

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en

Estandarización de protocolo para medición de poblaciones
triploides en moluscos bivalvos

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniería Acuicultura

Presentado por:

Cinthia Nathaly Medina Abarca

GUAYAQUIL - ECUADOR

2021-2022

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Protocol standardization for measuring triploid populations in
bivalve molluscs

INTEGRATION PROJECT

Prior to obtaining the title of:

Aquaculture Engineer

Presented by:

Cinthia Nathaly Medina Abarca

GUAYAQUIL - ECUADOR

2021 – 2022

DEDICATORIA

El presente proyecto se lo dedico:

A Dios Todopoderoso mi creador, mi pilar fuerte, mi fuente de inspiración, sabiduría, conocimiento y entendimiento. Él ha sido la fuente de mi fuerza a lo largo de este programa y solo en sus alas he volado. A mi madre Gladys Abarca y mis tíos Maria Luisa Abarca y Robert Roybal por ser siempre apoyarme y no dejarme caer en los momentos más difíciles de mi vida. A mis hermanos Javier, Andrés y Ricardo que estoy agradecida por tenerlos en mi vida. A todos mis amigos, gracias por su comprensión y aliento en muchos momentos de crisis, nuestra amistad hace de mi vida una experiencia maravillosa. No puedo enumerar todos los nombres aquí, pero siempre están en mi mente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al cuerpo docente y administrativo de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) y de la Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias del Mar (FIMCM), y Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) quienes fueron de preciada ayuda para la realización de este proyecto. En especial, agradezco, Mgtr. Jerry Landívar y Daniel Pesantes. Agradezco a todos mis compañeros de la carrera por cada experiencia para culminar esta etapa de mi vida.

DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Cinthia Nathaly Medina Abarca y doy mi consentimiento para que la ESPOI realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

Cinthia Medina Abarca

Cinthia Medina Abarca

EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:
JOSE JERRY
LANDIVAR
ZAMBRANO

M.Sc. Jerry Landívar Zambrano

PROFESOR DE LA MATERIA



Firmado electrónicamente por:
JOSE JERRY
LANDIVAR
ZAMBRANO

M.Sc. Jerry Landívar Zambrano

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

La producción de mariscos y crustáceos a través de la acuicultura juega un papel importante, así que este trabajo tiene como objetivo evaluar el método para determinar la ploidia de las poblaciones de las ostras *Crassostrea gigas*, además de habilitar nuevas aplicaciones para Varioskan Lux, el dispositivo es multifuncional y puede usarse para identificar triploides en moluscos bivalvos (*Crassostreas gigas*) por fluorescencia con colorantes DAPI no destructivos para el material genético metodología los reproductores para este estudio ostras de unos 4 cm de tamaño de las aguas de San Pedro son seleccionadas visualmente y transportadas al laboratorio de CENAIM-ESPOL, San Pedro, Santa Elena que una vez se sacan las ostras del mar se les lleva al laboratorio y allí se les restriega y se lava las ostras meticulosamente para retirar la epifauna (incrustaciones) y sedimentos adheridos en cuanto resultados las mediciones usando citometría de flujo mostraron claramente que la distribución de frecuencia de los núcleos celulares teñidos con DAPI podría estimar la triploidia y diploida en las ostras *crassostreas gigas*. Se concluye que el equipo varioskan-lux mide la cantidad de núcleos celulares, intensidad de fluorescencia de 200 nm en los diploides alrededor de 300 nm en los triploides se puede demostrar en muestras que contienen cantidades un 25 % más altas de ADN que los triploides que los diploides, además el material genético de los triploides y diploides de las muestras de las *crossostreas gigas* y cuanto tenía de porcentaje más en los cromosomas.

