

Desarrollo embrionario de cigotos híbridos obtenidos por cruzamiento de machos de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) y hembras de Cachama Negra (*Colossoma macropomum*)

Mónica Botero², Adriana Fresneda¹, Andrés F. Montoya¹, Martha Olivera-Angel¹

¹ Grupo de Fisiología y Biotecnología de la Reproducción Universidad de Antioquia
A.A. 1226 Medellín (Colombia)
e-mail: molivera@catios.udea.edu.co

² Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia
A.A. 1226 Medellín (Colombia)

Resumen

Tres reproductores entre 2,5 y 3 años de edad de ambos sexos, fueron seleccionados mediante biopsia ovárica y por la presencia de semen a una leve presión abdominal. La maduración final y la espermiación fueron inducidas con EPC, según el grado de madurez sexual; la fertilización se realizó en seco y se incubaron en incubadoras de flujo ascendente. Una vez fertilizado el huevo, inicia su hidratación, el corion se comienza a separar del vitelo, a los 8 minutos se forma el blastodisco y aparece el espacio perivitelino; a los 10 minutos se observa la formación de 2 blastómeras; 30 minutos 4 blastómeras; 45 minutos 8 blastómeras; 60 minutos 16 blastómeras; una hora treinta minutos 32 blastómeras; 64 células (mórula temprana) a una hora y 35 minutos; mórula 1:45 horas; blástula dos horas cuarenta minutos; periodo de gástrula 5:45; formación del epiboly y del tubo ectodermal (diferenciación de cabeza y cola) 10:05 se da el engolfamiento del vitelo. A las 11 horas se inicia la segmentación seguida rápidamente por faringulación que corresponde al desarrollo de somitas (rudimentos de la columna vertebral), burbujas cerebrales, diferenciación de órganos básicos, vesícula óptica y los segmentos del mesodermo; a las 17:10 se diferencia claramente el saco vitelino, se distinguen los somitas. A las 19 horas sucede la eclosión de las larvas.

Palabras clave: embriología, hibridación, piscicultura

Introducción

La hibridación como técnica practicada en explotaciones acuícolas pretende mejorar el nivel de producción, de manera que el sistema sea más competitivo y el producto final presente mayor aceptación por parte del consumidor; además, como línea de investigación básica, la hibridación intraespecífica permite el acercamiento a las características de la selectividad entre gametos, el desarrollo y fisiología del híbrido y el cruzamiento intraespecífico que puede mejorar la resistencia a enfermedades (Dunham, 1997). El desarrollo embrionario es un fenómeno complejo que además de servir para estudiar diversos aspectos de la ontogenia, puede utilizarse como objeto de experimentación para evaluar la calidad del ambiente y del efecto de sustancias tóxicas sobre la fauna acuática. Igualmente, los embriones pueden ser utilizados en una gran variedad de estudios sobre morfogénesis, trasplante de blastómeras y producción de células tallo (Benitez *et al.*, 2002).

Martino (2002) reporta que en Venezuela se ha logrado la hibridación artificial de dos especies de Bagres *Leiarius marmoratus* x *Pseudoplatystoma fasciatum*. En el trabajo de Kossowski (2001) se habla de la compatibilidad y el desempeño en el crecimiento

de engorde de los cruces intergenéricos *Calophysus macropterus* x *Leiarius marmoratus*, *C. macropterus* x *Pimelodus blochii*, *C. macropterus* x *Pseudoplatystoma fasciatum*, y *P. fasciatum* x *P. blochii*.

La hibridación natural de Cachama es frecuente (Bermudez, 1984) y en estaciones piscícolas se han realizado ensayos de otras hibridaciones entre Cachama Negra *Colossoma macropomum* y Palometa *Mylossoma duriventri* (Kossowski, 2001), tratando de conseguir un producto que por su vigor híbrido tenga mejores características productivas. En Venezuela el 80% de la venta de alevinos se basa en híbridos de *Colossoma* x *Piaractus*, (Martino, 2001). En la literatura se encuentran reportes sobre la inducción hormonal en estas especies (Sawtell), sin embargo, muy poco sobre los eventos que se suceden después de la fertilización. Consideramos entonces necesario realizar este trabajo, con el objetivo de describir el desarrollo embrionario, los tiempos en que se suceden los diferentes eventos, especialmente en híbridos producidos a partir de hembras de Cachama Blanca y machos de Cachama Negra.

