

RELACIÓN ARN/ADN EN *Brachionus plicatilis* (MULLER, 1780) CULTIVADO

Olga Gómez*

RESUMEN

Con el fin de establecer su posible uso como parámetro fisiológico de crecimiento en cultivos de rotíferos, se estudió la relación ARN/ADN, mediante fluorescencia, en rotíferos alimentados con tres especies de microalgas, a salinidad y temperatura ambiental (39‰ y 26-34°C, respectivamente). Se encontró que en poblaciones juveniles la relación fue menor que en poblaciones adultas. El crecimiento y la relación ARN/ADN están positivamente correlacionadas siempre que hay disponibilidad de alimento, ya que en condiciones deficientes de alimento la relación ARN/ADN disminuye.

PALABRAS CLAVES: rotífero, alimentación, ARN/ADN

ABSTRACT

With the purpose of establishing its potential use as a physiological growth parameter in rotifer cultivation, we studied, by means of the fluorescence method, the RNA/DNA ratio in rotifers fed with three species of microalgae, at local environmental conditions of salinity and temperatures (39‰ and 26-34°C respectively). We found that the ratio was lower in juvenile than in adult population. Growth and RNA/DNA ratio are positively correlated as long as there is adequate food availability, while this ratio decreases under conditions of food deficiency.

Key Words: Rotifers, food, RNA/DNA Ratios.

INTRODUCCIÓN

El rotífero *Brachionus plicatilis* es utilizado para el levante de larvas y juveniles de peces, a causa de su tamaño (100 a 300 μ) y su tasa de reproducción elevada, se

cultiva masivamente alimentado con fitoplancton y también se utiliza levadura (Guevara *et al.* 1996). Por lo general, para determinar el crecimiento en poblaciones de rotíferos, se utiliza calcular la tasa instantánea de crecimiento (K). No obstante, este parámetro tiene una validez limitada, porque no establece relación directa con los procesos celulares determinantes del crecimiento. En contraste, el análisis de ácidos nucleicos (ADN, ARN) ofrecen gran utilidad en los estudios de crecimiento, porque se relaciona con la condición fisiológica del individuo (Bullow 1987). La relación ARN/ADN ha sido usada como índice de crecimiento en peces (Chung *et al.* 1993). También es utilizada para evaluar el crecimiento instantáneo y condición nutritiva en crustáceos (Wang y Stikle 1986), en moluscos (Lodeiros *et al.* 1996) y en organismos planctónicos (Berdalet y Dortch 1991; Mordy y Carson 1991).

Debido a la necesidad de establecer una dieta para larvas de especies marinas cultivables en el Oriente venezolano, donde las condiciones de temperatura y salinidad son elevadas, se evaluó el crecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis*, alimentado con tres especies de microalgas, y se estableció el posible uso de la relación ARN/ADN como indicador de la condición fisiológica de su cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los cultivos (tipo batch) se realizaron en bidones de fibra de vidrio de 250 l, al exterior, con salinidad de 39‰, temperaturas entre 26 y 34 °C y suministro de iluminación y aireación continua, utilizando para su alimentación dietas unialgales de las especies de microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis chuii*. Con una densidad inicial de siembra de 25 rot/ml. El crecimiento del rotífero en términos de densidad máxima y tasa de crecimiento (K), fue determinado diariamente y se representó gráficamente como el número de rotíferos por ml en función de los días. Diariamente se cosecharon 3 litros del cultivo; un litro fue empleado para la determinación de ácidos nucleicos y con los otros dos litros, se procedió a separar rotíferos adultos de juveniles para determinar la relación ARN/ADN por organismos.

*Instituto de Investigaciones Científicas de Nueva Esparta. Universidad de Oriente, Núcleo de Nueva Esparta.

Recibido: Julio 1998. Aprobado: Abril 1999.

