Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente 43 (1&2): 21-26 (2004); 1 Fig., 1 Tab.

VARIACIONES TEMPORALES DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL LOCUS ODH EN *EUVOLA ZICZAC* (LINNEO, 1758) (BIVALVIA : PECTINIDAE).

MORENO[2], J. Mª., C. ALFONSI[1], J. E. PÉREZ[1], & B. GÓMEZ[2]

[1]*Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.*

[2]*Departamento de Biología. Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Cumaná. Venezuela.*
jmmchemo@hotmail.com

RESUMEN: La enzima octopina deshidrogenasa (E.C. 1.5.1.11, Odh) cataliza la reacción : piruvato + arginina + NADH + H^+ octopina + NAD^+ + H_2O, manteniendo el balance redox NADH/NAD para que continúe la producción glucolítica de ATP durante la anoxia muscular producto del ejercicio. Se utilizó homogeneizado del músculo aductor para la electroforesis en gel de almidón al 10% y posterior tinción histoquímica. Se analizó en este estudio las fluctuaciones en las frecuencias alélicas del sistema enzimático Odh en el molusco bivalvo *E. ziczac* proveniente de la localidad de Chacopatica, Golfo de Cariaco, Venezuela, entre los años 1991 y 2004. En el año 2004 Odh se observó polimórfica con cuatro alelos con las siguientes frecuencias 0,514- 0,284 - 0,162 - 0,041 (Ho = 0,378; He = 0,628; D = - 0,397) con un valor de X^2 = 13,204 ($p < 0,01$). Estas frecuencias son analizadas en forma comparativa con las encontradas en los años 1991, 1995, 1999 y 2002. Se discuten las fluctuaciones de las frecuencias génicas y las posibles causas de la falta de equilibrio de Hardy-Weinberg observada en las muestras de los años 2002 y 2004.

Palabras claves: Octopina deshidrogenasa, electroforesis, variación genética.

ABSTRACT: The enzyme octopine dehydrogenase (E.C. 1.5.1.11, Odh) catalyzes the reaction: pyruvate + arginine + NADH + H^+ $\longleftrightarrow$ octopine + NAD^+ + H_2O, maintaining the redox balance NADH/NAD so that glycolytic ATP production can continue during muscular work in anoxia resulting from exercise. Allele frequency fluctuations were analyzed of the Odh enzyme system of the bivalve mollusk *E. ziczac* from Chacopatica, in the Cariaco Gulf, Venezuela, between 1991 and 2004. Homogenized tissue from the mollusk's adductor muscle was studied using 10% starch gel electrophoresis followed by histochemical staining. In 2004, *E. ziczac* allelic frequencies for Odh were polymorphic, 4 alleles showing the following frequencies: 0.514 - 0.284 - 0.162 - 0.041 (Ho = 0.378; He = 0.628; D = -0.397) with a value of X^2 = 13.204 ($p < 0.01$). These frequencies were analyzed comparatively with those found in the years 1991, 1995, 1999, and 2002. The study discusses gene frequency differentiation and the possible causes for Hardy-Weinberg imbalances observed in population samples from 2002 and 2004.

Key words: Octopine dehydrogenase, electrophoresis, genetic variability

INTRODUCCIÓN

HUBBY & LEWONTIN (1966) y LEWONTIN & HUBBY (1966) estudiaron la variación genética enzimática en poblaciones naturales de *Drosophila pseudoobscura*. Este estudio, que analizó la variación protéica, sorprendió al mundo científico al señalar una variación genética muy superior a la encontrada hasta ese momento. Estos autores plantearon tres posibilidades principales para explicar la variación por ellos observada: 1) la selección a favor de los heterocigotos; una heterosis bastante fuerte puede mantener la variación genética en una población de cualquier tamaño independientemente de la mutación y la migración; 2) la selección tiende a eliminar los alelos alternativos, pero, la mutación los restaura; esta hipótesis se aproxima a la teoría de los isoalelos neutrales, pero, las frecuencias génicas de alelos alternativos observadas requerirían que los rangos de mutación y coeficiente de selección sean del mismo orden de magnitud; 3) los alelos no tienen relevancia para la selección natural, son isoalelos adaptativamente equivalentes; en tal caso, la deriva genética llevaría a las poblaciones a la homocigosidad, pero, esta sería impedida por la ocurrencia de mutación y migración.

