

## Efecto de la temperatura de aclimatación sobre el crecimiento instantáneo de *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae), según el cociente ARN/ADN

Iris del V. Viñoles<sup>1</sup>, M.I. Segnini de Bravo<sup>2</sup>, María Angélica Bracho<sup>1</sup> & K.S. Chung<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Escuela Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, -Venezuela

<sup>2</sup>Departamento de Biología Marina, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente. Telefax: (58-93) 512017, 512276; fbravo@raudo.udo.edu.ve

Recibido 29-VI-2000. Corregido 3-VII-2000. Aceptado 6-VIII-2000.

**Abstract:** Temperature affects growth rate in aquatic organisms. This can be evaluated in short term using biochemical indexes (RNA/DNA and Protein/DNA). The effect of acclimatization temperature on the instantaneous growth and physiological condition of *Perna viridis* was studied in organisms collected in La Esmeralda, Sucre State (Venezuela) and taken to the laboratory, where groups of 100 organisms (size 3.0 - 3.5 cm, anteroposterior measurement) were acclimatized at 15, 20, 26 or 28°C during four weeks. Later they were kept in a 60 liters aquarium for another six weeks under the same conditions. Each week, ten organisms per group were extracted to measure concentrations of RNA, DNA (by a fluorometric method with ethidium bromide) and proteins (by a colorimetric method), in tissues (digestive gland, adductor muscle and gills). Protein concentration was greater and highly significant at 15°C for all studied tissues. The opposite was obtained with the RNA/DNA and Protein/DNA ratios: the greatest increase was observed at the highest temperature (28°C) for all tissues. At the lowest temperature there was a tendency to reduce both indexes with time. Greater instantaneous growth can be expected at higher temperatures and 28°C was optimal for growth in these specimens.

**Kew words:** DNA, RNA, temperature, physiological condition, *Perna viridis*.

El mejillón verde *Perna viridis* llegó a las costas americanas desde el océano Índico. Según Agard *et al.* (1992), la colonización de esta especie fue detectada por primera vez en el Puerto de Point Lisas (Trinidad) en 1990, y en Venezuela fue observada para el año 1993 a lo largo de toda la costa del Golfo de Paría, ocupando zonas donde existen variaciones de temperatura, debido a la surgencia (Rylander *et al.* 1996)

La temperatura es uno de los parámetros ambientales que más influye en la actividad metabólica de los organismos acuáticos (Segnini de Bravo & Chung 1997). El metabolismo energético de los bivalvos incluye varia-

ciones en el almacenamiento y utilización de proteínas, lípidos y carbohidratos como principales sustratos para el mantenimiento de las funciones básicas. El índice ARN/ADN es utilizado como indicador de crecimiento instantáneo del organismo ya que mide la tasa de tejido elaborado. Por esta razón la relación ARN/ADN es un indicativo de la cantidad de ARN por célula, y es considerada como un índice de actividad metabólica más exacto que la sola concentración de ARN ya que no es afectada por el número de células (Nusetti & Morales 1988).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto que ejerce la temperatura de acli-

matación sobre la condición fisiológica y el crecimiento instantáneo de *Perna viridis*, en tejidos como glándula digestiva, músculo aductor y branquias utilizando las relaciones ARN/ADN y Proteína/ADN.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Captura de los organismos:** los ejemplares de *Perna viridis* fueron recolectados en la Esmeralda, Costa Norte del Estado Sucre, Venezuela (10°40'35"N, 63°30'50" W) por buceo libre a temperatura de 25°C. Los organismos se colocaron en recipientes térmicos con agua de mar de la localidad, a fin de evitar cambios bruscos de temperatura y se trasladaron al laboratorio, donde permanecieron en estas condiciones por 48 horas para su adaptación.

**Período de aclimatación de los organismos:** para la aclimatación térmica se utilizaron acuarios de 60 l en número de 2 organismos/l. Cada uno de ellos constaba de un termoregulador, un calentador y un termómetro de contacto, los cuales regularon la temperatura del agua ( $\pm 0.1$  °C). Grupos de 100 mejillones de talla comprendida entre 3.0-3.5 cm de longitud antero-posterior fueron aclimatados a las temperaturas de 15, 20, 26 y 28 °C respectivamente, aumentando o disminuyendo 2°C por día hasta obtener la temperatura de aclimatación deseada, donde fueron mantenidos por cuatro semanas (tiempo estimado para que el organismo alcanzara su completa aclimatación) (Segnini de Bravo *et al.* 1998).

Los organismos fueron alimentados con una mezcla de monocultivos microalgales (30 000 cel/ml) de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis aff.* (T-Iso) y *Tetraselmis chuii*. Durante el tiempo de exposición de los mejillones hubo control de los parámetros fisicoquímicos: pH (7-8), salinidad (35‰), cantidad de oxígeno disuelto (90% de saturación) y luminosidad (12/12).

**Obtención de los tejidos:** transcurrido el tiempo de aclimatación térmica, los organismos fueron cultivados en las mismas condi-

ciones anteriores por otras seis semanas. Durante este período, semanalmente, se tomaron 10 ejemplares, de cada una de las temperaturas, a los cuales se les disectó la glándula digestiva, el músculo aductor y las branquias e inmediatamente estos tejidos fueron congelados con gas carbónico y almacenados a -17 °C hasta el momento de ser analizados.

**Determinación de los ácidos nucleicos:** los ácidos nucleicos (ARN, ADN) se determinaron por el método fluorométrico con bromuro de etidio y heparina (Karsten & Wolleberger 1972, 1977). Para ello, se tomaron entre 10 y 20 mg de cada tejido y se homogeneizaron en 3 ml de un buffer fosfato salino (PBS), pH: 7.5 con un homogeneizador de alta velocidad durante 30 s en tres tiempos de 10 s cada uno. Esto se realizó en tubos de ensayos sumergidos en un baño frío (4°C). Inmediatamente, se centrifugó a 10 000g por 2 min y el sobrenadante obtenido fue usado para determinar las concentraciones de las biomoléculas en estudio (ARN, ADN y proteínas).