Para determinar el crecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis*, diariamente fue tomada una muestra de 100 ml, la cual se fijó con una solución de lugol y se procedió a contar el número de rotíferos por cada ml de cultivo, el número de juveniles, así como el número de adultos. Para ello fue empleada una cámara de Bogorov, una lupa estereoscópica (Wild 5) y un contador manual. El crecimiento del cultivo se representó gráficamente como el número de rotíferos por ml en función de los días de cultivo. Se expresa su tasa instantánea de crecimiento (K) mediante la relación:

$$K = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{T}$$

donde: K= Tasa instantánea de crecimiento (Rot/día)
 No= Número inicial de individuos
 Nt= Número de individuos en el tiempo T
 T= Tiempo en días.

Los ácidos nucleicos fueron determinados por fluorescencia según metodología propuesta por Clemensen (1988), procediendo de la siguiente forma: de las muestras contenidas en los viales (350 mg) se extrajeron 40 µl a los cuales les fueron agregados 100 µl de sarcosina, la mezcla fue agitada y reposada durante 30 min., luego se volvió a agitar y dejó en reposo durante otros 30 min. Transcurrido este tiempo se procedió a agregar 900 ml de Buffer (TRIS-EDTA pH 7,5), luego de agitar se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min, del sobrenadante fueron tomadas dos alícuotas de 200 µl a las cuales se les agregaron 300 µl de buffer. Una de la alícuotas se usó para la determinación de ADN, agregándole 500 µl de Hoechst y la otra alícuota se empleó para el ARN, añadiéndole 500 µl de Bromuro de etidiun. A ambas muestras se les determinó la fluorescencia empleando un fluorómetro digital (Mod. 450). Se utilizó un filtro rojo para la lectura ARN y un filtro verde para la lectura de ADN. Los datos obtenidos se llevaron a una curva de calibración y se determinó el porcentaje de ARN y ADN, luego los valores fueron utilizados para establecer la relación ARN/ADN, durante el ciclo del cultivo, de rotíferos juveniles y para adultos.

Mediante un análisis de correlación lineal, se determinó la relación entre el número de rotíferos por ml y la relación ARN/ADN en el cultivo, entre el crecimiento y el número de huevos por hembra y entre el consumo de alimento y el crecimiento (rot/ml), según Sokal y Rohlf (1979).

RESULTADOS

Los rotíferos tuvieron mayor crecimiento cuando se alimentaron con la microalga *T. chuii*, (densidad máxima de 187 Rot/ml, y crecimiento diario 0,67 Rot/día). La menor densidad obtenida (94 Rot/ml) y menor tasa instantánea de crecimiento (0,44 Rot/día) se obtuvo cuando los rotíferos fueron alimentados con *I. galbana* (Fig. 1).

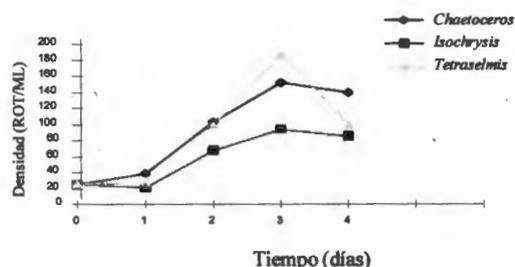


Fig. 1. Crecimiento de *Brachionus plicatilis* alimentado con tres dietas unialgales.

Con las tres microalgas, las densidades máximas fueron obtenidas a los 3 días de iniciados los cultivos. El número de huevos por hembras aumentó a medida que el cultivo se desarrollaba, siendo mayor al 3º día luego de la siembra. Se determinó una correlación positiva entre el crecimiento diario y el número de huevos por hembra (Figuras 2-4).

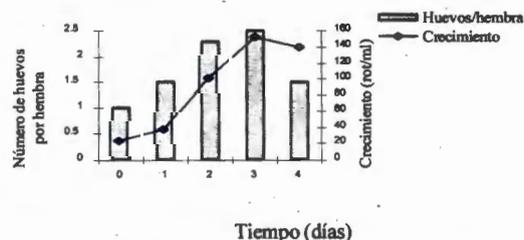


Fig. 2. Relación entre el crecimiento y el número de huevos por hembra en rotíferos alimentados con *Chaetoceros gracillitis* ($r^2 = 0,71$).

