforese é um processo pelo qual podem ser detectadas variações de proteínas e está baseada na migração das moléculas portadoras de informações genéticas. Neste trabalho foram estudados cinco sistemas de proteínas e foi calculada a heterozigocidade observada ( $H_o$ ), que representa a variabilidade genética entre espécies ou entre indivíduos da mesma espécie em diferentes estágios de vida. A metodologia seguida foi a corrida vertical em gel de acrilamida. As amostras foram tomadas do músculo abdominal das pós-larvas e juvenis da lagosta *Panulirus argus*. Os sistemas estudados foram esterases (EST); malato desidrogenase (MDH); glutamato desidrogenase (GDH); tetrasolium oxidase (TO) e proteínas totais (PT). Os resultados de  $H_o$  total média foram similares para os estágios de puerulus, postpuerulus e juvenil. Quando se comparam as enzimas centrais do metabolismo (grupo I) com aquelas que funcionam nas vias metabólicas periféricas (grupo II), observa-se que em puerulus e postpuerulus a  $H_o$  é maior para as enzimas do grupo I, enquanto que em juvenis ocorre o inverso. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) nos valores de  $H_o$  entre os sexos, sendo observada uma tendência de  $H_o$  aumentar com o desenvolvimento ontogênico.

**Palavras-chaves:** Lagosta *Panulirus argus*, eletroforese, genética-bioquímica.

## **ABSTRACT**

Electrophoresis is a process from which one can detect proteins variations and is based on the migration of genetic informations carrying molecules. In the present paper five proteins systems were studied and the heterozygosity ( $H_o$ ) parameter, which represents genetic intra and interespecific variations along different life stages, was determined. The method used in the analysis was the vertical run in acrilamida gel. Samples were taken from the abdominal muscle of post-larvae and juveniles of lobster *Panulirus argus*. The systems studied were the esterases (EST); malato deshidrogenase (MDH); glutamato deshidrogenase (GDH); tetrasolium oxidase (TO) and total proteins (PT). The results of mean  $H_o$  were similar in puerulus, post-puerulus and juvenil stages. Comparing the central metabolism enzymes (group I) with the enzymes functionnig in the peripheric metabolism ways (group II), it was observed that  $H_o$  for puerulus and post-puerulus stages were greater in group I enzymes than in group II, whereas in juveniles stages the reverse occurs. There was no  $H_o$  difference ( $P > 0.05$ ) between males and females. A trend in the increase of  $H_o$  along ontogenic development was observed.

**Key words:** Lobster *Panulirus argus*, electrophoresis, genetic biochemistry.

(1) Parte dos trabalhos da Tese de Mestrado do primeiro autor, realizados no Centro de Investigaciones Marinas, Faculdade de Biología da Universidade de Havana, Cuba.

(2) Laboratório de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, C. P. 1072, CEP 60.165-080, Fortaleza, Brasil.

(3) Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Av. 1ª 2808, Miramar, La Habana, Cuba.

## INTRODUCCION

El mantenimiento de la variabilidad genética (heterocigosidad) ha sido un aspecto al que se ha dedicado gran atención desde que aparecieron los primeros trabajos sobre electroforesis de proteínas en las poblaciones naturales (Lewontin & Hubby, 1966).

El término *heterosis* fue introducido por Shull (1914) para describir el *vigor híbrido*, refiriéndose de una forma general a cualquier carácter cuantificable como por ejemplo el tamaño del cuerpo, longevidad, fertilidad, resistencia a patógenos o variaciones extremas de los factores ambientales.

Debido a que los animales híbridos presentarse eventualmente más resistentes y en general con altos grados de heterocigosidad, heterosis pasó a ser sinónimo de superioridad. Otra interpretación es el empleo del término sobredominancia, utilizado cuando el valor de heterocigoto en determinado *locus* es mayor que el valor de homocigotos (Zouros, 1987).

Los biólogos poblacionales han realizado una serie de observaciones empíricas que vinculan la heterocigosidad de las proteínas con variabilidad morfológica, velocidad de crecimiento, estabilidad del desarrollo y variables fisiológicas tales como el consumo de oxígeno (Mitton & Grant, 1984). Un estudio llevado a cabo por Zouros *et al.* (1988) presenta la correlación heterocigosidad-crecimiento entre poblaciones del molusco *Mytilus edulis* y algunos de estos factores. El estudio de este polimorfismo en los crustáceos ha contribuido con evidencias a este análisis (Nelson *et al.*, 1980; Nelson & Hedgecock, 1986; y Espinosa *et al.*, 1991).