Palabras Clave: acuicultura, ploidia, ostras *Crassostrea gigas*, varioskan

ABSTRACT

The production of shellfish and crustaceans through aquaculture plays an important role, so this work aims to evaluate the method to determine the ploidy of the populations of Crassostrea gigas oysters, also to give a new application to the Varioskan Lux this equipment has several functions, to use it to identify the triploidy in bivalve mollusks (Crassostreas gigas) through fluorescence by means of a DAPI dye that does not damage the genetic material methodology reproducers for this study oysters of about 4 cm in size from the waters of San Pedro are visually selected and transported to the laboratory of CENAIM-ESPOL, San Pedro, Santa Elena. Once the oysters are removed from the sea they are taken to the laboratory and there the oysters are scrubbed and washed meticulously to remove the epifauna (fouling) and adhered sediments as results the measurements using flow cytometry clearly showed that the frequency distribution of the cell nuclei stained with DAPI could estimate the triploidy and diploidy in crassostreas gigas oysters. It is concluded that the varioskan-lux equipment measures the amount of cell nuclei, fluorescence intensity of 200 nm in diploids around 300 nm in triploids can be demonstrated in samples containing 25 % higher amounts of DNA than triploids than diploids, furthermore the genetic material of triploids and diploids of crossostreas gigas samples and how much had of percentage more in chromosomes.

Keywords: *aquaculture, ploidy, Crassostrea gigas oysters, variouskan*

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
ADN	Ácido desoxirribonucleico

SIMBOLOGÍA

Cm Centímetro

Nm Nanómetro

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES	6
RESUMEN	I
<i>ABSTRACT</i>	II
ABREVIATURAS	III
SIMBOLOGÍA	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
CAPÍTULO 1	1
1. Introducción	1
1.1 Descripción del problema	2
1.2 Justificación del problema.....	3
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo General	3
1.4 Marco teórico	4
CAPÍTULO 2.....	7
2. Metodología	7
2.1 Inducción al desove	7
2.2 Inducción a la triploidia	8
2.3 Extracción hemolinfa	8
2.4 Preparación tinte DAPI	8
CAPÍTULO 3.....	10
3. Resultados Y ANÁLISIS.....	10
CAPÍTULO 4.....	13
4. Conclusiones Y Recomendaciones	13

4.1	Conclusiones	13
4.2	Recomendaciones	13
	BIBLIOGRAFÍA	14
5.	Bibliografía	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. Diploides Hemolinfa	10
Ilustración 2 Diploides	11
Ilustración 3 Tríproides.....	12

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

“La acuicultura en América Latina ha experimentado un crecimiento constante en los últimos 20 años, sobre todo en camarones en Ecuador y México y salmones y mejillones en Chile” (Lovatelli & Lovatelli, 2008). De acuerdo a los estudios e investigaciones realizadas por el FAO nos indica que en 2005 se produjeron en la región unas 130 000 toneladas de moluscos, lo que nos enseña el incremento de interés de los pescadores industriales por la acuicultura de bivalvos, de gran importancia comercial (Lovatelli & Lovatelli, 2008). Una de las ventajas del fitoplancton es que se filtra y consume de forma natural, lo que significa que la inversión necesaria para la acuicultura a gran escala es menor que para la piscicultura y la conchicultura, y el impacto medioambiental es menor (Lovatelli & Lovatelli, 2008). Una de las ventajas del fitoplancton es que se filtra y consume de forma natural, lo que significa que la inversión necesaria para la acuicultura a gran escala es menor que para la piscicultura y la conchicultura, y el impacto medioambiental es menor (Lovatelli et al., 2008).

La producción mundial de marisco (recolección más acuicultura) ha ido en aumento de una manera considerable en los pasados 50 años, yendo en 1950 de un aproximado a 1 millón de toneladas hasta 13,6 millones de toneladas en 2005 (Lovatelli et al., 2008). La producción acuícola mundial de bivalvos creció de más de 3,3 millones de toneladas en 1990 a casi 12 millones de toneladas en 2005, con una tasa del incremento en el promedio del 8,9 por ciento anual durante este período. En 2005, se cultivó el 87,3 por ciento de la producción total de bivalvos en el mundo (Lovatelli et al., 2008).

“Los primeros estudios sobre triploides en moluscos se remontan a 1979, cuando John G. Stanley, Stan Allen y H. Hidu evaluaron la inducción de triploides en la ostra americana *Crassostrea virginica*” (Stanley, 1981). Con el apoyo de la NSF, entre 1983 y 1986 se llevaron a cabo en la Universidad de Washington investigaciones sobre la biología y la producción de ostras triploides en colaboración con Coast Oyster Company y Wescott Bay Sea Farms, lo que permitió ampliar con éxito la producción de ostras triploides hasta niveles comerciales (Maldonado-Amparo et al., 2016).

