

INDUCCION A TRIPLOIDIA EN *Argopecten purpuratus* LAMARCK, 1819, MEDIANTE CITOCALASINA-B

FEDERICO WINKLER¹, BRUNO LADRON DE GUEVARA¹, BEATRIZ ESTEVEZ¹ y LUIS JOLLAN¹.

ABSTRACT: Winkler, F.; Ladrón de Guevara, B.; Estévez, B. & L. Jollán. 1993. Triploidy induction in *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819, using Citochalsin-B. Revista de Biología Marina, Valparaíso 28(2): 239-246.

Triploids were induced in the scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819, by treating the fertilized eggs with citochalsin-B (0.5 mg/l CB in DMSO 0,005%). Ploidy level was estimated by chromosome counting 8 hours after fecundation. Treatment with CB produced a mean proportion of 17% of triploids against a 6% observed in the controls treated with DMSO (0,005%). A high proportion of aneuploids were observed in both treated and untreated larvae. Data indicate that the use of citochalsin-B is useful to induce poliploidy in *A. purpuratus*. The factors which affect the efficiency of citochalsin-B treatment are discussed.

Key words: Poliploidy; trocophora; cromosomes; scallop.

RESUMEN: Winkler, F.; Ladrón de Guevara, B.; Estévez, B. & L. Jollán. 1993. Inducción a triploidía en *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819, mediante Citocalasina-B. Revista de Biología Marina, Valparaíso 28(2): 239-246.

Se indujo triploidía en *Argopecten purpuratus*, mediante tratamiento de ovocitos recién fecundados con citocalasina-B (0,5 mg/l CB en 0,005% DMSO). El nivel de ploídía se determinó a las 8 horas post-fecundación por recuento del número de cromosomas. Las larvas tratadas con CB presentan una proporción media de 17% de triploides contra un 6% observado en los controles tratados sólo con DMSO (0,005%). Además, se observó una alta proporción de aneuploides tanto en larvas tratadas como no tratadas. Los resultados indican que el uso de Citocalasina-B es útil para inducir poliploides en *A. purpuratus*. Se discuten los factores que afectan la eficiencia del tratamiento con citocalasina-B.

Palabras claves: Poliploidía; trocófora; cromosoma; ostión.

INTRODUCCION

La triploidía es una condición en la que los individuos presentan una dotación cromosómica completa en exceso (3N) respecto de los diploides normales (2N). La presencia de un set extra de cromosomas interfiere con el apareamiento sináptico durante la meiosis evitando la maduración normal de las células reproductivas (Baron *et al.* 1989). De este

modo, en especies de reproducción cruzada, los individuos afectados generalmente presentan esterilidad total o parcial. Sólo en algunos casos la condición de esterilidad es rota por la ocurrencia de reproducción mediante partenogénesis, originándose especies formadas sólo por hembras (ej. Hubbs & Hubbs 1932).

En diversas especies de peces y moluscos se ha logrado la obtención experimental

¹ Departamento de Biología Marina, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Larrondo 1281, Coquimbo, Chile.

de organismos triploides mediante el uso de agentes físicos y químicos (Purdon 1983, Beaumont & Fairbrother 1991). Disponer de estos individuos reviste interés básico y aplicado. Por una parte, su condición de esterilidad permite realizar estudios fisiológicos sobre presupuesto energético (Allen & Downing 1986, 1990), fisiología del crecimiento (Tabarini 1984, Mason *et al.* 1988) o experimentos ecológicos de trasplante a otros hábitats con un razonable margen de seguridad, cuando la esterilidad es total.

Por otra parte, los individuos estériles, al no canalizar energía hacia reproducción, suelen presentar mejores tasas de crecimiento. En moluscos se ha demostrado que los individuos triploides crecen más rápido (Tabarini 1984, Komaru & Wada 1989) y muestran estabilidad en el índice gonádico y en los niveles intracelulares de glicógeno a lo largo del año (Allen & Downing 1986).

En Chile, *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819, es la especie de bivalvo más intensamente cultivado. Desde el establecimiento de su veda permanente en 1986, la única fuente de producción de este molusco es por sistemas de cultivo, lo que ha dado origen a una activa industria. En esta especie, tanto el crecimiento como la composición bioquímica se ven afectados por la maduración sexual (Martínez 1991). Sin embargo, no se dispone de información respecto al efecto relativo de los procesos reproductivos sobre el crecimiento o los cambios bioquímicos. La producción de individuos triploides de esta especie, por lo tanto, puede contribuir a una mejora en la producción y a esclarecer los procesos fisiológicos asociados a su desarrollo.