En el presente trabajo se relaciona la heterocigosidad observada (Ho) de las esterasas, malato deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa y tetrasolium oxidasa con la variación morfológica, consumo de oxígeno y variación ambiental en postlarvas y juveniles de la langosta *Panulirus argus* en un *locus* determinado.

## MATERIALES Y METODOS

Los animales utilizados en esta investigación fueron obtenidos en el archipiélago de los Canarreos, plataforma suroccidental de Cuba. Para los análisis de electroforesis se utilizó la técnica descrita por Espinosa *et al.* (1990), la cual viene siendo utilizada en otros estudios de genética poblacional en Cuba (Labacena *et al.*, 1994).

Se utilizaron 165 ejemplares en los diferentes estadios de desarrollo ontogénico: 31 *puerulus* (P), 95 *postpuerulus* (PP) y 34 juveniles (J) de *P. argus*, los cuales fueron diferenciados según los criterios establecidos por Lewis *et al.* (1952). Fueron sexados 34 machos y 41 hembras del estadio *postpuerulus* y 16 machos y 13 hembras juveniles.

Los sistemas enzimáticos estudiados fueron tres *loci* de esterasas (EST), dos *loci* de malato deshidrogenasa (MDH), y un *locus* de glutamato deshidrogenasa (GDH) y tetrasolium oxidasa (TO). El aparato empleado en los análisis de electroforesis fue la cámara de Truveler & Nefyodov (1974). Además se trataron por separado las enzimas que utilizan sustratos del medio interno y las que emplean sustratos del medio externo de acuerdo a Gillespie & Langley (1974) - Tabla I.

Los datos fueron analizados a través del teste de Contingencia, en donde fue empleado programa estadístico elaborado por Sigarrosa (1985).

Tabla I - Heterocigosidad observada (Ho) entre los estadios en las diferentes enzimas, coeficientes de variación morfológico y actividad respiratoria (mlO<sub>2</sub>/ejemplar/hora) de *Panulirus argus* (Latreille, 1804).

Estadios	Heterocigosidad observada		
	P	PP	JUV
Enzimas del Grupo I			
MDH I	0.232	0.387	0.269
MDH II	0.397	0.212	0.350
GDH	0.378	0.238	0.739
TO	0.000	0.196	0.500
Media	0.252	0.258	0.465
Enzimas del Grupo II			
EST I	0.517	0.385	0.382
EST II	0.405	0.516	0.190
EST III	0.565	0.327	0.063
Media	0.496	0.409	0.212
PT	0.311	0.228	0.000
Media total	0.395	0.311	0.312
CV morfológico	—	35	24
mlO <sub>2</sub> /ejemplar/hora	—	0.065	1.090

Obs.: estadios: P - *puerulus*; PP - *postpuerulus*; JUV - juvenil).

## RESULTADOS

Los resultados referentes a biometría y actividad metabólica de los ejemplares utilizados y de los factores ambientales de las instalaciones en donde fueron mantenidos son presentados en más detalle por

Báez-Hidalgo *et al.* (1994), Díaz-Iglesia *et al.* (1994) y Brito-Pérez *et al.* (1994), pues sólo se muestran en este trabajo los valores utilizados en las comparaciones.

Los valores encontrados para la Ho media total fueron similares en los tres estadios estudiados en este trabajo, pero tomando en cuenta la clasificación de Gillespie & Langley (1974) observase que para las enzimas del grupo II los animales de los estadios *puerulus* y *postpuerulus* fueron más heterocigotos que los juveniles, mientras que calculándose la Ho media para las enzimas del grupo I ocurre lo contrario (tabla).

En la Tabla I también se muestra que empleando mediciones de largo y ancho los resultados de biometría el coeficiente de variación para los *postpuerulus* es mayor que el encontrado para juveniles.

Utilizando el consumo de oxígeno como indicador de la actividad metabólica se observa que los *postpuerulus* presentaron ritmo respiratorio más intenso que los juveniles (Martínez & Díaz-Iglesia, 1975; Brito *et al.*, 1991).

Una comparación de los resultados de Ho entre los sexos sólo puede ser realizada lógicamente para los

estadios posteriores a *puerulus*, donde observase que para los estadios *postpuerulus* y juvenil las enzimas del medio interno (grupo I) comportanse de manera semejante en ambos los sexos.