“La inducción de ploidía ya es una realidad en moluscos, especialmente en triploides” (Allen y Downing, 1986). “Los mejillones triploides tienen un mejor crecimiento o calidad de carne que los diploides” (Allen y Downing, 1986). “Esto se debe principalmente a que el estado triploide es parcial o completamente asexual, por lo que la energía disponible para la formación y maduración del gametofito está disponible para su crecimiento” (Allen y Downing, 1986).

En este estudio, encontramos que el objetivo principal del proyecto era evaluar un método para determinar la densidad de población de las ostras *Crassostrea gigas*.

1.1 Descripción del problema

Darle un nuevo uso al Varioskan Lux ya que cuenta con características como intensidad de fluorescencia (FI), fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF), absorbancia (Abs) y luminiscencia puede ofrecer nuevas aplicaciones para la identificación de triploides bivalentes por fluorescencia con colorantes DAPI que no dañan el ADN de la muestra.

Con el fin de normalizar el método de identificación de diploides bivalvos por fluorescencia (varioskan) utilizando colorantes que no afecten al ADN de la muestra.

1.2 Justificación del problema

Otro método para poder sacar la triploidia de los moluscos más específico de las ostras *Crassostrea gigas*. Para dar a Varioskan Lux una nueva aplicación, dado que este dispositivo tiene varias funciones como intensidad de fluorescencia (FI), fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF), absorbancia (Abs) y luminiscencia, podemos utilizarlo para identificar la triploidia en moluscos bivalvos (*Crassostrea gigas*) mediante fluorescencia con un colorante DAPI que no daña el material genético de las muestras.

Para confirmar la ploidía se utilizaron diversos métodos (por ejemplo, citometría de flujo, cariotipado y análisis granulométrico). La citometría de flujo, en la que el nivel de ploidía y el contenido de ADN de las células se comparan con un control conocido, ha sido el método directo preferido para verificar la triploidia en las ostras, ya que se pueden analizar cientos de muestras simultáneamente y determinar el porcentaje relativo de inducción de triploidia (Harrell et al., 1995). Sin embargo, este método sólo proporciona una estimación aproximada del grado de duplicación, y la medición de la cantidad de ADN en una célula no sólo es lenta, sino también cara y laboriosa.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar el método para determinar la ploidia de las poblaciones de las ostras *Crassostrea gigas*

Objetivos Específicos:

- Establecer criterios y estándares para medir la productividad del método para inducir a la triploide en las ostras *Crassostrea gigas*.
- Estimar la cantidad relativa de ADN en la muestra de triploidia y diploide mediante citometría de flujo por medio del equipo de varioskan

- Comparar el material genético de las muestras de ostras *Cassostrea gigas* para conocer el porcentaje de triploides y diploides.

1.4 Marco teórico

Según Hidalgo Villacres y Vallejo Saavedra, (2018), indica que:

“La acuicultura de moluscos en Ecuador comenzó en 1990 con la creación del Centro Nacional de Acuicultura e Investigación Marina (CENAIM), cuyo principal objetivo es promover la producción sostenible de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y la diversificación de la acuicultura de moluscos y peces marinos”.

En continuación con lo ya estipulado Hidalgo Villacres y Vallejo Saavedra, (2018), también nos dicen que:

“La primera especie de molusco con la que se trabajó en Ecuador fue la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*), importada de Chile, la tecnología de cría de moluscos se desarrolló para su uso tanto en el mar como en las granjas de camarones (*Litopenaeus vannamei*)”.

“La ostricultura en alta mar se llevó a cabo frente a CENAIM, a unas 3 millas de la costa y a 15 metros de profundidad, el sistema de cría se llevó a cabo con palangres profundos y redes de cuentas” (Hidalgo Villacres & Vallejo Saavedra, 2018).

Los avances en la tecnología de cultivo y la biotecnología contribuyeron a este crecimiento en las últimas décadas (Melo,2017). La investigación biotecnológica, así como la manipulación de cromosomas (poliploidía) ha mostrado potencial para mejorar la producción acuícola, en partir de moluscos bivalvos (Melo 2017).