Para la determinación de la fluorescencia de ADN se tomaron 300  $\mu$ l del sobrenadante y se mezclaron con 300  $\mu$ l de PBS, 300  $\mu$ l de heparina y 300  $\mu$ l de ARNasa. Igual procedimiento se utilizó para determinar la fluorescencia de ADN+ARN pero sin agregar la ARNasa. Los tubos con las muestras fueron incubados a 37°C por 30 min en un baño de agua termoregurable, seguidamente se dejaron a temperatura ambiente por 2 min. A cada muestra, excepto el blanco, se le añadió bromuro de etidio y se agitó. Posteriormente se dejó reposar por 3 o 4 min. La lectura de la fluorescencia de las muestras se llevó a cabo usando un fluorómetro digital con longitudes de onda de excitación y emisión de 585 y 360 nm, respectivamente. La fluorescencia del ARN se determinó por diferencia entre la obtenida para ARN+ADN y ADN. Cada muestra fue analizada por triplicado. La cuantificación se estimó por extrapolación en una curva estándar de un ADN y/o un ARN comercial. La concentración de los ácidos nucleicos fue expresada en  $\mu$ g/mg de tejido húmedo.

CUADRO 1

Concentración de ácidos y proteínas en varios tejidos.

TABLE 1

Acid and protein concentration in several tissues.

Tejido	ADN	ARN	Proteínas	ARN/ADN	Proteína/ADN
Glándula	2.40 ± 0.25	3.24 ± 0.40,	608.71 ± 71.85	1.35 ± 0.11	253.63 ± 28.45
Músculo	1.50 ± 0.13	2.05 ± 0.35	383.90 ± 10.15	1.37 ± 0.15	255.93 ± 20.16
Branquias	2.12 ± 0.25	3.08 ± 0.41	403.73 ± 40.30	1.45 ± 0.25	190.44 ± 18.82

Valores promedio obtenidos de las concentraciones de ADN ± SD (µg/mg), ARN ± SD (µg/mg), Proteínas (µg/mg), relaciones ARN/ADN ± SD y Proteína/ADN ± SD en los tejidos glandular (G), muscular (M) y branquial (B) de *Perna viridis* a la temperatura de recolección (25 °C). n = 10; SD = Desviación estándar.

Mean values obtained from DNA ± SD (µg/mg), RNA ± SD (µg/mg) and Proteins (µg/mg) concentrations and RNA/DNA ± SD and Protein/DNA ± SD ratios in the digestive gland (G), muscle (M) and gills (B) of *Perna viridis* at collection temperature (25 °C). n = 10; SD = Standard deviation.

**Determinación de proteínas:** las proteínas se determinaron por el método de Bradford (1976). 50 µl del sobrenadante del homogeneizado de cada uno de los tejidos se colocó en 2 950 µl del reactivo "Comassie Blue", se agitó y luego se dejó reposar por 10 min (se hicieron cinco replicas por cada muestra). Posteriormente, la lectura de la absorbancia de las muestras fue realizada en un Spectronic-20D a una longitud de onda de 590 nm. La cuantificación de las proteínas se obtuvo por la interpolación en una curva estándar usando suero de albúminas de bovino como patrón. La concentración de proteínas se expresó en µg/mg de peso húmedo.

**Análisis estadístico:** los resultados obtenidos fueron sometidos a un tratamiento estadístico con un nivel de confiabilidad del 95% empleando un análisis de varianza y una prueba *a posteriori* por el método de las comparaciones simultáneas de Duncan con el objeto de establecer diferencias de crecimiento en las diferentes temperaturas, los tejidos y el tiempo de exposición.

## RESULTADOS

A la temperatura de recolección (25°C), los tejidos: glandular, muscular y branquial

del mejillón verde *Perna viridis*, presentaron diferentes concentraciones de ácidos nucleicos, proteínas, relación ARN/ADN y Proteína/ADN (Cuadro 1). Estos valores encontrados, al transcurrir el tiempo, se vieron afectados en los organismos expuestos a diferentes temperaturas de aclimatación.

**Efecto de la temperatura de aclimatación sobre las concentraciones de los ácidos nucleicos (ADN, ARN), proteínas e índices ARN/ADN y Proteína/ADN en la glándula digestiva de *Perna viridis*:** los valores promedio obtenidos para ADN (Cuadro 2) variaron entre 1.97 ± 0.18 y 0.90 ± 0.06 µg/mg a 28 °C y para 26 °C se encontraron entre 2.39 ± 0.23 y 1.68 ± 0.13 µg/mg. A 20 y 15°C estas concentraciones oscilaron entre 3.80 ± 0.52 y 5.81 ± 0.60 µg/mg; y 4.25 ± 0.15 y 5.97 ± 0.34 µg/mg respectivamente.

La concentración de ARN se presentó con variaciones en cada una de las temperaturas (Cuadro 2). A 28 °C, los valores fueron más bajos (3.24 ± 0.39 y 1.91 ± 0.37 µg/mg) en comparación con las demás temperaturas. Los niveles mas altos se determinaron a 15°C, siendo 7.43 ± 0.43 µg/mg su mayor valor.

Al igual que en los ácidos nucleicos, las concentraciones de proteínas alcanzaron los mayores promedios a las temperaturas bajas y se incrementaron a través del tiempo. Para 15 °C,