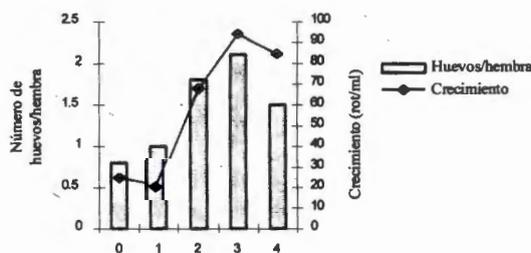


Fig. 3. Relación entre el crecimiento y el número de huevos por hembra en rotíferos alimentados con *Isochrysis galbana* ($r^2 = 0,90$).

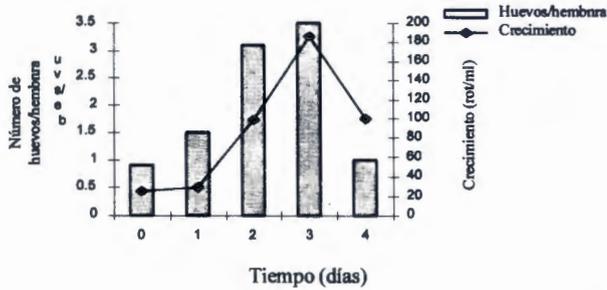


Fig. 4. Relación entre el crecimiento y el número de huevos por hembra en rotíferos alimentados con *Tetraselmis chuii* ($r^2 = 0,76$).

En los cultivos de rotíferos alimentados con *T. chuii* se observó el agotamiento del alimento al cabo del tercer día. No así en los otros cultivos, en los cuales al 3er día se observan densidades algales elevadas. En todos los casos, la concentración de alimento (cel/ml) y el crecimiento del rotífero se correlacionaron negativamente (Figs 5-7). En el tipo de cultivo empleado (batch) los rotíferos se siembran en cultivos de microalgas, aumentan su número y se cosechan cuando la población alcanza su densidad máxima. Al no realimentar, las células algales son consumidas y en consecuencia desciende el número de rotíferos.

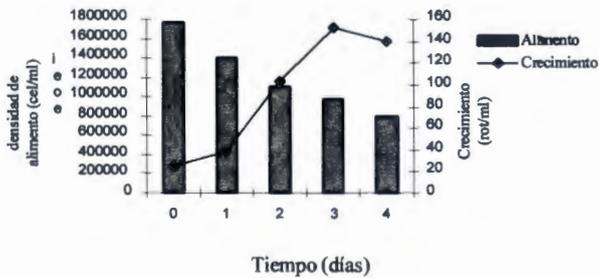


Fig. 5. Relación entre el crecimiento y el consumo de alimento en rotífero cultivados con *Chaetoceros gracilis* ($r^2 = 0,93$).

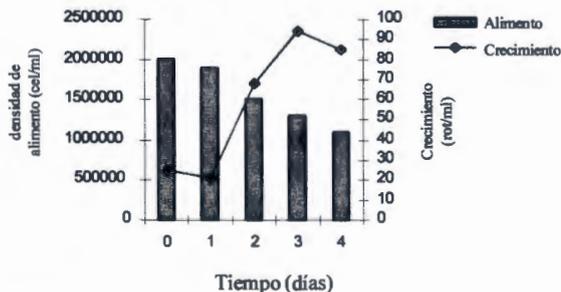


Fig. 6. Relación entre el crecimiento y el consumo de alimento en rotíferos cultivados con *Isochrysis galbana* ($r^2 = 0,94$).

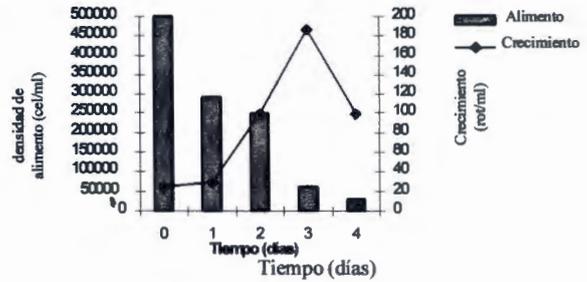


Fig. 7. Relación entre el crecimiento y el consumo de rotíferos cultivados con *Tetraselmis chuii* ($r^2 = 0,78$).