Luego, KIMURA (1968) postuló la llamada teoría neutral de la evolución molecular, la cual sostiene que la gran mayoría de los cambios evolutivos a nivel molecular son causados no por selección natural actuando sobre mutantes desventajosos sino por fijación

al azar (debido a la deriva genética) de mutantes selectivamente neutrales o muy cercanamente neutrales bajo la continua presión de mutación. Los polimorfismos representarían una fase pasajera de la evolución molecular. La teoría neutral enfatiza el papel predominante que juegan la presión de mutación y la deriva genética al azar en los cambios evolutivos a nivel molecular. No niega el papel de la selección natural en la determinación de la evolución adaptativa, pero, se asume que sólo una mínima fracción se debe a selección.

La variación genética en las poblaciones determinada como la cantidad de heterocigosidad en diversos loci ha sido relacionada con la capacidad adaptativa del organismo a su ambiente. Así, VOLCKAERT & ZOUROS (1989) mostraron una correlación positiva entre la heterocigosidad y la acumulación de octopina en la vieira *Placopecten magellanicus* después de la locomoción. ALFONSI *et al.* (1995) observaron en la vieira *E. ziczac* una correlación positiva significativa entre heterocigosidad y la actividad de Odh.

En los moluscos de locomoción rápida o que presentan estallidos de actividad muscular de poca duración, las opinas deshidrogenasas realizan una función similar a la de la enzima lactato deshidrogenasa (Ldh, EC.1.1.1.27) en el músculo estriado de los vertebrados, manteniendo el balance redox NADH/NAD para que continúe la producción de ATP en el tejido durante períodos de anoxia muscular (GÄDE 1980a), pero, difiere en la reacción final: la reducción de piruvato, que es reemplazada por su condensación reductiva para formar un derivado del aminoácido, un compuesto llamado opina. Cuando el aminoácido que interviene en la reacción es la arginina, la opina que se forma se denomina octopina; esta reacción es catalizada por la enzima octopina deshidrogenasa (E. C. 1.5.1.11) (LIVINGSTONE 1983).

E. ziczac, es un pectínido hermafrodita funcional con fertilización externa. Una característica de esta especie es poseer una particular manera de desplazamiento por propulsión en zig-zag, lograda mediante abertura y cierre de sus valvas de manera rápida y repetitiva, por acción del músculo aductor (VÉLEZ *et al.* 1990).

En el presente trabajo se analiza el cambio en las frecuencias alélicas de la enzima octopina deshidrogenasa, en una población natural de la vieira *E. ziczac* ubicada en Chacopatica, Estado Sucre, Venezuela, durante un período de 14 años. Se discuten los resultados bajo los enfoques seleccionista y neutralista de la evolución.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de *E. ziczac* fueron recolectados mediante buceo autónomo en Chacopatica (10° 30' 10" Lat. N, 64° 13' 06" Long. W), Golfo de Cariaco, Estado Sucre, Venezuela durante los años 1990, 1994, 1998, 2002 y 2004 (CORONADO *et al.* 1991; FERNÁNDEZ 1995; RAMÍREZ 1999; MORENO 2002 y MORENO *et al.* 2004).

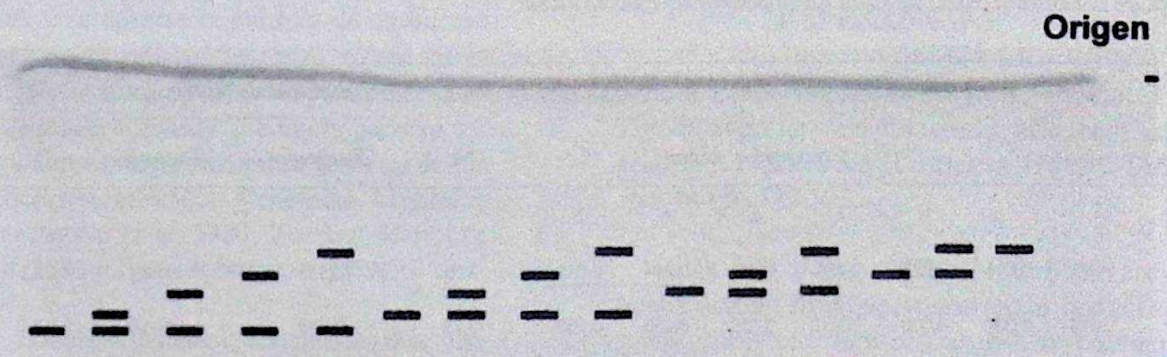
Las muestras fueron trasladadas vivas o refrigeradas hasta el Laboratorio de Genética de Organismos Marinos del Instituto Oceanográfico de Venezuela. Una vez en el laboratorio, una fracción del músculo de cada organismo fue homogeneizada en frío en agua destilada (1:1 m/V), y el homogenado sometido a electroforesis en gel de almidón al 10% y posterior tinción histoquímica según MORIZOT & SCHMIDT (1990).