CUADRO 2

*Medias de ácidos y proteínas en glándula digestiva.*

TABLE 2

*Means for acids and proteins in digestive gland.*

Semana	ADN	ARN	Proteínas	ARN/ADN	Proteína/ADN
Temperatura: 28°C					
1	1.97 ± 0.18	3.24 ± 0.39	450.65 ± 28.58	1.64 ± 0.29	228.76 ± 21.12
2	1.81 ± 0.18	3.15 ± 0.40	481.58 ± 26.73	1.74 ± 0.24	266.07 ± 18.15
3	1.19 ± 0.08	2.18 ± 0.17	433.58 ± 40.93	1.83 ± 0.19	364.35 ± 8.41
4	1.20 ± 0.10	2.25 ± 0.29	455.45 ± 8.41	1.88 ± 0.19	379.54 ± 7.40
5	1.02 ± 0.10	2.10 ± 0.24	448.52 ± 11.91	2.06 ± 0.17	439.73 ± 19.20
6	0.90 ± 0.06	1.91 ± 0.37	435.25 ± 19.76	2.12 ± 0.20	483.61 ± 14.11
Temperatura: 26°C					
1	2.39 ± 0.23	3.24 ± 0.33	611.71 ± 72.94	1.36 ± 0.13	255.95 ± 33.24
2	2.30 ± 0.27	3.41 ± 0.31	664.62 ± 33.84	1.48 ± 0.32	288.97 ± 40.21
3	2.12 ± 0.34	3.38 ± 0.51	627.63 ± 44.51	1.59 ± 0.30	296.05 ± 38.25
4	1.84 ± 0.26	3.10 ± 0.45	614.03 ± 56.48	1.68 ± 0.21	333.71 ± 29.30
5	1.89 ± 0.32	3.25 ± 0.65	634.72 ± 43.85	1.72 ± 0.18	335.83 ± 31.30
6	1.68 ± 0.13	3.17 ± 0.37	591.36 ± 75.10	1.89 ± 0.09	352.00 ± 29.78
Temperatura: 20°C					
1	3.80 ± 0.52	5.36 ± 0.92	695.22 ± 49.03	1.41 ± 0.52	182.95 ± 25.51
2	4.93 ± 0.53	5.96 ± 0.88	755.72 ± 26.85	1.21 ± 0.20	153.29 ± 28.79
3	5.70 ± 0.47	5.80 ± 0.39	801.58 ± 25.65	1.02 ± 0.38	140.63 ± 25.65
4	5.93 ± 0.37	5.93 ± 0.51	831.98 ± 25.64	1.00 ± 0.19	140.30 ± 26.60
5	5.90 ± 0.38	5.88 ± 0.62	830.38 ± 53.16	1.00 ± 0.32	140.74 ± 20.51
6	5.81 ± 0.60	5.62 ± 0.72	831.98 ± 35.11	0.97 ± 0.28	143.21 ± 19.85
Temperatura: 15°C					
1	4.25 ± 0.15	5.40 ± 0.43	674.92 ± 40.57	1.27 ± 0.25	158.80 ± 40.35
2	4.45 ± 0.22	4.85 ± 0.32	901.32 ± 71.95	1.09 ± 0.14	202.54 ± 38.40
3	5.54 ± 0.36	5.70 ± 0.52	1100.78 ± 24.91	1.03 ± 0.38	198.70 ± 34.31
4	5.83 ± 0.35	6.86 ± 0.90	1140.78 ± 38.82	1.18 ± 0.34	195.67 ± 38.82
5	5.89 ± 0.30	6.42 ± 0.63	1143.98 ± 34.31	1.09 ± 0.25	194.22 ± 40.41
6	5.97 ± 0.34	7.43 ± 0.43	1143.98 ± 70.80	1.24 ± 0.18	191.62 ± 37.65

Valores promedio obtenidos de las concentraciones de ADN ± SD (µg/mg), ARN ± SD (µg/mg) y Proteínas ± SD (µg/mg), índices: ARN/ADN ± SD y Proteína/ADN ± SD en la glándula digestiva de *Perna viridis*, aclimatados a las temperaturas de 15, 20, 26 y 28°C. n = 10 organismos/semana/temperatura; SD = Desviación estándar.

Mean values obtained from DNA ± SD (µg/mg), RNA ± SD (µg/mg) and Proteins (µg/mg) concentrations and RNA/DNA ± SD and Protein/DNA ± SD ratios in the digestive gland of *Perna viridis*, acclimatized at temperatures of 15, 20, 26 and 28°C. n = 10 organisms/week/temperature; SD = Standard deviation.

la menor temperatura estudiada, el contenido proteico al inicio del experimento fue de 674.92 ± 40.57 µg/mg y 1 143.98 ± 70.80 µg/mg al final de este.

El índice ARN/ADN (Cuadro 2) se incrementó con el transcurso del tiempo tanto a 28 como a 26°C en comparación con aquellos organismos aclimatados a 15 y 20 °C, respectivamente. A 15 °C se encontró un aumento

de esta relación en la cuarta (1.18 ± 0.34) y sexta semana (1.24 ± 0.18) alcanzando casi su valor inicial (1.27 ± 0.12).

La relación Proteína/ADN (Cuadro 2) aumentó continuamente durante el período experimental, a 28 y 26 °C, al igual que el índice ARN/ADN. A 20 y 15 °C ésta relación decreció en casi un 40%, al final del experimento con respecto a las temperaturas anteri-

CUADRO 3

Ácidos y proteínas en músculo abductor.

TABLE 3

Acids and proteins in abductor muscle.

Semana	ADN	ARN	Proteínas	ARN/ADN	Proteína/ADN
Temperatura: 28°C					
1	0.99 ± 0.11	1.39 ± 0.16	370.65 ± 7.65	1.40 ± 0.21	374.39 ± 8.35
2	0.96 ± 0.14	1.53 ± 0.13	398.38 ± 15.30	1.59 ± 0.19	414.98 ± 12.14
3	0.83 ± 0.14	1.48 ± 0.07	438.38 ± 10.90	1.78 ± 0.14	528.17 ± 10.90
4	0.83 ± 0.14	1.52 ± 0.11	458.12 ± 20.03	1.83 ± 0.30	551.95 ± 14.15
5	0.70 ± 0.08	1.81 ± 0.33	443.18 ± 13.87	2.59 ± 0.12	633.11 ± 12.16
6	0.65 ± 0.09	2.11 ± 0.18	454.38 ± 17.74	3.25 ± 0.14	699.05 ± 10.80
Temperatura: 26°C					
1	1.43 ± 0.09	2.00 ± 0.29	385.90 ± 9.55	1.40 ± 0.15	269.86 ± 9.80
2	1.92 ± 0.43	2.73 ± 0.45	599.77 ± 43.80	1.42 ± 0.25	312.38 ± 25.60
3	1.91 ± 0.23	2.83 ± 0.48	638.17 ± 33.70	1.48 ± 0.20	334.12 ± 27.30
4	1.79 ± 0.27	3.40 ± 0.24	635.71 ± 13.50	1.90 ± 0.28	355.15 ± 21.20
5	1.34 ± 0.13	2.83 ± 0.26	599.37 ± 77.50	2.11 ± 0.31	447.29 ± 18.91
6	0.93 ± 0.07	2.51 ± 0.27	567.98 ± 24.10	2.70 ± 0.29	610.73 ± 23.72
Temperatura: 20°C					
1	0.91 ± 0.19	1.82 ± 0.17	468.14 ± 81.51	2.00 ± 0.13	514.44 ± 16.13
2	1.35 ± 0.15	2.42 ± 0.24	475.97 ± 36.02	1.79 ± 0.15	352.57 ± 10.20
3	1.48 ± 0.21	2.90 ± 0.28	483.29 ± 16.80	1.96 ± 0.25	326.55 ± 27.20
4	1.88 ± 0.13	3.32 ± 0.30	508.12 ± 10.04	1.77 ± 0.28	270.28 ± 30.31
5	2.07 ± 0.29	2.38 ± 0.38	539.88 ± 70.70	1.15 ± 0.10	260.81 ± 28.93
6	2.43 ± 0.31	3.84 ± 0.44	575.98 ± 27.08	1.58 ± 0.30	237.03 ± 17.79
Temperatura: 15°C					
1	1.46 ± 0.11	2.87 ± 0.29	510.86 ± 16.69	1.97 ± 0.11	349.90 ± 21.30
2	2.11 ± 0.18	2.93 ± 0.30	728.30 ± 50.77	1.39 ± 0.09	345.17 ± 23.21
3	2.23 ± 0.11	4.13 ± 0.34	727.98 ± 21.37	1.85 ± 0.18	326.45 ± 29.18
4	2.24 ± 0.10	3.96 ± 0.30	727.98 ± 23.08	1.77 ± 0.07	324.99 ± 33.47
5	2.45 ± 0.19	3.90 ± 0.38	766.38 ± 22.07	1.59 ± 0.20	312.81 ± 34.62
6	2.59 ± 0.16	3.91 ± 0.32	775.98 ± 16.15	1.51 ± 0.25	299.61 ± 42.13