Por otro lado, para las enzimas del grupo II se encontró mayor Ho en hembras del estadio *postpuerulus* mientras que en juveniles el mayor valor se obtuvo para los machos (figura 1).

Las condiciones ambientales en las instalaciones de cultivo reflejan en cierto grado las influencias de la estación del año, además la temperatura y fotoperiodo son factores limitantes para la supervivencia de estos crustaceos (Díaz-Iglesia *et al.*, 1994). El fotoperiodo se comportó de acuerdo a las estaciones del año, siendo el tiempo de luz en el verano fue mayor que en el invierno.

Calculándose la heterocigosidad observada para las estaciones de invierno y verano, se observa una clara diferencia entre los valores promedios tanto para las enzimas del grupo I como del grupo II (tabla II). Los coeficientes de variación de la temperatura ambiental y de la concentración de oxígeno también se muestran mayores en el invierno que en el verano (Díaz-Iglesia, *op.cit.*).

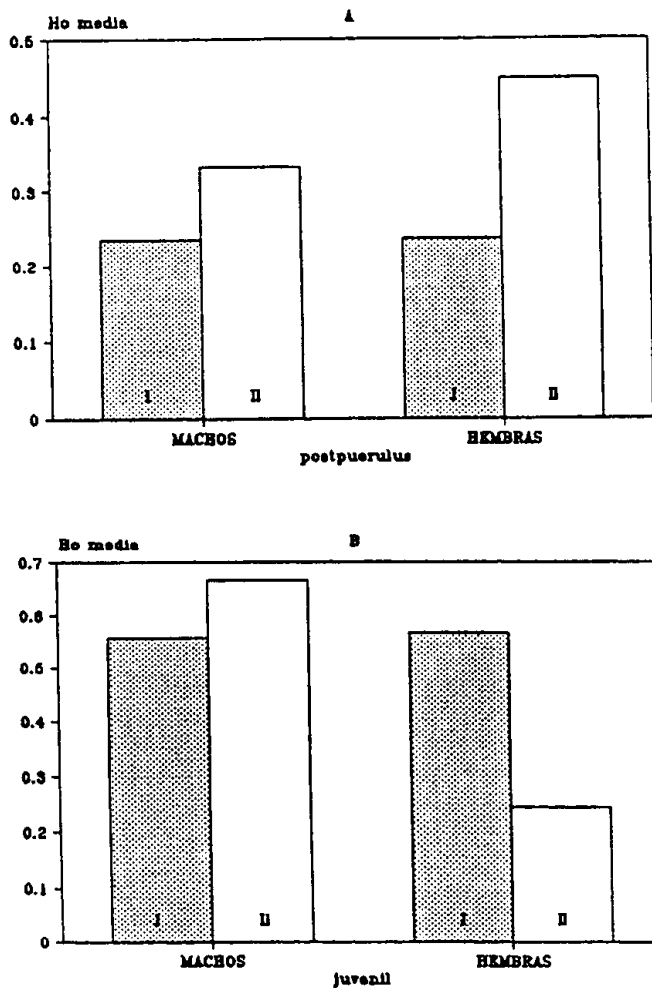


Figura 1. Heterocigosidad observada (Ho) para las enzimas de los grupos I y II en machos y hembras de *postpuerulus* y juveniles de *P. argus*.

Tabla II - Heterocigosidad observada (Ho) y coeficientes de variación de la temperatura ambiente y concentración de oxígeno para postlarvas y juveniles de *Panulirus argus* en el invierno de 1991 y verano de 1992.

Sistemas	Invierno	Verano
<b>Enzimas del Grupo I</b>		
MDH I	0.360	0.266
MDH II	0.125	0.400
GDH	0.095	0.564
Media	0.240	0.403
<b>Enzimas del Grupo II</b>		
EST I	0.483	0.222
EST II	0.389	0.138
EST III	0.431	0.094
Media	0.434	0.153
Temperatura	3.300	2.240
[O <sub>2</sub> ]	3.360	2.580

## DISCUSION

Entre las observaciones empíricas con las que se ha comparado la variación del polimorfismo de proteínas se encuentra la variación morfológica, el sexo (Espinosa, 1989; Fevolden & Hessen, 1989), variables fisiológicas, como la velocidad de crecimiento y el consumo de oxígeno (Mitton & Grant, 1984) y la ecología del grupo que se estudia. Por lo que realizaremos la discusión de los valores de heterocigosidad con relación a estas variables y teniendo en cuenta la clasificación de las enzimas de Gillespie & Langley (1974): las centrales del metabolismo (grupo I) y las que funcionan en las vías metabólicas periféricas, donde procesan una variedad de sustratos (grupo II).