Un individuo triploide tiene tres juegos homólogos de cromosomas en las células corporales, en la mayoría de los peces y moluscos, la diploidía es el estado normal, es

decir, la presencia de dos juegos de cromosomas en cada célula corporal (Barreto Hernández,2016).

La inducción de triploidía en mariscos tiene como finalidad obtener un crecimiento más rápido y esterilidad de los animales criados, mediante la reubicación de energía de la reproducción al crecimiento (Piferrer, 2009). Estas características económicamente beneficiosas han llevado a que la triploidía se utilice en una amplia gama de moluscos cultivados, incluida la ostra del Pacífico, en la que los triploides representan el 30% de la producción mundial (Dunham, 2011).

Según Beaumont y Fairbrother, (1991), indica que:

“Dadas las características de la meiosis en estos organismos, los tratamientos pueden realizarse durante la meiosis I (MI) o la meiosis II (MII) para bloquear la formación del primer (MI) o segundo cuerpo polar (MII). Todos estos métodos pretenden evitar la división citoplasmática, que provocaría una reducción del número de cromosomas”.

En continuación con lo ya estipulado Beaumont y Fairbrother, (1991), también nos dicen que:

“El resultado de la inhibición de la división citoplasmática es un ovocito cuyo pronúcleo femenino es diploide, y la posterior "singamia" (fusión de los pronúcleos femenino y masculino) con un pronúcleo masculino haploide permite la formación de un cigoto triploide”.

“Para poder analizar la triploida tenemos varios métodos como es la citometría de flujo es una técnica sensible que permite hacer un análisis multiparamétrico y analizar cualitativamente y cuantitativamente” (Grasso, 2013). Esta técnica, que se desarrolló en la investigación biomédica para medir el volumen de ADN en las células, también se utiliza para evaluar el contenido de ADN de las células, que primero deben teñirse con

DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), que ilumina el ADN cuando lo atraviesa un rayo láser (Puente Carreón,2004). Los resultados obtenidos con esta técnica se registran determinando diferentes picos a diferentes intensidades relativas de fluorescencia (Puente Carreón,2004). El contenido medio de ADN de las células triploides es aproximadamente 1,5 veces superior al de las diploides (Puente Carreón,2004).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

Los reproductores para este estudio se obtuvieron de las líneas de mar de San Pedro se seleccionaron visualmente ostras de tamaño aproximadamente de 4 cm y se transportaron al laboratorio de molusco de CENAIM-ESPOL, San Pedro, Santa Elena.

Una vez se sacan las ostras del mar se les lleva al laboratorio de moluscos y allí se les restriega y se lava las ostras meticulosamente para retirar los organismos de la epifauna (incrustaciones) y sedimentos adheridos.

2.1 **Inducción al desove**

Grupos de 20 de ostras de *C.gigas* sexualmente maduros, fueron dejados sin alimentación por 24 h e inducidos al desove. Para ello, se hizo una limpieza de las ostras para eliminar cualquier animal externo, se colocaron en una bandeja para secar alrededor de 1 hora. El día anterior se purifico agua del mar con un filtro de UV para no tener contaminantes. Se distribuyo las ostras en un recipiente de vidrio transparentes a cada uno para evitar que se mezclaran espermias con ovocitos, almacenando los gametos de cada animal en su propio recipiente, se hizo choques térmicos con cambios de temperatura de 24°C a 32°C cada 30 min con unas repeticiones de 6 veces (3 horas).

2.2 Inducción a la triploidía

Para el tratamiento con citocalasina b, se preparó una solución de 0,5 mg-l de citocalasina b y 0,5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO-C₂H₆SO) y se almacenó a -20°C (ALLEN et al., 1989).

La inducción a la triploidía se realizó cuando aproximadamente el 70% de los ovocitos había expulsado el primer cuerpo polar durante 14 minutos. Se o coloca en un tubo de malla cilíndrica (18 µm) y se sumergieron en 250ml de solución citocalasina b disuelta con agua de mar durante 13 minutos. Se observó la muestra en el microscopio con un lente 10x en el momento en que aparece la formación del segundo cuerpo polar ya ahí se debe usar dimetilsulfóxido DMSO al a.5 ml para enjuagarlo y se esperó 15min.