Entre los métodos para inducir triploidía en moluscos, el más eficiente parece ser el uso del alcaloide Citocalasina-B (CB) (Beaumont & Fairbrother 1991), que previene la polimerización de la actina durante la división celular. Si es aplicado en el momento apropiado puede evitar la expulsión de uno de los corpúsculos polares, reteniendo de esta manera un set cromosómico haploide materno extra, el que se suma al set materno normal y al aportado por el espermatozoide. En pectínidos se ha logrado inducir triploidía usando CB en las especies *Pecten maximus* (Beaumont 1986), *Chlamys varia* (Baron *et al.* 1989), *Argopecten irradians* (Tabarini 1984) y *Chlamys nobilis* (Komaru *et al.* 1988, Komaru & Wada 1989).

En el presente trabajo se estudió el efecto de la Citocalasina-B (CB) como agente triploidizante en *A. purpuratus*, y se adaptó la metodología existente para la verificación de los niveles de ploidía mediante el conteo cromosómico.

MATERIALES Y METODOS

Treinta reproductores provenientes de Bahía Tongoy, Chile (30°17'S, 71°37'12"W) fueron trasladados al laboratorio y acondicionados durante 15 días, alimentados *ad libitum* con *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana* var *tahiti* y *Rhodomonas* sp.

El desove y fecundación se realizó de acuerdo a DiSalvo *et al.* (1984), usando aproximadamente 7 espermatozoides por ovocito, a una temperatura de 23°C. La expulsión del primer corpúsculo polar (CPI) se siguió en un microscopio inver-

tido. La inducción a triploidía se realizó cuando aproximadamente el 70% de los ovocitos había expulsado el CPI, aproximadamente 24 min. post-fecundación. Para ello la mitad de los ovocitos se sumergió por 20 min. en una solución con citocalasina-B (CB) disuelta en agua de mar microfiltrada (0.5 mgCB/l) con Dimetil Sulfoxido (DMSO) (0,005% final). La otra mitad se sumergió en agua de mar con DMSO (0,005% final), como control. Luego los huevos fueron lavados con una solución de agua de mar y DMSO al 0,005% y transferidos por 30 min. a agua de mar con DMSO (0,005%). Finalmente se pasaron a agua de mar fresca y se cultivaron por aproximadamente 8 horas. Se utilizaron los gametos femeninos de dos individuos, los que se trataron en forma separada siguiendo el protocolo anterior. Los espermatozoides se obtuvieron de un acervo proveniente de al menos veinte reproductores a fin de aleatorizar los efectos debidos al aporte de los machos.

Al estado de trocófora, las larvas se trataron con una solución de Colchicina al 0.2% por 30 min., se sometieron a un baño hipotónico (50% agua de mar) por 30 min. y se fijaron en Metanol: Ac. acético 3:1. Las observaciones de los cromosomas se hicieron sobre preparaciones permanentes obtenidas por la técnica de aplastado y teñidas con Foulgen o Gimsa. En cada placa metafásica que tuviera cromosomas contables, es decir no superpuestos, se hizo un recuento directo, el que se verificó sobre ampliaciones fotográficas. Para cada placa se identificó el individuo correspondiente y su tratamiento (tratado o control) respectivo. Las frecuencias de diploides y triploides en los grupos tratados y controles

se compararon mediante una prueba de independencia de χ^2 .



Figura 1. Cariotipo ordenado (A) y placa metafásica (B) de una larva trocófora diploide ($2N = 32$ cromosomas) de *A. purpuratus*.

RESULTADOS

La figura 1 muestra una placa metafásica diploide normal ($2N = 32$ cromosomas) y el cariotipo ordenado obtenido de larvas trocóforas de *A. purpuratus*. En la figura 2 se observa la placa de un individuo triploide ($3N = 48$ cromosomas) y su cariotipo ordenado. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos de inducción a triploidía. En cada caso se examinaron 25 o más placas metafásicas, correspondientes a 24 o más larvas. Puede apreciarse que la

proporción de placas triploides en los controles tratados con DMSO es escasa, representando en promedio un 6.1% en los dos tratamientos, contra un 24% de diploides. Por el contrario, la frecuencia de placas diploides en las larvas tratadas con citocalasina-B es escasa (1,8% en promedio) y se incrementa la proporción de triploides (17,1%). La diferencia de

frecuencia de placas diploides y triploides entre larvas tratadas con DMSO y CB es significativa en ambos experimentos ($p < 0,005$). En los dos grupos, tratados y no tratados, se presenta una alta frecuencia de aneuploidías, siendo ellas aproximadamente un 10% más frecuentes en las larvas tratadas con citocalasina-B.