Valores promedio obtenidos de las concentraciones de ADN ± SD (µg/mg), ARN ± SD (µg/mg), Proteínas ± SD (µg/mg), índices: ARN/ADN ± SD y Proteína/ADN ± SD en el músculo aductor de *Perna viridis*, aclimatados a las temperaturas de 15, 20, 26 y 28°C. n =10 organismos/semana/temperatura; SD = Desviación estándar.

Mean values obtained from DNA ± SD (µg/mg), RNA ± SD (µg/mg) and Proteins (µg/mg) concentrations and RNA/DNA ± SD and Protein/DNA ± SD ratios in the adductor muscle of *Perna viridis*, acclimatized at temperatures of 15, 20, 26 and 28°C. n =10 organisms/week/temperature; SD = Standard deviation.

ores y a partir de la segunda semana de experimentación, este índice permaneció casi constante.

**Efecto de la temperatura de aclimatación sobre los niveles de ADN, ARN, Proteínas e índices ARN/ADN y Proteína/ADN en el tejido muscular:** un resumen de los resultados del efecto de la temperatura sobre las concentraciones de ADN, ARN, proteínas e índices ARN/ADN y Proteína/ADN en el músculo de

*Perna viridis*, se muestra en el cuadro 3, do de se puede observar que a medida que la temperatura de aclimatación es menor, aumentan las concentraciones de las macromoléculas.

Las concentraciones de ADN a 28° y 26°C tendieron a disminuir, con los niveles más bajos a 28°C y valores entre 0.99 ± 0.11 y 0.65 ± 0.09 µg/mg para la primera y sexta semana de exposición respectivamente; sin

CUADRO 4

*Ácidos y proteínas en branquias.*

TABLE 4.

*Acids and proteins in gills.*

Semana	ADN	ARN	Proteínas	ARN/ADN	Proteína/ADN
Temperatura: 28°C					
1	1.96 ± 0.58	2.94 ± 0.39	386.65 ± 34.03	1.50 ± 0.12	197.27 ± 22.28
2	1.72 ± 0.16	2.90 ± 0.43	373.32 ± 18.98	1.68 ± 0.14	217.05 ± 15.76
3	1.63 ± 0.17	2.86 ± 0.28	363.72 ± 19.92	1.75 ± 0.19	223.14 ± 18.96
4	1.48 ± 0.17	2.67 ± 0.34	350.12 ± 17.96	1.80 ± 0.19	236.57 ± 25.20
5	1.33 ± 0.21	2.54 ± 0.20	337.05 ± 19.76	1.90 ± 0.25	253.42 ± 17.19
6	1.04 ± 0.22	2.18 ± 0.45	324.78 ± 10.80	2.10 ± 0.22	312.29 ± 16.25
Temperatura: 26°C					
1	2.12 ± 0.16	3.17 ± 0.44	407.98 ± 43.33	1.50 ± 0.19	192.44 ± 18.50
2	2.03 ± 0.32	3.30 ± 0.56	400.52 ± 46.32	1.63 ± 0.25	197.30 ± 19.18
3	1.83 ± 0.17	3.15 ± 0.68	392.52 ± 13.82	1.72 ± 0.36	214.49 ± 17.67
4	1.79 ± 0.18	3.13 ± 0.39	387.72 ± 13.08	1.75 ± 0.21	216.60 ± 25.45
5	1.61 ± 0.21	2.88 ± 0.35	377.05 ± 21.04	1.79 ± 0.17	234.19 ± 31.35
6	1.35 ± 0.19	2.76 ± 0.31	332.25 ± 17.43	2.04 ± 0.26	246.11 ± 33.60
Temperatura: 20°C					
1	1.83 ± 0.21	2.66 ± 0.29	431.45 ± 32.73	1.45 ± 0.35	235.77 ± 15.50
2	2.03 ± 0.12	2.91 ± 0.49	468.25 ± 17.38	1.43 ± 0.41	230.67 ± 17.10
3	2.29 ± 0.26	3.06 ± 0.29	494.92 ± 33.14	1.34 ± 0.25	216.12 ± 32.13
4	2.59 ± 0.23	3.28 ± 0.33	547.18 ± 33.37	1.27 ± 0.31	211.27 ± 12.28
5	2.63 ± 0.26	3.30 ± 0.21	549.32 ± 18.86	1.25 ± 0.46	208.87 ± 17.70
6	2.87 ± 0.26	3.79 ± 0.32	603.45 ± 40.35	1.32 ± 0.51	210.26 ± 25.40
Temperatura: 15°C					
1	2.15 ± 0.15	3.18 ± 0.57	556.25 ± 21.15	1.48 ± 0.41	258.72 ± 21.10
2	1.99 ± 0.23	2.80 ± 0.38	570.65 ± 34.91	1.41 ± 0.38	286.76 ± 25.40
3	2.17 ± 0.17	2.93 ± 0.38	596.78 ± 32.14	1.35 ± 0.37	275.01 ± 35.90
4	2.51 ± 0.33	3.13 ± 0.34	668.73 ± 69.00	1.25 ± 0.45	266.43 ± 38.60
5	2.94 ± 0.29	4.08 ± 0.57	743.40 ± 87.46	1.39 ± 0.51	252.85 ± 24.50
6	3.06 ± 0.48	4.12 ± 0.41	713.05 ± 36.29	1.35 ± 0.58	233.02 ± 33.40

Valores promedio obtenidos de las concentraciones de ADN ± SD (µg/mg), ARN ± SD (µg/mg) y Proteínas ± SD (µg/mg), índices: ARN/ADN ± SD y Proteína/ADN ± SD en las branquias de *Perna viridis*, aclimatados a las temperaturas de 15, 20, 26 y 28 °C. n=10 organismos/semana/temperatura; SD = Desviación estándar.