2.3 Extracción hemolinfa

Se extrajo de 10 ostras *Crassostreas gigas* la hemolinfa con una jeringa de 1ml con citrato de sodio un anticoagulante y se lo colocaba la muestra en un tubo de Eppendorf para así poder analizar la muestra.

2.4 Preparación tinte DAPI

En 50 mililitros de agua destilada disolvimos 0.85 gramos de NaCl y 0.12 gramos de Tris base después lo ajustamos el pH con ácido clorhídrico hasta 7.4.

Además, se adiciona 0.4 mililitros de la solución CaCl₂, 0.44 mililitros de la solución de MgCl₂, 0.50 miligramos de BSA, 0.1 mililitro de Tritón X-100, 0.10 miligramos de DAPI 10 mililitros de DMSO y esto lo aforamos a 100 mililitro con agua destilada.

Para la Preparación de la solución de cloruro de calcio (CaCl_2) se procuró que la solución debe estar 500 mM, se peso 0.735 gramos de cloruro de calcio y se ajustó el volumen a 10 mililitros de agua destilada.

En la hemolinfa se hizo soluciones de 1 ml en un tubo Eppendorf con concentraciones de 1:10, 1: 2 ,1: 3 de la solución de Dapi.

En la muestra de triploides y diploides se hizo soluciones de 1 ml en un tubo Eppendorf con concentración 1:10, 1:20 , 1:40 con la solución de Dapi.

En una placa de 96 pocillos colocamos las muestras y después lo analizamos en el equipo Varioskan- Lux para poder observar su fluorescencia. Con una calibración de 358-461 excitación- emisión (nm).

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Las mediciones usando citometría de flujo mostraron claramente que la distribución de frecuencia de los núcleos celulares teñidos con DAPI podría estimar la triploidia y diploidía en las ostras *Crassostreas gigas*. Se exhibió la hemolinfa de las ostras diploides usados como control.

En la figura 1 se muestra la muestra de hemolinfa inducida con 3 concentraciones 1:10, 1: 2, 1:3 con la solución Dapi, nos quedamos con la solución 1:10 ya que con esta se ve mayor ADN. En la figura 2 se muestra la muestra de diploides inducida con 3 concentraciones 1:10, 1:20, 1:30 con la solución dapi. En la figura 3 se muestra la muestra de triploide inducida con 3 concentraciones 1:10, 1:20, 1:30 con la solución dapi

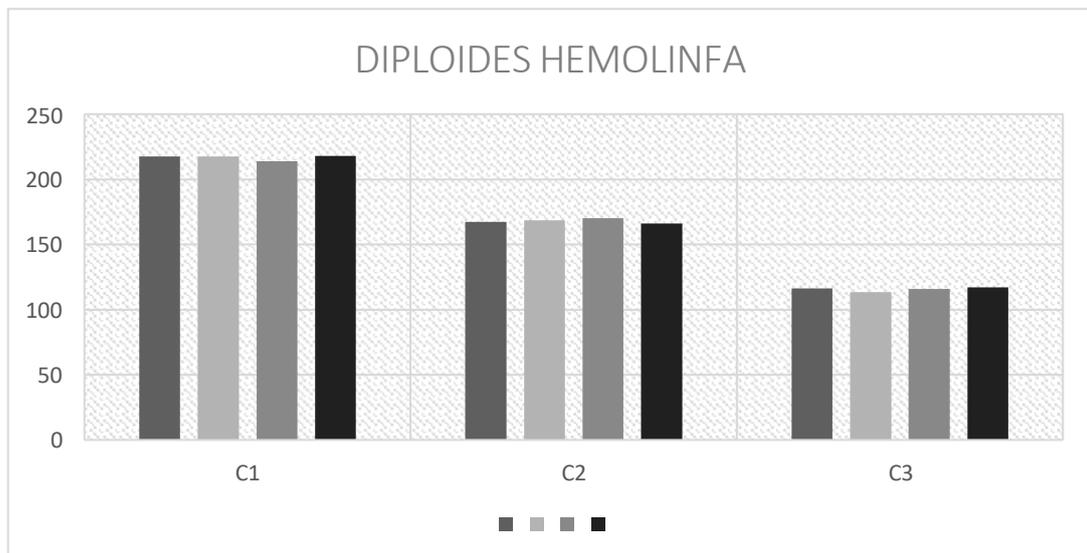


Ilustración 1. Diploides Hemolinfa

Fuente: Elaboración propia

Análisis: de citometría de flujo de muestras de ostras *crassostreas gigas* hemolinfa en diferentes concentraciones con el tinte Dapi. Concentración 1 1:10, concentración 2 1:2, concentración 3 1:3.