En la Tabla 1, en que se muestran la  $H_o$  para las diferentes enzimas y el coeficiente de variación morfológico se observa que este último es mayor en *postpuerulus* que en juvenil, lo que se relaciona positivamente con la heterocigosidad de las enzimas del grupo II y negativamente con las del grupo I.

Los valores encontrados para la heterocigosidad se han relacionado en la literatura con la variabilidad morfológica y se plantea que los animales con menor variación morfológica, presentan mayor heterocigosidad y por tanto mayor homeostasis.

Datos sobre la variación alelica en varias especies sugieren que individuos heterocigotos exhiben más bajos niveles de fluctuación asimétrica y variación morfológica que ejemplares homocigotos. Los estudios de fluctuación asimétrica en relación a heterocigosidad alelica referense más sobre comparaciones entre poblaciones que entre individuos (Zouros & Foltz, 1987). Estos mismos autores describen estudios como el de Soulé (1979) lo cual encontró que la media de la fluctuación asimétrica en un simple carácter disminuye con el aumento de la heterocigosidad entre 15 poblaciones de *Uta stansburiana*.

Una posible explicación para la asociación entre heterocigosidad y nivel de asimetría es que los heterocigotos desarrollan más rápidamente que los homocigotos y son menos propensos a accidentes durante la ontogenia.

Aunque se ha referido mayormente a los moluscos existe una evidencia de que individuos con altos niveles de heterocigosidad tienen características fisiológicas diferentes de los homocigotos (Zouros & Foltz, 1987). Estos estudios relacionan la heterocigosidad de manera directa con la eficiencia metabólica y el crecimiento, mientras que con el costo del metabolismo y la tasa de pérdida de peso con el ayuno se establece una relación inversa (Koehn & Shumway, 1982; Rodhouse & Gaffney, 1984; Garton *et al.*, 1984 y 1985), citados por Zouros & Foltz (1987).

La velocidad de crecimiento y frecuencia de mudas de postlarvas es mayor que en juveniles (Díaz-Iglesia *et al.*, 1994) lo que está de acuerdo directamente con el comportamiento de la heterocigosidad de las enzimas del grupo II (tabla I) de este trabajo. Mitton & Grant (1984) también refieren una correlación positiva entre estos parámetros en dos especies de ostras.

En relación al consumo de oxígeno, estos mismos autores informan una correlación negativa con la heterocigosidad, lo que está de acuerdo con los resultados de este trabajo para las enzimas del grupo I (tabla I). Llama la atención que de las tres enzimas del grupo I estudiadas en este trabajo la que más fuertemente de forma negativa se correlaciona con el consumo de oxígeno es la glutamato deshidrogenasa una enzima del metabolismo de aminoácidos, lo que concuerda con el hecho de que estos animales presentan hábitos carnívoros. En la Figura 1 se observa que para las enzimas del grupo II en los *postpuerulus* de *P. argus* las hembras muestran mayor heterocigosidad que los machos, mientras que en juveniles sucede a la inversa, pero la diferencia es más marcada. Báez-Hidalgo *et al.* (1994) encontraron un coeficiente de variación para los caracteres morfológicos mayor en hembras que en machos, para postlarvas y juveniles de esta misma especie. Espinosa (1989) encontró resultados similares a los de juveniles en adultos del camarón blanco, *Penaeus schmitti*.

En la Tabla I también observamos que en *puerulus* y *postpuerulos* la heterocigosidad observada es mayor que en juveniles para las enzimas del grupo II. Considerándose que los estadios postlarvales poseen un nicho más amplio que juveniles estos resultados están de acuerdo con la proposición de anchura del nicho planteada por Alvarez & Sánchez (1987). Los resultados obtenidos en los experimentos de invierno y verano (tabla II) concuerdan con este último planteamiento ya que las enzimas del grupo II presentan mayor heterocigosidad en invierno, período en que también es mayor la variación ambiental, medida por el coeficiente de variación de la temperatura ambiente y la concentración de oxígeno.