Mean values obtained from DNA ± SD (µg/mg), RNA ± SD (µg/mg) and Proteins (µg/mg) concentrations and RNA/DNA ± SD and Protein/DNA ± SD ratios in the gills of *Perna viridis*, acclimatized at temperatures of 15, 20, 26 and 28°C. n=10 organisms/week/temperature; SD = Standard deviation.

embargo, a 20 y 15 °C se determinó todo lo contrario, el ADN comenzó a incrementarse desde el comienzo del experimento, con los mayores valores a 15°C (1.46 ± 0.11 y 2.59 ± 0.16 µg/mg, respectivamente) (Cuadro 3).

En cuanto a las concentraciones de ARN

en el tejido muscular se encontraron variaciones altamente significativas, las cuales aumentaron y disminuyeron en relación con la temperatura y el tiempo de exposición, respectivamente. A 28°C, tuvo un incremento continuo a partir de la tercera semana de

CUADRO 5

Resumen estadístico

TABLE 5

Statistical summary

Fuente de	G.L.	F <sub>s</sub>	Nivel de Variación	Duncan significación
Temperatura	3	173.08	***	20 15 26 28
Tiempo (semana)	5	25.02	***	2 1 3 4 1 3 4 5 6
Tejido	2	132.72	***	G B M

G.L.: Grados de libertad; F<sub>s</sub>: Distribución F; \*\*\*, p < 0.001 = altamente significativo

Resumen estadístico del análisis de varianza y la prueba a posteriori para la relación ARN/ADN en la glándula digestiva (G), músculo aductor (M), y branquias (B) de *Perna viridis*, aclimatados a las temperaturas de 15, 20, 26 y 28°C. n = 720.

Statistical summary of variance analysis and a posteriori test for the RNA/DNA ratio in the digestive gland (G), adductor muscle (M) and gills (B) of *Perna viridis*, acclimatized at temperatures of 15, 20, 26 and 28°C. n = 720.

muestreo ( $1.48 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), alcanzando en la última semana un valor de  $2.11 \pm 0.18 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Por otra parte, a 26 y 20°C estos valores se incrementaron desde la primera semana, luego comenzaron a decrecer a partir de la cuarta semana, tiempo en el cual se obtuvo la mayor concentración ( $3.40 \pm 0.24 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) a 26°C; en cambio, a 20°C la mayor cantidad se determinó en la última semana, con un valor de  $3.84 \pm 0.44 \mu\text{g}/\text{mg}$  (Cuadro 3). A la temperatura de 15°C se alcanzaron los mayores niveles, para la primera y sexta semana, con Valores promedio de  $2.87 \pm 0.29$  y  $3.91 \pm 0.32 \mu\text{g}/\text{mg}$ , respectivamente.

Las proteínas mantuvieron casi el mismo comportamiento de los ácidos nucleicos. A 28°C, presentaron un rango de concentración entre  $370.65 \pm 7.65$  y  $454.38 \pm 17.74 \mu\text{g}/\text{mg}$  para la primera y sexta semana, respectivamente. A 26°C, estos valores estuvieron entre  $385.90 \pm 9.55$  y  $567.98 \pm 24.10 \mu\text{g}/\text{mg}$ , respectivamente, observándose una disminu-

CUADRO 6

Resumen estadístico prueba a posteriori.

TABLE 6

Statistical summary and a posteriori test.

Fuente de	G.L.	F <sub>s</sub>	Nivel de Variación	Duncan significación
Temperatura	3	311.31	***	20 15 26 28
Tiempo (semana)	5	34.19	***	1 2 2 3 4 5 6
Tejido	2	804.53	***	B G M

G.L.: Grados de libertad; F<sub>s</sub>: Distribución F; \*\*\*, p < 0.001 = altamente significativo

Resumen estadístico del análisis de varianza y la prueba a posteriori para la relación Proteína/ADN en la glándula digestiva (G), músculo aductor (M), y branquias (B) de *Perna viridis*, aclimatados a las temperaturas de 15, 20, 26 y 28°C. n = 720.

Statistical summary of variance analysis and a posteriori test for the Protein/DNA ratio in the digestive gland (G), adductor muscle (M) and gills (B) of *Perna viridis*, acclimatized at temperatures of 15, 20, 26 and 28°C. n = 720.

ción a partir de la tercera semana. Los niveles obtenidos a la temperatura de 20°C oscilaron entre  $468.14 \pm 81.51$  y  $575.98 \pm 27.08 \mu\text{g}/\text{mg}$  y para 15°C se encontraron entre  $510.86 \pm 16.69$  y  $775.98 \pm 16.15 \mu\text{g}/\text{mg}$ , respectivamente (Cuadro 3).

El índice ARN/ADN aumentó progresivamente desde el inicio del experimento a 28 y 26°C (Cuadro 3), lográndose los mayores valores en la última semana ( $3.25 \pm 0.14$  y  $2.70 \pm 0.29$  a 28 y 26°C, respectivamente). Resultados semejantes fueron determinados en la relación Proteína/ADN (Cuadro 3) para ambas temperaturas. A 20 y 15°C el índice ARN/ADN disminuyó al transcurrir el tiempo con respecto a la primera semana de experimentación, alcanzando un valor mínimo de  $1.15 \pm 0.10$  en la quinta semana a 20°C y un valor mínimo de  $1.39 \pm 0.09$  en la segunda semana a 15°C. Asimismo, la razón Proteína/ADN decreció a todo lo largo del

tiempo experimental a estas temperaturas.