La relación entre el coeficiente ARN/ADN y el crecimiento (Rot/ml), se muestra en la tabla 1. Se observa un aumento gradual del coeficiente ARN/ADN durante el transcurso de los cultivos, excepto para los rotíferos alimentados con *T. chuii*, donde la misma disminuye bruscamente al 3er día del cultivo.

Entre el crecimiento diario y la relación ARN/ADN existe una correlación positiva, excepto en los cultivos realizados con *T. chuii* en donde ambas variables están negativamente correlacionadas.

TABLA 1. Relación entre el crecimiento diario y la relación ARN/ADN en rotíferos alimentados con tres especies de microalgas.

Día de cultivo	1	2	3	4	r ²
<i>Chaetoceros gracilis</i>					
ARN/ADN	25	41	72	94	
CRECIMIENTO	25.64	8.44	9.61	19.56	0,92
<i>Isochrysis galbana</i>					
ARN/ADN	25	47	88	152	0,92
CRECIMIENTO	6,58	8.64	14.80	100.63	
<i>Tetraselmis chuii</i>					
ARN/ADN	4,46	35.04	61.3	4.95	-0,40
CRECIMIENTO	25	57	101	187	

Los rotíferos juveniles tienen una relación ARN/ADN menor que los adultos (rotíferos ovados). Siendo la relación en juveniles de 13,26; 21,23 y 6,63 y en adultos de 21; 31 y 31 para rotíferos que consumieron *Ch. gracilis*, *I. galbana* y *T. chuii*, respectivamente (Tabla II).

Los valores de ADN se mantuvieron constantes entre 0,01 y 0,02, mientras que el ARN varía entre 0,2 y 1,2 como se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2. Contenido de ARN, ADN y ARN/ADN en rotíferos juveniles y adultos alimentados con tres especies de microalgas

Especie	<i>Chaetoceros gracilis</i>		<i>Isochrysis galbana</i>		<i>Tetraselmis chuii</i>	
	juveniles	adultos	juveniles	adultos	juveniles	adultos
ARN	0,14	0,40	0,18	0,48	0,76	1,05
ADN	0,01	0,02	0,00	0,02	0,11	0,03
ARN/ADN	13,26	21,68	21,33	31,28	6,63	30,76

DISCUSIÓN

En cuanto al crecimiento poblacional de los rotíferos, los valores máximos de densidad (Rot/ml) se obtuvieron con la microalga *T. chuii*. Verificando los resultados de Hung (1989) y Guevara *et al.* (1996). También con *T. chuii* se logró una mayor tasa de crecimiento diario (0,67 Rot/día). La tasa instantánea de crecimiento (K) indica la máxima capacidad de crecimiento de una población en unas condiciones dadas (Pascual y Yufera 1983).

En los rotíferos alimentados con las tres especies de microalgas el número de huevos por hembras fue similar. Éstos comienzan a crecer hasta obtener un pico máximo al tercer día después de la siembra. Al cuarto día del cultivo, disminuyó la densidad de los rotíferos alimentados con *T. chuii*; lo cual puede ser debido al tipo de cultivo empleado (batch) que conlleva a un agotamiento total del alimento, lo que afecta el crecimiento poblacional de los rotíferos. La concentración de algas utilizadas en la alimentación de los rotíferos tiene un efecto pronunciado sobre su tasa reproductiva (Snell *et al.* 1983). Cuando las densidades de los rotíferos son superiores a 100/ml, todas las algas son consumidas en una hora. En consecuencia se recomienda un suministro del alimento con intervalos frecuentes, (Hoff y Snell 1993). Sin embargo, en el tipo de cultivo empleado (batch) los rotíferos se siembran en cultivos de microalgas, los rotíferos aumentan su número y se cosechan cuando la población alcanza su densidad máxima. Al no realimentar, las células algales son consumidas y en consecuencia desciende el número de rotíferos.