Los alelos fueron identificados con letras minúsculas, designándose con la letra *a* al alelo más anodal. Las frecuencias alélicas, las desviaciones de los valores esperados para el equilibrio Hardy-Weinberg, la deficiencia o exceso de heterocigotos y el número efectivo de alelos en el locus fueron calculados mediante el programa computarizado Genes en las Poblaciones, versión 2 (PERKINS & PAUL 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La enzima Odh en *E. ziczac* de la población de Chacopatica, Golfo de Cariaco, Venezuela, se reveló en una sola zona de actividad enzimática. Las frecuencias alélicas y los fenotipos electroforéticos obtenidos para Odh entre los años 1991 y 2004 se muestran en la TABLA 1 y Fig. 1. En todos los muestreos, el alelo de mayor frecuencia fue el identificado con la letra *c*, seguido por *d* y *e*. Los alelos con frecuencias más bajas fueron en todos los casos *a*, *b* y *f*. Este patrón en las frecuencias, observado por alrededor de 14 años da indicios de un polimorfismo que tiende a mantenerse en el tiempo, a pesar de pequeñas fluctuaciones en las frecuencias.

Existen varias causas que podrían explicar la variación en la frecuencia de los diferentes alelos y su



Año	N	bb	bc	bd	be	bf	cc	cd	ce	cf	dd	de	df	ee	ef	ff
1995	113						27	39	14	5	8	12	2	3	2	1
1999	102		1				26	30	18	1	18	1	4	3		
2002	65	1	1	5	3	2	16	9	4	1	9	6	3	3	1	1
2004	37						15	5	2	1	6	4		2	2	

Figura 1. Zimograma representativo y números observados de los genotipos de Odh en *Eurola ziczac*.

mantenimiento en la población: a) migración, cuando de una población a otra fluyen alelos con frecuencias diferentes, modificando la frecuencia de los alelos de la población receptora y aumentando además, su variabilidad genética. Si el flujo génico es bastante grande, estas poblaciones se vuelven genéticamente similares. En el caso de la población en estudio, esta posibilidad se ve disminuida por no existir otros bancos naturales de esta especie dentro del Golfo de Cariaco. b) mutación, la variación se introduce en el acervo genético de la población por este evento, que es la fuente primaria de todos los alelos nuevos, pero la baja frecuencia de las mutaciones difícilmente explicaría los cambios en las frecuencias alélicas. c) deriva genética, que es la producción de cambios en las frecuencias alélicas al azar en las poblaciones pequeñas, mientras mas pequeña sea la población, mayor es la probabilidad de una desviación significativa de las frecuencias. y d) selección natural, que mediante supervivencia y reproducción diferencial de individuos que presentan diferentes genotipos haría fluctuar las frecuencias alélicas. Estos dos últimos procesos, de manera aislada o conjunta, pudiesen explicar las pequeñas fluctuaciones observadas en un patrón de distribución de frecuencia mantenido durante estos 14 años. La otra posibilidad del mantenimiento de este polimorfismo, lo plantea la hipótesis neutralista (KIMURA 1989). Los cambios evolutivos a nivel molecular serían causados por alelos selectivamente neutrales (o muy cercanos a la neutralidad) por deriva genética. El polimorfismo sería selectivamente neutro. Por otra parte, *E. ziczac* exhibió en el locus Odh una deficiencia de heterocigotos que se ha mantenido en distinto grado desde 1991 y que ha sufrido incrementos considerables desde el año 2002 (TABLA 1). La deficiencia de heterocigotos podría tener varias explicaciones:

Primero, por el efecto Wahlund, es decir, deficiencia de heterocigotos como resultado del agrupamiento de subpoblaciones con diferentes frecuencias alélicas. Esta explicación no se aplica a *E. ziczac*, ya que, de tratarse de subpoblaciones, éstas estarían ubicadas geográficamente en áreas muy cercanas y las diferencias de frecuencias alélicas, de existir, serían mínimas.

Segundo, que la deficiencia de heterocigotos sea debido a la existencia de alelos nulos o silentes, es decir, genes cuyos productos son inactivos, lo cual conduciría a registrar las combinaciones heterocigotas de estos alelos con cualesquiera otros como si fuesen homocigotos (GAFFNEY *et al.* 1990). En este caso, habría que asumir que el homocigoto para el alelo nulo es letal, pues, no se encontró, individuo alguno que no revelara para el locus Odh, lo que nos lleva a afirmar que los

TABLA 1. Polimorfismo de Odh en muestras de *Euvola ziczac*

Años	N	Frecuencias alélicas						Ne	Frecuencias de heterocigotos		D	X^2	p
		a	b	c	d	e	f		Observados	Esperados			
1991	45	0,011	0,033	0,456	0,244	0,244	0.011	3,05	0,533	0,603	- 0,12	8,82	> 0,05
1995	113	0,000	0,000	0,500	0,310	0,150	0,050	2,75	0,655	0,636	- 0,03	4,76	> 0,05
1999	102	0,000	0,005	0,495	0,311	0,165	0,024	2,66	0,621	0,631	- 0,014	3,72	> 0,05
2002	65	0,000	0,100	0,632	0,315	0,154	0,069	3,72	0,538	0,731	- 0,264	17,01	< 0,01
2004	37	0,000	0,000	0,514	0,284	0,162	0,041	2,68	0,378	0,628	- 0,397	13,20	< 0,01

CORONADO *et al.* 1991
FERNÁNDEZ, 1995
RAMÍREZ, 1999
MORENO, 2002
MORENO, *et al.* 2004

N = números de organismos analizados, Ne = número efectivo de alelos, D = desviación entre los heterogocitos observados y esperados
X^2 = valor de chi-cuadrado, p = intervalo de confianza.

alelos nulos sólo aparecerían como heterocigotos. HOARE & BEAUMONT (1995) encontraron alelos nulos homocigotos de Odh en adultos de *Mytilus edulis*, lo que reta la asunción general que los alelos en loci no duplicados son invariablemente letales en estado homocigoto. Los individuos homocigotos para los alelos nulos de Odh probablemente pueden sobrevivir debido a que la ruta de Odh puede ser reemplazada por la ruta de lactato deshidrogenasa o por el ciclo α-glicerol fosfato (GÄDE 1980b), lo que nos indicaría que la presencia de Odh en *M. edulis* no es tan importante, como sí lo sería para *E. ziczac* durante el movimiento de propulsión para escapar de sus depredadores.

Tercero, por selección contra los heterocigotos. BEAUMONT *et al.* (1988) señalan a la selección como la causa de la deficiencia de heterocigotos en el locus Odh del mejillón *Mytilus edulis*. La selección contra los heterocigotos eventualmente lleva a la pérdida de variabilidad. Varios estudios (KOEHN & SHUMWAY 1982; KOEHN & GAFFNEY 1984; FOLTZ & ZOUROS 1984 y PÉREZ *et al.* 2000) han demostrado una ventaja de los heterocigotos en períodos de post-larva y adulto en poblaciones de ostras, mejillones, almejas y vieiras. Esta ventaja aparentemente puede balancear la pérdida de variabilidad por un incremento en la mortalidad de las larvas heterocigotas. La deficiencia de heterocigotos, al menos en las poblaciones de *E. ziczac*, no parece deberse a selección en contra de los heterocigotos, pues, se ha demostrado que éstos estarían en ventaja selectiva (PÉREZ *et al.* 2000).