**Efecto de la temperatura de aclimatación sobre los niveles de ADN, ARN, proteínas e índices ARN/ADN y Proteína/ADN en el tejido branquial del mejillón verde:** a medida que la temperatura de aclimatación disminuyó aumentaron las concentraciones de ARN, ADN y proteínas en el tejido branquial, de la misma manera que en los tejidos muscular y glandular (Cuadro 4). A 28° y 26°C estas concentraciones fueron menores y decrecieron en comparación con las temperaturas de 20° y 15°C, en las cuales los niveles de ADN, ARN y proteínas fueron mayores y se incrementaron a lo largo del tiempo. A 28° C los valores estuvieron en el rango de  $1.96 \pm 0.58$  y  $1.04 \pm 0.32$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  para el ADN;  $2.94 \pm 0.39$  y  $2.18 \pm 0.45$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  para el ARN y los de proteínas oscilaron entre  $386.65 \pm 34.03$  y  $324.78 \pm 10.80$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ . A 15 °C, los resultados mas elevados fueron de  $2.15 \pm 0.15$  y  $3.06 \pm 0.48$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  en el ADN;  $3.18 \pm 0.57$  y  $4.12 \pm 0.41$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  en el ARN y  $556.25 \pm 21.15$  y  $713.05 \pm 36.29$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  para las proteínas.

A 28 y 26 °C, las relaciones ARN/ADN y Proteína/ADN en el tejido branquial aumentaron a lo largo del tiempo de experimentación. El índice Proteína/ADN alcanzó valores de  $312.29 \pm 16.25$  a 28 °C y  $246.11 \pm 33.60$  a 26°C al final del experimento. A 20 y 15 °C la relación ARN/ADN disminuyó con pequeñas fluctuaciones y en la relación Proteína/ADN, a 20 °C, este índice decreció levemente hasta la cuarta semana y luego se mantuvo aproximadamente constante. A 15 °C esta relación presentó fluctuaciones de incremento hasta la cuarta semana, para posteriormente disminuir a  $233.02 \pm 33.40$  (Cuadro 4).

**Análisis de varianza múltiple y las pruebas *a posteriori* de Duncan sobre los índices ARN/ADN, proteína/ADN considerando como variantes la temperatura, el tiempo de muestreo (semanas) y los tejidos:** los resultados del análisis de varianza múltiple realizado en relación con los índices ARN/ADN y Proteína/ADN considerando como variantes las temperaturas, el tiempo de muestreo (semanas) y los tejidos se muestran en los cuadros 5 y 6, además de los resultados

de una prueba *a posteriori* de rango múltiple de Duncan. La relación ARN/ADN entre las temperaturas, al igual que el tiempo de muestreo y entre los tejidos arrojaron diferencias altamente significativas (Anova,  $P < 0.001$ ). Entre las temperaturas se encontraron tres grupos: a) 15 y 20 °C, b) 26 °C y c) 28 °C (Cuadro 5). Entre el tiempo (semana) se obtuvieron tres subconjuntos: a) primera, segunda, tercera y cuarta semana, b) primera, tercera, cuarta y quinta semana y c) sexta semana. Entre los tejidos se determinaron 3 subconjuntos independientes: a) tejido glandular, b) tejido branquial y c) tejido muscular, observándose que en este último tejido se encontró la mayor relación ARN/ADN.

En el cuadro 6 se muestra el resumen estadístico del índice Proteína/ADN en relación con la temperatura, el tiempo y los tejidos. En el mismo se puede notar que existen diferencias altamente significativas entre estos factores (Anova,  $P < 0.001$ ). En las temperaturas existen cuatro grupos independientes. Con relación al tiempo hay cuatro subconjuntos, obteniéndose la mayor relación Proteína/ADN en el grupo de la sexta semana. Entre los tejidos se muestra la formación de dos subconjuntos: uno constituido por el tejido branquial y glandular (B y G) y otro por el tejido muscular (M) donde la relación Proteína/ADN fue mayor.

## DISCUSION

El crecimiento por proliferación celular está asociado con la acumulación del ADN; por otra parte, el crecimiento por volumen está relacionado con la biosíntesis de proteínas. Los resultados obtenidos en esta investigación indicaron que el mejillón verde, *Perna viridis* expuesto a temperaturas bajas de aclimatación presentó un crecimiento por proliferación celular y no se observó crecimiento por volumen (Proteína/ADN), ni crecimiento instantáneo (ARN/ADN). En los organismos expuestos a temperaturas de aclimatación altas, el crecimiento por proliferación de células disminuyó, a pesar del aumento del crecimiento por volumen o



masa de tejido (Proteína /ADN). El aumento en la relación Proteína /ADN y ARN/ADN a temperaturas altas se debe posiblemente, a que los organismos incrementaron su actividad metabólica, produciendo y consumiendo una mayor cantidad de energía para los procesos metabólicos, principalmente para el crecimiento.

Lodeiros (1993), señaló que los períodos de altas temperaturas, conjuntamente con una menor disponibilidad fitoplanctónica provocan en juveniles de *Euvola ziczac* y *Argopecten nucleus* crecimiento continuo y una alta tasa de supervivencia, indicando que los mismos toleran esa condición, tal vez debido a que la energía producida es suficiente para cubrir las necesidades energéticas de los juveniles los cuales están exentos de la alta demanda energética para sustentar la reproducción.

Una disminución consecuente de la relación Proteína/ADN y ARN/ADN indica el estrés provocado en los organismos expuestos a temperaturas bajas, los cuales reducen su actividad metabólica. Igual observación fue hecha por Wright & Hetzel (1985), quienes informaron que la relación ARN/ADN en la ostra americana *Crassostrea virginica* se hizo menor cuando la temperatura del agua alcanzó 14 °C, bien por debajo de la temperatura ambiental.

Los bivalvos a temperaturas bajas podrían utilizar estrategias de conducta fisiológica que producen un incremento en la eficiencia de la bioconversión de la energía ingerida para solventar los problemas de estrés. Estas respuestas adaptativas incluyen aumento en la capacidad de filtración y digestión asociado con un decrecimiento de la tasa metabólica y de crecimiento (Grant & Cranford 1989, Cranford & Grant 1990). La influencia de la temperatura posiblemente varía dependiendo de la especie y de la talla del organismo. Numerosas regiones tropicales están caracterizadas por cambios en la temperatura y abundancia fitoplanctónica. Muller-Karger *et al.* (1989), sugirieron que las especies tropicales pueden tener mecanismos adaptados para

sobrevivir en condiciones adversas del medio.