Tabla 1. Número de larvas, placas y frecuencia de larvas diploides, triploides y aneuploides en larvas trocóforas de *A. purpuratus* tratadas con DMSO y citocalasina-B (CB) a los 25 minutos post-fecundación.

Experi- mentos	Trata- mientos	Nº de Larvas	Nº de Placas	2N		3N		aneuploides	
				Nº	%	Nº	%	Nº	%
A	DMSO	24	25	8	32,0	0	0	17	8,0
	CB	35	53	1	1,9	7	13,2	5	84,9
B	DMSO	39	57	12	21,1	5	8,8	40	70,2
	CB	53	58	1	1,7	12	21,1	45	77,2
Total	DMSO	63	82	20	24,4	5	6,1	57	69,5
	CB	88	111	2	1,8	19	17,1	90	81,1
TOTAL		151	193	22		24		147	



Figura 2. Cariotipo ordenado (A) y placa metafásica (B) de una larva trocófora triploide ($3N = 48$ cromosomas) de *A. purpuratus*.

En la figura 3 se muestra la distribución de frecuencia de placas según el número de cromosomas que presentaron, resumidos los resultados de los dos experimentos. Se aprecia que las modas del número de cromosomas por placa se encuentran en valores múltiplos de 16 (32 y 48). Las placas aneuploides son más frecuentes en valores próximos a los de ploidía perfecta (2N ó 3N), pero también se presentan entre, bajo y sobre dicho rango. No se registraron placas con dotación haploide. La proporción de placas tetraploides ($4N = 64$), por otra parte, es muy escasa y tanto en las larvas tratadas como en el control su frecuencia no sobrepasa la observada para aneuploides con dotación superior a $3N+2$ cromosomas (Figura 3).

No se observaron alteraciones evidentes en la morfología cromosómica

respecto de las descritas por von Brand *et al.* (1990) para la especie.

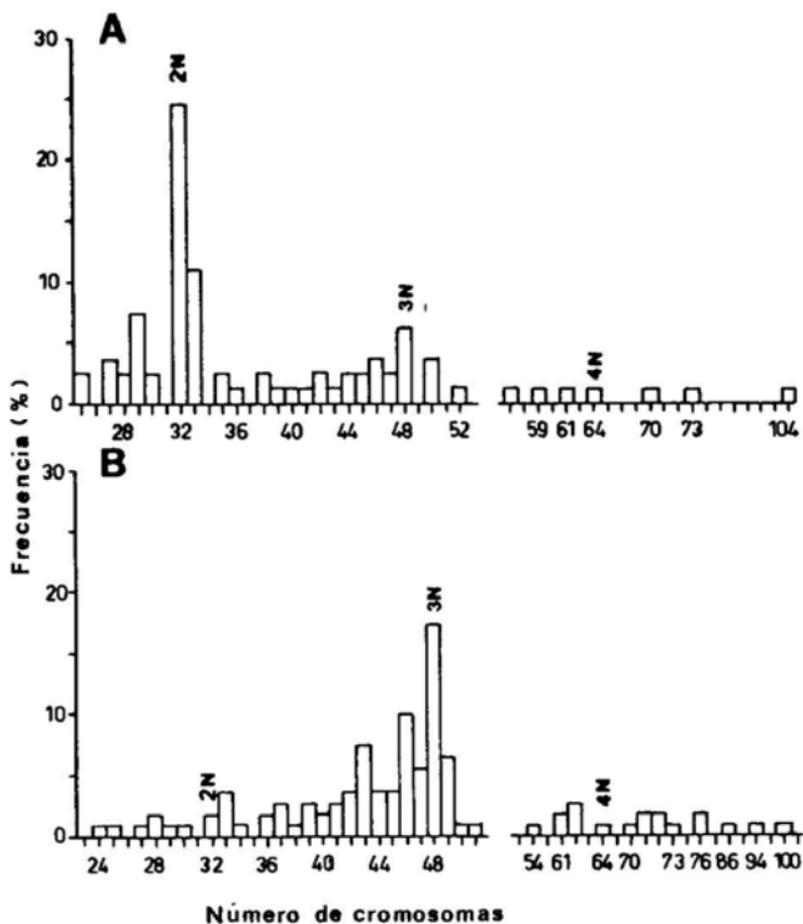


Figura 3. Distribución de frecuencia de placas metafásicas según el número cromosómico en larvas trocóforas de *A. purpuratus* tratadas para inducción de triploidía con DMSO (control) y Citocalasina-B (tratadas), sumados experimentos A y B.