Nelson & Hedgecock (1980) proponen para los decápodos adultos que las especies que escogen una estrategia adaptativa de grano fino presentan mayor mecanismo de regulación fisiológica y conductual y además son generalistas tróficos, mostrando bajos valores de heterocigosidad para las enzimas del grupo I y alta para las del grupo II.

Por otro lado, las especies que se inclinan hacia una estrategia de grano grueso muestran peores mecanismos de regulación fisiológica y tienden a ser especialistas tróficos presentando la heterocigosidad alta para las enzimas del grupo I y baja para las del grupo II.

Adoptando la hipótesis de Nelson & Hedgecock (1980) para los diferentes estadios de la langosta *P. argus* de este trabajo tenemos en resumen:

P y PP	Ho(grupo I) baja	medio interno muy regulado	Generalistas tróficos
	Ho(grupo II) alta	estrategia grano fino	
JUV	Ho(grupo I) alta	medio interno menos regulado	Especialistas tróficos
	Ho(grupo II) baja	estrategia grano grueso	

La situación ahora es analizar si en las etapas de postlarvas se puede considerar que el medio interno está menos regulado, si tenemos en cuenta que ellas viajan desde el océano hasta asentarse en los mangles deben estar fisiológicamente adaptados para este cambio en las condiciones de vida.

Sobre la alimentación en estos estadios se demostró que los *pueruli* no tienen desarrolladas las piezas bucales (Wolfe & Fergenhauer, 1990) mientras que Lalana Rueda & Ortiz Touzet (1991) encontraron en estómagos de estos animales varias entidades como copépodos, foraminíferos y algas. Se debe destacar que este segundo trabajo se realizó con animales tomados en colectores flotantes, los cuales aunque simulen refugios naturales, el ambiente donde naturalmente se asientan las postlarvas no es exactamente el mismo.

Por otra parte la función de las enzimas del grupo II no sólo la podemos ver limitada en la alimentación, sino también a los mecanismos de defensa que permiten a los organismos librarse de sustancias deletéreas, se tendría que analizar en cual de los estadios sería mayor la variedad de agentes químicos de que se deben proteger.

## CONCLUSION

En términos generales las enzimas del grupo I (malato deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa y tertasolium oxidasa) mostraron menor variación de la heterocigosidad observada en postlarvas que en juveniles, en invierno con relación al verano, no presentando diferencias entre los sexos.

Las enzimas del grupo II (esterasas) son más heterocigóticas en postlarvas que en juveniles, en invierno que en verano, en las hembras de las postlarvas con relación a los machos y en los machos de juveniles con relación a las hembras.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Álvarez, V.B. & Sánchez, M.A.A. *Los genes en las poblaciones*. Ediciones Pueblo y Educación, Ministerio de la Educación, 277 p., La Habana, 1987.

Báez-Hidalgo, M.; Conceição, R.N. L.; Gesteira, T.C.V.; Díaz-Iglesia, E. & Brito-Pérez, R. *Biometría de postlarvas de las langostas Panulirus argus (Latreille, 1804) y Panulirus laevicauda (Latreille, 1804) de Cuba y Brasil*. 3er. Congreso de Ciencias del Mar, La Habana, 1994.

Brito-Pérez, R.; Conceição, R.N. L.; Díaz-Iglesia, E. & Báez-Hidalgo, M. *Consumo de oxígeno de hepatopáncreas de juveniles de langosta Panulirus argus con ablación de los peduncullos oculares*. 3er. Congreso de Ciencias del Mar, La Habana, 1994.

Brito-Pérez, R.; Díaz-Iglesia, E.; Rodríguez, E. & Conceição, R.N. L. *Metabolismo energético de postlarvas de langosta Panulirus argus sometidas a diferentes condiciones experimentales*. *Rev. Inv. Mar.*, La Habana, v.12, p. 312-322, 1991.

Díaz-Iglesia, E.; Conceição, R.N. L.; Brito-Pérez, R. & Báez-Hidalgo, M. *Consumo de oxígeno y excreción de amoníaco de juveniles de langosta Panulirus argus (Latreille, 1804) en ayuno y alimentados con dieta natural: incremento de calor aparente y relación O:N*. 3er. Congreso de Ciencias del Mar, La Habana, 1994.