Cuarto, *E. ziczac* presenta un hermafroditismo funcional, expulsando de manera alternante sus gametos masculinos y femeninos (VÉLEZ *et al.* 1990). Luego de la liberación de los gametos masculinos, los ovocitos en su salida se rodean de los espermios que han quedado en el conducto espermático, y así se posibilita la autofecundación, lo cual aumenta la consanguinidad (ALFONSI & PÉREZ 1998). Por otra parte, esta especie en los últimos años ha sido sometida a una sobreexplotación pesquera, lo cual ha reducido considerablemente el tamaño poblacional. Por consiguiente, la consanguinidad podría ser el principal factor que influye en la deficiencia de heterocigotos en este pectínido.

En la TABLA 1 se aprecia la pérdida de equilibrio Hardy-Weinberg en la población de *E. ziczac* en la localidad de Chacopatica desde el año 2002. Las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg parecen ser una característica común de la estructura genética de los bivalvos, pues, ocurre también en Veneridae, Mytilidae y Ostreidae (BEAUMONT *et al.* 1980; ZOUROS & FOLTZ 1984; BORSA *et al.* 1991 y PASSAMONTI *et al.* 1999).

En *E. ziczac*, la deriva genética, actuando sobre una población cuyo tamaño ha disminuido por la sobreexplotación pesquera, y el aumento de la consanguinidad posiblemente sean las causas de esta pérdida de equilibrio.

En biología de poblaciones hay la tendencia a analizar la adaptación y la selección en función de uno o muy pocos loci. Aun cuando el analizar las variaciones temporales en las frecuencias de los distintos alelos del locus Odh en función de selección natural es una aproximación reduccionista y sabemos que un organismo es mucho más que la suma de sus genes, consideramos necesario este análisis, ya que, en estudios previos hemos encontrado diferencias bioquímicas (ALFONSI *et al.* 1995, PÉREZ *et al.* 2000) de los diferentes genotipos.

CONCLUSIONES

Odh en *E. ziczac* está determinada por una sola zona de actividad enzimática, polimórfica. El polimorfismo en *E. ziczac* se caracteriza por la presencia de 5 alelos, que presentaron ligeras fluctuaciones en las frecuencias alélicas entre los años 1991-2004, posiblemente debido a la acción de la deriva genética. La deficiencia de heterocigotos, presente en la población estudiada, incrementada notablemente en los últimos años y la pérdida del equilibrio de Hardy-Weinberg podrían explicarse principalmente por la consanguinidad, provocada por la disminución del tamaño poblacional debido a la sobreexplotación pesquera.

AGRADECIMIENTO

Deseamos expresar nuestro sincero agradecimiento al Sr. MIGUEL GÓMEZ, quien de una manera tenaz y con un ánimo inquebrantable, se encargó de la recolección de las muestras durante todos los años que duró esta investigación.

REFERENCIAS

ALFONSI, C., O. NUSETTI & J. E. PÉREZ. 1995. Heterozygosity and metabolic efficiency in the scallop *Euvola ziczac* (Linneaus, 1758). *J. Shellfish Res.* 14 (2): 389-393.

_____. & J. E. PÉREZ. 1998. Growth and survival in the scallop *Nodipecten nodosus* as related a self-fertilization and shell colour. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente* 37 (1&2): 69-73.

BEAUMONT, A. R., T. R. DAY & G. GÄDE. 1980. Genetic variation at the octopine dehydrogenase locus in the adductor muscle of *Cerastoderma edulis* (L.) and six other bivalves species. *Mar. Biol. Letts.*, 1 : 137-148.

BEAUMONT, A. R., C. M. BEVERIDGE, E. A. BARNET, M. D. BUDD & M. SMYTH-CHAMOSA. 1988. Genetic studies of laboratory reared *Mytilus edulis*. I. Genotype specific selection in relation to salinity. *Heredity* 61: 389-400.

BORSA, P., M. ZAINURI & B. DELAY. 1991. Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussates*. *Heredity*, 66: 1-8.

CORONADO, M., P. GONZÁLEZ & J. E. PÉREZ. 1991. Genetic variation in Venezuelan molluscs. *Pecten ziczac* and *Lyropecten nodosa* (Pectinidae). *Caribean Journal of Science* 27 (1, 2): 71-74.