DISCUSION

La distribución de frecuencias del número de cromosomas encontrados en este estudio muestra valores modales múltiplos de 16, lo que concuerda con el número cromosómico haploide descrito para esta especie (von Brand *et al.* 1990).

La aplicación de citocalasina-B causó un incremento significativo en la frecuencia de individuos con dotación triploide ($3N = 48$). Un resultado inesperado es la presencia, aunque en baja frecuencia, de individuos triploides en el control tratado sólo con DMSO. No existen informes previos de este fenómeno durante la inducción a triploidía en Pectínidos u otra especie de moluscos. Sin embargo, la aparición de individuos aneuploides asociados a tratamientos para producir poliploides suele ser frecuente (Wada, com. pers.) aunque no ha sido informado en publicaciones sobre el tema. La dispersión de las mediciones de DNA en torno de los valores exactos esperados para diploides y triploides (Stanley *et al.* 1984, Tabarini 1984, Chaiton & Allen 1985, Komaru *et al.* 1988, Komaru & Wada 1989) podría explicarse en parte por esta causa. Así, los individuos triploides encontrados en el control tratado con DMSO podrían corresponder a una categoría de la distribución continua de aneuploides con dotación mayor a $2N$, y no específicamente a organismos triploides. Las posibles causas de la producción de estos aneuploides no se han determinado.

La ocurrencia de placas con dotación tetraploide no parece ser un efecto específico del tratamiento, dada su escasa frecuencia. La comparación de los resul-

tados en el grupo tratado y control sugiere que la aplicación de CB exagera alteraciones en el nivel de ploidía que incluyen la producción inespecífica de células con dotación anormal superior a la condición triploide, incluidos tetraploides, pero no induce específicamente la formación de éstos.

La eficiencia global del tratamiento presentado en este estudio ha sido inferior a la informada en otras especies de pectínidos (Beaumont & Fairbrother 1991). Los porcentajes máximos de triploidía informados en la literatura para este grupo de moluscos, usando inducción con CB, varían de 30% en *Pecten maximus* (Beaumont 1986) hasta un 94% en *Argopecten irradians* (Tabarini 1984). Las diferencias en la eficiencia de poliploidización en moluscos se deben a diversos factores. Destacan la concentración de la CB, la temperatura y la duración del tratamiento, así como el momento post-fecundación en que se aplica (Downing & Allen 1987). La contribución de cada uno de estos factores no está suficientemente estudiada en pectínidos, existiendo sólo alguna información referente al efecto de la dosis (Tabarini 1984, Komaru & Wada 1989).

Aparte de los factores antes mencionados, que afectan la eficiencia de triploidización, la estimación de ella depende del momento en que se haga la evaluación del nivel de ploidía. El mejor rendimiento (94%) se observó en animales de un año de edad (Tabarini 1984), mientras que el peor (30%, Beaumont 1986) en embriones tres horas post-fecundación. Valores intermedios se han encontrado en larvas trocóforas de 8 horas post-fecundación (78,5%, Baron *et al.*

1989) y juveniles de 8 meses de edad (88%, Komaru *et al.* 1988). En todos los casos informados se ha observado que existe un incremento de la mortalidad en las poblaciones de cigotos tratados con CB (Tabarini 1984, Beaumont 1986, Baron *et al.* 1989), lo que sugiere que los individuos aneuploides pueden ser eliminados de la población por mortalidad diferencial, haciendo aparecer diferencias espúreas en la eficiencia del tratamiento. La frecuencia de aneuploides encontrada en este estudio se aproxima a la proporción de larvas muertas en el período de cigoto a veliger observado por Tabarini (1984), lo que nos permite sugerir que la alta mortalidad generalmente asociada a la inducción con citocalasina-B podría deberse al efecto de las aneuploidías causadas por el tratamiento. Komaru & Wada⁽¹⁾ han observado en larvas obtenidas de triploides de *Pinctada fucata*, que los cigotos aneuploides y con ploidías distintas de 2N ó 3N desaparecen durante el desarrollo larval.