Espinosa, G. *Genética bioquímica y morfometría del camarón blanco Penaeus schmitti de Cuba*. Resultados preliminares. *Rev. Inv. Mar.*, La Habana, v.10, n. 2, p.157-162, 1989.

Espinosa, G. *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients of phosphoglucomutase and esterases from spiny lobster*. *Electrophoresis*, La Habana, v.11, p. 810-812, 1990.

Espinosa, G.; Sosa, A. & Berovides, V. *Relaciones filogenéticas entre especies del género Anolis sobre la base de ocho loci de polimorfismo bioquímico*. *Rev. Biol.*, La Habana, v. 4, n.2, p.133-148, 1990.

Espinosa, G.; Díaz, R. & Berovides, V. *Análisis genético-bioquímico de las larvas de Panulirus argus en la ZEE del sur de Cuba*. *Rev. Inv. Mar.*, La Habana v.12, p. 20-28, 1991.

Fevolden, S.E. & Hessen, D.A. *Morphological and genetic differences among recently founded populations of noble crayfish (A. astacus)*. *Heredias*, v. 110, p. 149-158, 1989. Gillespie, J.H. & Langley, C.H. *A general model to account for enzyme variation in natural populations*. *Genetics*, v. 76, p. 837-848, 1974.

Labacena, M.E.; Torres, M. & Espinosa, G. *Variabilidad y distancia genética en especies de Penaeus*. 3er. Congreso de Ciencias del Mar, La Habana, 1994.

Lalana Rueda, R. & Ortiz Touzet, M. *Contenido estomacal de puerulus y post-puerulus de la langosta Panulirus argus en el archipiélago de los Canarreos, Cuba*. *Rev. Inv. Mar.*, La Habana, v.12, p.107-116, 1991.

- Lewis, J. B.; Moore, H.B. & Babis, W. The postlarval stages of spiny lobster *Panulirus argus*. *Bull. Mar. Sci. Gulf Carib.*, Miami, v, 2, n.1, p.324-337, 1952.
- Lewontin, R. & Hubby, J. A molecular approach to the study of fenic heterozygosity in natural populations. *Genetics*, v. 54, p. 595-609, 1966.
- Martinez, A. & Diaz-Iglesia, E. Instalación respirométrica para el estudio de la acción de diversos agentes presentes en el agua de mar. *Inv. Mar., ser. 8*, La Habana, v.18, p.1-6, 1975.
- Mitton, J.B. & Grant, M.C. Associations among proteins heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, p. 479-499, 1984.
- Nelson, K. & Hedgecock, D. Enzyme polymorphism and adaptative strategy in the decapod crustacea. *The Amer. Nat.*, v.116, n.2, p. 238-280, 1986.
- Nelson, K.; Hedgecock, D.; Borgeson, W.; Johnson, E.; Daggett, R. & Aronstein, D. Density dependent growth inhibition in lobsters *Homarus*. *Biol. Bull.*, v. 159, p. 162-176, 1980.
- Shull, G.H. Duplicate genes for capsule form in *Bursa bursa pastoris*. *Z. Ind. And. Vererb.*, v. 112, p. 97-149, 1914.
- Sigarroa, A. *Biometría y diseño experimental*. Ed. Pueblo y Educación, 394 p., La Habana, 1985
- Soulé, M.E. Heterozygosity and development stability: another look. *Evolution*, v. 33, p. 396-401, 1979.
- Truveler, K.A. & Nefyodov, G.N. Instrumentos de múltiples usos en electroforesis de placas paralelas de geles de poliacrilamida. *Inf. Cient. Exc. sup. C. Biol.*, n. 9, p.137-140, 1974.
- Wolfe, S. & Fergenauer, B. Mouthparts and foregut ontogeny in larval, postlarval and juvenile spiny lobster *Panulirus argus*. *Zool. Scripta*, v. 20., n. 1, p. 55-75, 1990.
- Zouros, E. On the relation between heterozygosity and heterosis: evolution of the evidence from marine mollusks. *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, v. 15, p. 255-270, 1987.
- Zouros, E. & Foltz, D.W. The use of alelic isozyme variation for the study of heterosis. *Isozymes: current topics in biological and medical research*. v.13, p.1-59, 1987.
- Zouros, E.; Romero-Doley, M. & Mallet, A.L. Heterozygosity and growth in marine bivalves: further data and possible explanations. *Evolution*, v. 42, p. 1332-1341, 1988.