Los resultados muestran diferentes patrones, para el crecimiento por proliferación y para el crecimiento por volumen o masa de tejido. En el tejido muscular, glandular y branquial se observó una baja proliferación celular acompañada de una elevada tasa de biosíntesis de proteínas, indicando un crecimiento de los tejidos principalmente por aumento de volumen en las altas temperaturas. Estos tejidos presentaron una elevada proliferación celular a temperaturas bajas, seguidos por cambios asociados con el volumen celular. Aparentemente existen períodos críticos de proliferación celular determinados por la diferenciación funcional de cada tejido. En bivalvos, factores nutritivos y climáticos son determinantes en la manifestación específica del crecimiento y metabolismo energético de los tejidos a fin de garantizar el éxito de la reproducción de estos organismos en un determinado período del año (Gabbott 1983, Nusetti & Morales 1988).

Un aumento en las concentraciones de ADN refleja un tamaño celular mas pequeño, indicando un gran número de células por unidad de peso en el tejido (Bulow 1987). Asimismo, una disminución del contenido de ADN en los tejidos acompañado de un incremento continuo del índice ARN/ADN deviene en un aumento del volumen celular (Proteína/ADN) a las temperaturas altas. Estos resultados concuerdan con los de Nusetti & Morales (1988), quienes sugieren que un aumento del volumen celular, está acompañado por un incremento de la biosíntesis proteica. Los cambios de la tasa de síntesis de proteínas y las variaciones del contenido de ADN reflejan alteraciones en el crecimiento de los tejidos (Wilder & Stanley 1983). La alta concentración de ADN en los tres tejidos estudiados y la baja relación Proteína/ADN en los organismos aclimatados a temperaturas bajas (20 y 15°C) sugieren que esta especie tiene células más pequeñas en sus tejidos que en aquellos mantenidos a temperaturas altas (28 y 26°C). El aumento con-

stante de ADN y ARN se explica porque este es un crecimiento de ajuste (Ferguson & Danzmann 1990). Es importante señalar que a 28°C se encontró una menor concentración de ADN, ARN y proteínas; pero también los mayores índices ARN/ADN y Proteína/ADN. En la condición de mayor temperatura hay necesidad de mayor uso de proteínas debido a la gran actividad metabólica. Algunos investigadores como Houlihan *et al.* (1993) y Mathers *et al.* (1993), han sugerido que una gran cantidad de proteínas es utilizada para mantener el nivel metabólico y también para el crecimiento.

A pesar de encontrarse los mayores niveles de ARN, ADN y proteínas a temperaturas bajas; el crecimiento instantáneo y la condición fisiológica (ARN/ADN) en los organismos decrecieron. Estos resultados, posiblemente se deban al estado de estrés de estos bivalvos a estas condiciones ya que el gasto energético se ve reducido por la baja actividad metabólica y concuerdan con los reportados por Goolish *et al.* (1984) quienes sugieren que una mayor concentración de proteínas a temperaturas bajas indican que hay poca actividad metabólica. Los organismos disminuyen su metabolismo como una posible estrategia para sobrevivir a esa condición. Bulow (1987) sostiene que a temperaturas bajas se aumenta la concentración de proteínas, la actividad metabólica se hace más pequeña y que existen temperaturas de crecimiento y de mantenimiento. Por otro lado, Gómez (1991) señala que los niveles de lípidos y proteínas en glándula digestiva y el músculo del pectínido *Euvola ziczac* son menores a temperaturas altas.

De los tres tejidos estudiados en los organismos aclimatados a temperaturas altas, el muscular mantuvo las reservas proteicas bajas. Considerando que éste posee un metabolismo anaeróbico, la caída de los niveles de proteínas se asocia posiblemente al fenómeno de redistribución de energía a otros tejidos (Nusetti & Morales 1988).

La glándula digestiva y el músculo, a temperaturas bajas, disminuyen su actividad

metabólica y acumulan reservas que luego pueden transferir o ser utilizadas para ajustar su metabolismo, solventar problemas de estrés y en el crecimiento del mismo órgano. Este es el caso de las proteínas, donde los niveles se mantuvieron altos sugiriendo una fuente de producción de aminoácidos esenciales utilizados en el metabolismo y crecimiento de los organismos. Jordán (1990) sostiene que el tejido glandular moviliza sus fracciones de lípidos y proteínas para el mantenimiento de sus funciones básicas metabólicas y el crecimiento gonadal en el ambiente natural. También se ha encontrado la participación de la glándula como órgano de transferencia de reservas energéticas. Mayrand *et al.* (1994) señalaron al tejido muscular como el órgano encargado de la redistribución energética y de reserva. Asimismo la acumulación de energía en el tejido branquial indica que el organismo tiene la estrategia de asegurar sustratos para sostener el gasto energético de sus funciones tales como respiración y filtración. La glándula digestiva mostró la mayor concentración de ácidos nucleicos y proteínas a las diferentes temperaturas experimentales; pero el mayor crecimiento se obtuvo en el tejido muscular, relacionado posiblemente con las funciones que desempeñan cada uno de los tejidos. La glándula digestiva es la principal fuente de producción de enzimas digestivas y sirve como órgano almacenador de reservas energéticas incluyendo proteínas. Este órgano almacena y distribuye metabolitos a otros tejidos (Mayrand *et al.* 1994). El músculo disminuye sus reservas energéticas por estar involucrado en una prominente actividad metabólica en el cierre y apertura de las valvas y por estar asociado al fenómeno de redistribución energética. El tejido branquial presenta una doble función (respiración - filtración) y es un tejido en constante desgaste expuesto a posible estrés (Nusetti & Morales 1988).

En forma general, se podría decir que la temperatura como factor ambiental juega un papel importante en la conducta de *Perna viridis*, provocando la movilización de sus

reservas energéticas en períodos de crecimiento o de posible estrés metabólico. Por otra parte, el músculo por presentar un mayor índice ARN/ADN y una mejor condición fisiológica a las temperaturas altas parece ser el tejido más ideal para evaluar el crecimiento instantáneo de esta especie.

#### AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente y a Miguel Gómez por su ayuda para la recolecta de los organismos.