En la acuicultura el crecimiento de los microorganismos como los rotíferos se evalúa por el cálculo de su tasa de crecimiento instantáneo (K). Sin embargo, este valor no tiene validez como parámetro fisiológico, porque no establece una relación directa con los procesos celulares que determinan el crecimiento (Berdalet y Dortch 1991), por lo cual se utiliza la relación ARN/ADN. En el caso de los organismos planctónicos la relación ARN/ADN es empleada como factor de condición fisiológica (Berdalet y Dortch 1991; Mordy y Carson 1991).

En los cultivos de rotíferos realizados con tres especies de microalgas, se encontró que en todos la relación ARN/ADN fue menor en los rotíferos juveniles que en adultos. *B. plicatilis* es un organismo eutélico, es decir que después de su nacimiento no ocurre división celular (Hoff y Snell 1993) por lo que tienen una constancia celular, sin embargo aumentan de tamaño desarrollando su lórica y estómago. Los organismos

adultos presentan un mayor tamaño de la lórica y por consiguiente de su estómago, muchos autores lo definen como una cápsula alimenticia, cuya calidad nutricional depende del alimento ingerido, por otro lado, se ha determinado, que al aumentar el número de organismos ovados en el cultivo, incrementa su contenido proteínico (Watanabe *et al.* 1983; Guevara 1998). Lo cual indica que el coeficiente ARN/ADN aumento de juveniles a adultos debido, quizás a la presencia de huevos y a la retención de más células microalgales en su estómago.

En los organismos, el contenido de ADN es un factor biológico estable que indica el número de sus células o su actividad mitótica. Por su parte el ARN refleja la actividad metabólica que se asocia con la síntesis proteica (Dortch *et al.* 1985; Berdalet y Dortch 1991). En esta investigación, *B. plicatilis* se cultivó con tres microalgas diferentes, en todos los casos los rotíferos juveniles y adultos mantuvieron constancia en los valores de ADN. En cambio, los valores de ARN fueron variables, siendo mayores en los rotíferos adultos. Es por ello que las diferencias en las relaciones ARN/ADN se deban más a la variabilidad del ARN, y por lo tanto la relación sea mayor en adultos.

En los rotíferos alimentados con *Ch. gracilis* e *I. galbana* la relación ARN/ADN y el crecimiento se correlacionaron positivamente. Pero no ocurrió así con los rotíferos que se alimentaron con *T. chuii*, donde se obtuvo una correlación negativa, ya que para el tercer día del cultivo, cuando se determinó el máximo crecimiento en términos de densidad y K, la relación ARN/ADN disminuyó. Anteriormente se mencionó que se utilizó el cultivo tipo batch. Cuando los rotíferos aumentan su población, la densidad de las microalgas disminuye, lo cual explica que cuando se utilizó *T. chuii*, al cuarto día de cultivo se determinó la mayor cantidad de rotíferos y el alimento ya había sido consumido. Lo que no ocurrió con los rotíferos alimentados con *Ch. gracilis* e *I. galbana*, que fueron consumidas más lentamente y al cuarto día de cultivo los rotíferos todavía tenían alimento disponible. Según el régimen alimenticio, las concentraciones de ARN y ADN son significativamente diferentes (Wilder y Stanley 1983). En animales mantenidos en condiciones de ayuno se determina una mayor cantidad de ADN pero menor concentración de ARN, por lo que la relación ARN/ADN es menor (Chung *et al.* 1991). Por su lado Wright y Hetzel (1985) citan que el estrés nutritivo causa la disminución de la relación ARN/ADN, así esta técnica es útil para determinar el estado fisiológico y el crecimiento instantáneo de los organismos.

CONCLUSIONES

Los rotíferos alimentados con las especies de microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* mantuvieron un índice ARN/ADN mayor que los que consumieron *Tetraselmis chuii*, durante el ciclo de cultivo.