Un segundo factor que afecta la estimación del rendimiento de la inducción es el criterio de considerar en los recuentos sólo las placas que presentan un número múltiplo de $N \pm 2$ cromosomas para definir el nivel de ploidía, lo que oculta la existencia de aneuploides. Si los datos del presente trabajo se corrigen de acuerdo con este criterio, la frecuencia de triploides obtenida se encuentra dentro de los márgenes informados en la literatura (Beaumont & Fairbrother 1991).

De este modo, el uso de citocalasina-B ha mostrado ser eficiente para inducir la producción de triploides mediante la retención del segundo corpúsculo polar en *A. purpuratus*. Sin embargo, el uso de esta tecnología a nivel comercial dependerá, por una parte, de poder determinar la forma y momento más adecuados para la aplicación del tratamiento y, por otra, del rendimiento que tengan los triploides frente a los diploides normales.

(1) Komaru, A. & K. T. Wada. 1992. Performance of larvae from oocytes produced by triploid pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. Genetic and Evolution of Aquatic Organisms Congress. Bangor, UK. pp. 33.

AGRADECIMIENTOS

Los autores hacen presente sus agradecimientos por el apoyo brindado por la Unidad de Producción de la Universidad Católica del Norte, Sede Coquimbo, y a dos correctores anónimos por sus valiosos comentarios. Financiado por proyecto: "Mejoramiento genético del ostión del Norte (*Argopecten purpuratus*)". FDP-CORFO.

LITERATURA CITADA

- Allen, S. K., Jr & S. L. Downing. 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 102: 197-208.

- Allen, S. K., Jr. & S. L. Downing. 1990. Performance of triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Gametogenesis. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 47: 1213-1222.
- Baron, J.; Diter, A. & A. Boday. 1989. Triploidy induction in the black scallop (*Chlamys varia* L) and its effect on larval growth and survival. Aquaculture 77(2-2): 103-111.
- Beaumont, A.R. 1986. Genetic aspects of hatchery rearing of the scallop, *Pecten maximus* (L). Aquaculture 57 :99-110.
- Beaumont, A. R. & J. E. Fairbrother. 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. Journal of Shellfish Research. 10: 1-18.
- Chaiton, J.A. & S.K. Allen. 1985. Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, by flow cytometry. Aquaculture 48: 35-43.
- DiSalvo, L. H.; Alarcón, E.; Martínez, E. & E. Uribe. 1984. Progress in mass culture of *Chlamys (Argopecten) purpurata* Lamarck, 1819 with notes on its natural history. Revista Chilena de Historia Natural 57: 35-45.
- Downing, S.L. & S. K. Allen, Jr. 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: optimal treatment with cytochalasin-B depend on the temperature. Aquaculture 61: 1-15.
- Hubbs, C.L. & L.C. Hubbs. 1932. Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin. Science 76: 628-630.
- Komaru, A. & K. T. Wada. 1989. Gametogenesis and growth of induced triploids scallops. *Chlamys nobilis*. Nippon Suisan Gakkaishi 55: 447-452.
- Komaru, A.; Uchimura, Y.; Ieyama, H. & K. T. Wada. 1988. Detection of induced triploid scallops *Chlamys nobilis* by DNA microfluorometry with DAPI staining. Aquaculture 69: 201-209.
- Martínez, G. 1991. Seasonal variation in biochemical composition of three size classes of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck 1819. The Veliger 34: 335-343.
- Mason, K. M.; Shumway, S. E.; Allen S. K. & H. Hidu. 1988. Induced triploidy in the soft-shelled clam *Mya arenaria*: energetic implications. Marine Biology. 98: 519-528.
- Purdon, C.E. 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. Aquaculture 3: 287-300.
- Stanley, J.g.; Hidu, H. & S. K. Allen, Jr.. 1984. Growth of american oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. Aquaculture 37: 147-155.
- Tabarini, C. L. 1984. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. Aquaculture 42: 151-160.
- von Brand, E.; Bellolio, G. & K. Lohrmann. 1990. Chromosome number of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. Tohoku Journal of Agricultural Research 40: 91-95.