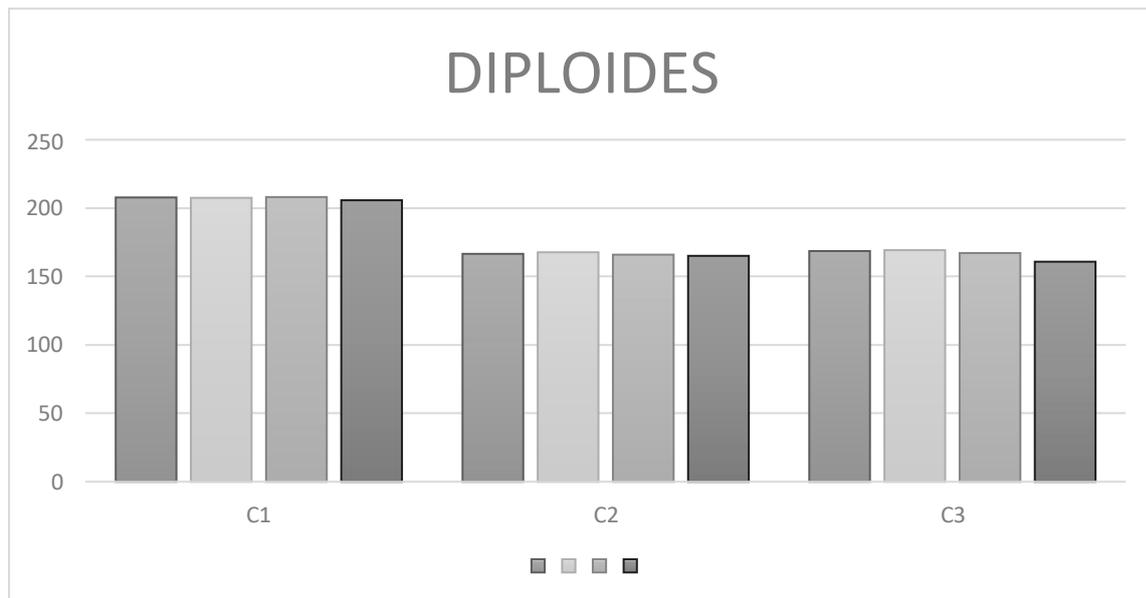


Ilustración 2 Diploides

Fuente: Elaboración propia

Análisis de citometría de flujo de muestras de ostras *Crassostreas gigas* de diploides en diferentes concentraciones con el tinte Dapi. Concentración 1 1:10, concentración 2 1:20, concentración 3 1:40.