#### RESUMEN

La temperatura es un factor que afecta principalmente, la tasa de crecimiento en los organismos acuáticos. Este crecimiento puede ser evaluado a corto plazo, mediante los índices bioquímicos (ARN/ADN y Proteína/ADN). El objetivo de este estudio es determinar el efecto de la temperatura de aclimatación sobre el crecimiento instantáneo y la condición fisiológica de *Perna viridis*. Los organismos fueron recolectados en la localidad de La Esmeralda, Estado Sucre (Venezuela), y transportados al laboratorio donde grupos de 100 organismos (talla entre 3.0 y 3.5 cm, medidos anteroposteriormente) fueron aclimatados a diferentes condiciones de temperaturas (15, 20, 26 y 28°C), durante un período de cuatro semanas. Posteriormente, se mantuvieron en acuarios de 60 l por otras seis semanas en las mismas condiciones. Cada semana se tomaban 10 organismos (de cada grupo) para medir las concentraciones de ARN, ADN (método fluorométrico con bromuro de etidio) y las proteínas (método colorimétrico con azul de coomassie) en los tejidos (glándula digestiva, músculo aductor y branquias). Los resultados mostraron que la concentración de proteína fue mayor y altamente significativa a 15 °C con respecto a las demás temperaturas en todo los tejidos estudiados. Lo contrario ocurrió con las relaciones ARN/ADN y

Proteína/ADN en donde a la temperatura mas alta (28°C) se observó el mayor incremento de este índice para todo los tejidos. En la condición de temperatura mas baja se evidenció un comportamiento con tendencia a disminuir ambos índices al transcurrir el tiempo. Se puede concluir que a mayor temperatura existe un mayor crecimiento instantáneo. Una temperatura alta como la evaluada en este estudio (28°C) es la optima para el crecimiento de esta especie.

#### REFERENCIAS

- Agard, J. R., Kishore, R. & B. Baine. 1992. *Perna viridis* (Linnaeus, 1758). First records of the Indo-Pacific green mussel (Mollusca: Bivalvia) in the Caribbean. *Carib. Mar. Stud.* 3: 59-60.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing principles of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bulow, F.J. 1987. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: A review. *The Age Growth of fish* (R.C. Summerfelt & G.E. Hall, 1987). The Iowa State Chapman & Hall, London. pp. 45-71.
- Cranford, P.J. & J. Grant. 1990. Particle clearance and absorption of phytoplankton and detritus by the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 137: 105-121.
- Ferguson, M.M. & R.G. Danzmann. 1990. RNA-DNA ratios in white muscle as estimates of growth in rainbow trout held at different temperatures. *Can. J. Zool.* 68: 1494 - 1498.
- Gabbot, P.A. 1983. Development and seasonal activities in marine molluscs. En: *The Mollusca Environmental Biochemistry* (P. Hochacha, ed.) Academic Press, New York. (2): 167-217.
- Gómez, J.A. 1991. Inducción de la reproducción y cambios en la composición química de *Pecten ziczac* acondicionadas durante los períodos de reproducción activa y reposo sexual de la poblaciones naturales. Trabajo de Grado (Magister Scientiarum) en Ciencias Marinas, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 65pp.
- Goolish, E.M., M.G. Barron & I.R. Adelman. 1984. Thermo-acclimatory response of nucleic acid and protein content of carp muscle tissue: influence of growth rate and relationship of glycine uptake by scale. *Can. J. Zool.* 62: 2164 - 2170.
- Grant, J. & P.J. Cranford. 1989. The effect of laboratory and diet conditioning on tissue and gonad growth in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. En: *Reproduction, Genetics and Distribution of Marine Organisms*. Ed. Ryland, J. S., P.A. Tyler. Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark. p. 95-115.

- Houlihan, D.F., E.M. Mathers & A. Foster. 1993. Biochemical correlates of growth rates in fish. En: Fish Ecophysiology. (Rankin, J.C. & F.B. Jensen. eds), Chapman & Hall, London. p 45-47.
- Jordán, N. 1990. Relación de la temperatura, clorofila *a* y ácidos grasos fitoplanctónicos con la actividad gonadal anual de *Pecten ziczac* (L. 1758). Sustratos metabólicos para la reproducción. Trabajo de Grado. (Magister. Scientiarum) Biología Aplicada. Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 75 pp.
- Karsten, U. & A. Wollemberger. 1972. Determination of DNA and RNA in homogenized cells and tissues by surface fluorometry. *Anal. Biochem.* 46: 135-148.
- Karsten, U. & Wollemberger, A. 1977. Improvements in the ethidium bromide method for a direct fluorometric estimation of DNA and RNA in cell tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 77: 464-470.
- Lodeiros, C.J. 1993. Crecimiento de las vieiras del caribe *Euvela (Pecten) ziczac* (Linnaeus, 1758) y *Argopecten nucleus* (Born, 1780) bajo condiciones de cultivo suspendido. Trabajo de Ascenso para ascender a la categoría de Prof. Asistente. Dpto. Biol. Pesquera. Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, 34 pp.
- Mayrand, E., L. Pellein-Massicotte & B. Vincent. 1994. Small scale variability of biochemical indexes of growth in *Mya arenaria* (L.). *J. Shellfish Res.* 13 (1): 199-205.
- Mathers, E.M., D.F. Houlihan, I.D. McCarthy & L.J. Burren. 1993. Rates of growth and protein synthesis correlated with nucleic acid content in fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of age and temperature. *J. Fish Biol.* 43: 245-263.
- Muller-Karger, F.B., C.M. MacClain, T.R. Fisher, W.E. Esaias & R. Varela. 1989. Pigment distribution in the Caribbean Sea: Observations from space. *Progress in Oceanography.* 23: 23-64.
- Nusetti, O.A. & Morales, D. 1988. Crecimiento de algunos tejidos del mejillón *Perna perna* (L. 1758): Composición de ADN, relaciones ARN/ADN, y reservas energéticas. *Acta Cient. Vzla.* 39: 289-293.
- Rylander, J., J. Pérez, & J.A. Gómez, 1996. Status of green mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Mytilidae) in north-eastern Venezuela. *Carib. Mar. Stud.* 5: 86-87.
- Segnini de Bravo, M.I. & K.S. Chung, 1997. Influencia de los factores ambientales sobre el crecimiento instantáneo de peces tropicales evaluados por el seguimiento de la relación ARN/ADN. *Bol. Inst. Oceanogr. Vzla.* 36 (1 & 2): 21-29.
- Segnini de Bravo, M.I.; K.S. Chung & J.E. Pérez. 1998. Salinity and temperature tolerance of green mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae). *Rev. Biol. Trop.* 46(Supl. 5): 32-37.
- Wilder, J.B. & J.G. Stanley. 1983. RNA-DNA ratios as an index to growth in salmonid fishes in the laboratory and in stream contaminated with carbonyl. *J. Fish. Res.* 22 165-172.
- Wright, D. A. & E.W. Hetzel. 1985. Use of RNA/DNA ratios as an indicator of nutritional stress in the American Oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol.* 25: 199-206.