El contenido de ARN es menor cuando los rotíferos han consumido el alimento del medio y por ende disminuye la relación ARN/ADN, por lo que ésta es útil para determinar el estado fisiológico en cultivo de rotíferos.

AGRADECIMIENTO

Al consejo de Investigaciones de la Universidad de Oriente por la subvención prestada al proyecto CI-4-1701-0759/96.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERDALET, E. & DORTCH, Q. 1991. New double-staining technique for RNA y DNA measurement in marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 73:295-305.
- BULLOW, F. 1987. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: a review. En: Summerfelt, C. y Hall, G (Eds). *The age and growth of fish*. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 45-64.
- CHUNG, K., HOLT, G. & ARNOLD, C. 1991. Influencia de la privación de la dieta y realimentación sobre el crecimiento y la relación ARN/ADN en los juveniles del pez rojo *Sciaenops ocellatus*. *Act. Cient. Ven.* 42:335-344.
- CHUNG, K., HOLT, G. & ARNOLD, C. 1993. Influence of salinity and food deprivation on growth and RNA-DNA ratio in red drum *Sciaenops ocellatus* (Pisces: Sciaenidae). *Rev. Biol. Trop.* 41(2): 187-195.
- CLEMENSEN, A. 1988. A RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. *Meeresforsch.* 32: 134-143.
- DORTCH, C., ROBERTS, T., CLAYTON, J. & AHMED, S. 1983. RNA/DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth rate and biomass in planktonic marine organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 13:61-71.
- GUEVARA, M., GÓMEZ, A. & MARÍN, N. 1996. Utilización de microalgas y levadura en el cultivo de una cepa de *Brachionus plicatilis* (O.F. Muller, 1786) (Rotífera: Monogonta) de las salinas de Araya, Venezuela. *Act. Cient. Ven.* 47:1-7.
- GUEVARA, M. 1998. Calidad nutricional de tres especies de zooplancton útiles para la acuicultura. Trabajo de Grado, para optar al título de Msc en Ciencias Marinas. Universidad de Oriente, Venezuela. 67 pp.
- HOFF, F. & SNELL, T. 1993. *Plankton culture manual* (Third Edition). Florida Aqua Farms, Inc. 147 pp.
- HUNG, M. 1989. Ensayo de cultivo de una cepa del rotífero *Brachionus plicatilis* aislada en Venezuela. *Rev. Lat. Acuic.* 40:85-112.
- LODEIROS, C., FERNANDEZ, R., BONMATI, A., HIMMELMAN, J. & CHUNG, K. 1996. Relation of RNA/DNA ratios to growth for the scallop *Euvola (Pecten) ziczac* in suspended culture. *Mar Biol.* 126:245-254.
- MORDY, C. & CARTON, D. 1991. An evaluation of fluorescence techniques for measuring DNA and RNA in marine microorganisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 73:283-293.
- PASCUAL, E. & YUFERA, M. 1983. Crecimiento en cultivo de una cepa de *Brachionus plicatilis* O.F. Muller en función de la temperatura y la salinidad. *Inv. Pesq.* 47(1):151-159.
- SNELL, T., BIEBERRICH, C. & FUERST, R. 1983. The effects of green and blue-green algal diets on the reproductive rate of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 31(1):21-30.
- SOKAL, R. & ROHLF, F. 1979. *Biometry*. Freeman, San Francisco. 345 pp.
- WANG, S. & STICKLE, W. 1986. Changes in nucleic acid concentration with starvation in the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun. *J. Crust. Biol.* 61:49-56.
- WATANABE, T., KITAJIMA, C. & FUJITA, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish. *Aquaculture* 34:115-143.
- WILDER, L. & STANLEY, J. 1983. RNA/DNA ratio as an index to growth in salmonid fishes in the laboratory and in streams contaminated by carbaryl. *J. Fish. Biol.* 22:165-172.
- WRIGHT, D. & HETZEL, E. 1985. Use of RNA: DNA ratios an indicator of nutritional stress in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 25:199-206.