FERNÁNDEZ, R. 1995. *Variación enzimática y del ADN mitocondrial de las vieiras Euvola ziczac, Nodipecten nodosus y Amusium papyraceum* (Gabb, 1873). Trab. Grad. M. Sc. Ciencias Marinas. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 56 pp.

FOLTZ, D.W. & E. ZOUROS. 1984. Enzyme heterozygosity in the scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin) in relation to age and size. *Mar. Biol. Lett.* 4: 253-263.

GÄDE, G. 1980a. A comparative study of octopine dehydrogenase isoenzymes in gastropod, bivalve and cephalopod molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 67B: 575-582.

_____. 1980b. Biological role of octopina formation in marine mollusks. *Mar. Biol. Lett.* 1: 121-135.

GAFFNEY, P. M., T. M. SCOTT, R. K. KOEHN & W. J. DIEHL. 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the cook, *Mullina lateralis*. *Genetics* 124: 687-699.

HOARE, K. & A. R. BEAUMONT. 1995. Effects of an Odh null allele and a GPI low-activity allozyme on shell length in laboratory-reared *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 123: 775-780.

HUBBY, J. L. & R. C. LEWONTIN. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 577-594.

KIMURA, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* (London) 217: 624-626.

_____ . 1989. The neutral theory of molecular evolution and the world view of the neutralists. *Genome* 31: 24-31.

KOEHN, R. K. & P.M. GAFFNEY. 1984. Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 82: 1-7.

_____ . & S. E. SHUMWAY. 1982. A genetic/physiological explanation for diferential growth rate among individuals of the american oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Mar. Biol. Letts.* 3: 35-42.

LEWONTIN, R. C. & J. L. HUBBY. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595-609.

LIVINGSTONE, D. R. 1983. Invertebrate and vertebrate pathways of anaerobic metabolism: evolutionary considerations. *J. Geol. Soc. London* 140: 27-37.

MORENO, J. M^{a}. 2002. *Variación genética de lactato deshidrogenasa y opinas deshidrogenasas en algunos moluscos del nororiente venezolano*. Trab. Grad. Lic. Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 42 pp.

_____., C. ALFONSI, J. E. PÉREZ & B. J. GÓMEZ 2004. Variaciones en las frecuencias alélicas del locus Odh en *Euvola ziczac*. 54ta Conv. Anual AsoVAC, Valencia,2004.

MORIZOT, D.C. & M. E. SCHMIDT. 1990. *Starch gel electroforesis and histochemical visualization of proteins. En: Electrophoretic and Isolectric Focusing Techniques in Fisheries. Management*. Ed. D. Whitmore. CRC Press, Boston, 2 : 23-80.

PASSAMONTI, M., B. MANTOVANI & V. SCALI. 1999. Allozymic analysis of some Mediterranean Veneridae (Mollusca : Bivalvia) : preliminary notes on taxonomy and systematics of the family. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 79: 899-906.

PÉREZ, J. E., O. NUSETTI, N. RAMÍREZ & C. ALFONSI. 2000. Allozyme and biochemical variation at the octopine dehydrogenase locus in the scallop *Euvola ziczac*. *J. Shellfish Res.* 19 (1): 197-205.

PERKINS, D. & E. PAUL. 1995. Genes in populations. Version 2. A computer program for analysis of genetic data. http://animalscience.ucdavis.edu/entension/Gene.htm.

RAMÍREZ, N. 1999. *Variación alozímica y cinética de octopina deshidrogenasa en la vieira Euvola ziczac*. Trab. Grad. Lic. Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 35 pp.

VÉLEZ, A., E. ALIFA & O. AZUAJE. 1990. Induction of spawing by temperature and serotonin in the hermaphroditic tropical scallop, *Pecten ziczac*. *Aquaculture* 84 : 307-313.

VOLCKAERT, E. & E. ZOUROS. 1989. Allozyme and physiological variation in the scallop *Placopecten magellanicus*, and a general model for the effects of heterozygosity on fitness in marine molluscs. *Mar. Biol.* 103: 51-61.

RECIBIDO: 25 de octubre 2004
ACEPTADO: 16 de marzo 2005