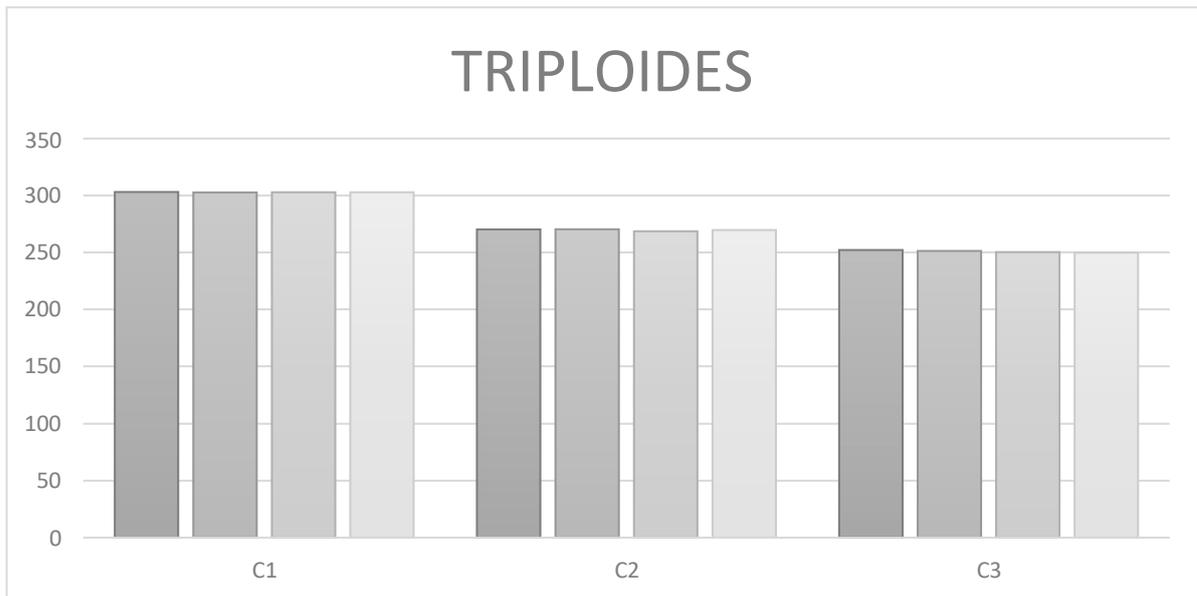


Ilustración 3 Triploides

Fuente: Elaboración propia

Análisis de citometría de flujo de muestras de ostras *Crassostreaa gigas* de triploides en diferentes concentraciones con el tinte Dapi. Concentración 1 1:10, concentración 2 1:20, concentración 3

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Se concluye que el equipo varioskan-lux mide la cantidad de núcleos celulares, intensidad de fluorescencia de 200 nm en los diploides alrededor de 300 nm en los triploides lo que se puede evidenciar en la muestra presentada que el 25% contiene más cantidad de ADN que los triploides que los diploides.

Se puede concluir que el material genético de los triploides y diploides de las muestras de las *Crossostreas gigas* y cuanto tenía de porcentaje más en los cromosomas.

4.2 Recomendaciones

- Para hacer la extracción de la hemolinfa las ostras no deben estar maduras ya que al extraer la hemolinfa podemos sacar una parte de la gónada.
- Para inyectar al sacar la hemolinfa se debe ser una forma inclinada, para no toparse con la gónada de las ostras.
- Al hacer la inducción al desove cada ostra en un recipiente separado para no mezclar los ovocitos con los espermatozoides.
- Con este método se puede estimar la triploidia, pero se deberá hacer más análisis para poder hacer una buena comparación, también con diferentes tintes.

BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

- Grasso, V. A.-C. (2013). Aplicación de la citometría de flujo al estudio de las células IgM positivas de doradas (*Sparus aurata*) vacunadas frente *Photobacterium damsela* subsp. Piscicida. *Revista Canaria de las Ciencias Veterinarias*.
- Hidalgo Villacres, J. P., & Vallejo Saavedra, M. E. (2018). *Sistema centralizado de administración de información entre las oficinas del CENAIM ubicadas en San Pedro (Península de Santa Elena) y la ESPOL (Campos Gustavo Galindo) a través de una red privada virtual*. Bachelor's thesis, Espol.
- Jouaux, A. H.-B. (2010). Gametogenic stages in triploid oysters *Crassostrea gigas*: Irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 395(1-2), 162-170.
- Lovatelli, A., Vannuccini, S., & McLeod, D. (2008). *Current status of world bivalve aquaculture and trade*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
- Lovatelli, F., & Lovatelli, U. (2008). *Estado Actual del Cultivo y Manejo de Moluscos Bivalvos y Su Proyección Futura: Factores Que Afectan Su Sustentabilidad En América Latina. Taller ... Chile (Fao Actas de Pesca y Acuicultura)*. Rome, Italy: Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Maldonado-Amparo, R., Verdugo, C. A., Ibarra, A. M., Rueda-Puente, E. O., Del Toro Sánchez, C. L., & Félix, F. R. (2016). Poliploidía En Moluscos De Importancia Comercial. A Review. *European scientific journal*, 69.