Material y métodos

La selección de los reproductores se hizo cuando alcanzaron la madurez sexual (2,5-3 años). Las hembras de Cachama Blanca no presentan dimorfismo sexual pero al encontrarse maduras se reconocen por su abdomen abultado, papila urogenital enrojecida y levemente protruida. La madurez de los machos de Cachama Negra se reconoce por la emisión de semen ante una leve presión de la región abdominal. Para confirmar el estado de madurez de la hembra seleccionada, se practicó una biopsia ovárica que consistió en introducir una cánula de 1,2 mm de diámetro a través del poro genital, más o menos 10-14 cm hasta llegar a una de las gónadas, y aspirar para capturar algunos ovocitos. Una vez extraídos los huevos se aclararon con líquido de Serra (6 partes de alcohol al 90%, 3 partes de formalina al 40% y 1 parte de ácido acético glacial), con el fin de permitir la observación de los núcleos.

Para inducir las hembras se clasificaron de acuerdo a uno de los siguientes estadios y solamente aquellas que estaban maduras fueron tratadas:

- a) hembra inmadura: cuando el 80% de los ovocitos son pequeños, irregulares y sin núcleo aparente.
- b) Hembra iniciando maduración: cuando el 50% de los núcleos están en posición central, los ovocitos son regulares, ooplasma diferenciable, en este estadio se considera que se está terminando la fase de vitelogénesis.
- c) hembra madura: Cuando entre un 50-60% de los núcleos están migrando hacia la periferia (Figura 1), los ovocitos van unidos en cadena.
- d) Hembra sobre-madura: presentan ovocitos en proceso de atresia, deformes.

En el momento de realizar el experimento se encontraron 3 hembras las cuales se trataron con extracto de hipófisis de carpa (EPC), con una dosis preparatoria de 0,5 mg/Kg de peso y una dosis definitiva de 5 mg/Kg.

Luego de la última dosis se tomó como referencia 260-280°C/hora para iniciar el desove.

A los machos maduros (espermiación posterior al estrujamiento abdominal), se les suministró una dosis única de 4 mg/Kg de EPC, al mismo tiempo con la aplicación de la dosis final a las hembras.

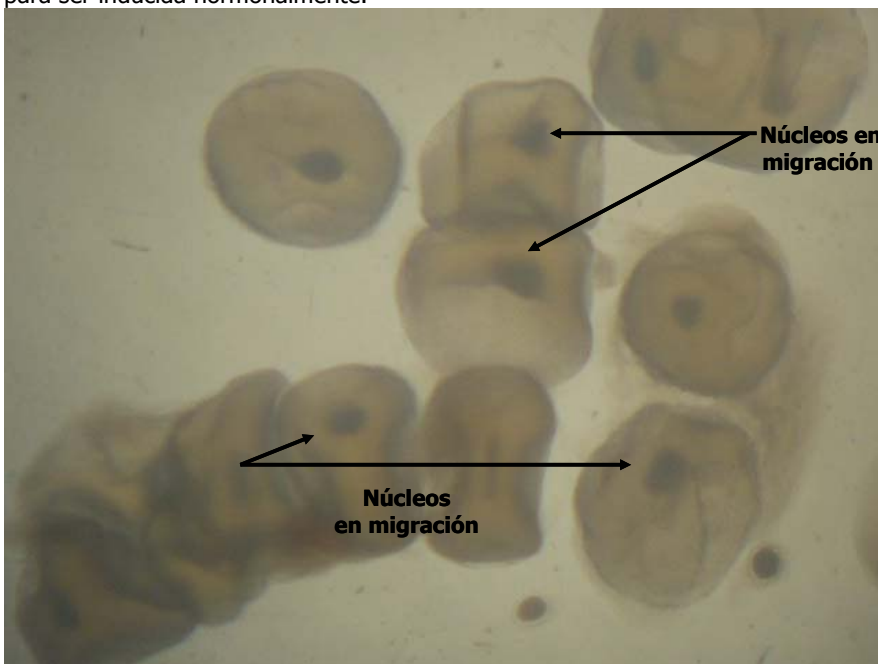
Figura 1. Incubadora artesanal, flujo ascendente.



La fertilización en seco consistió en extraer a la hembra los huevos antes que ocurriera el desove natural. Se sacó la reproductora del agua y con una ligera presión abdominal, los huevos se fueron depositando en una vasija, evitando el contacto con el agua. El semen recolectado por medio de masaje abdominal se mezcló con los huevos usando una pluma durante un par de minutos. A continuación se agregó agua para que el ovocito comenzara su proceso de hidratación y el esperma se activara.

Se realizó el cálculo de la cantidad en g de huevos y tras la fertilización se incubaron artesanalmente en un sistema de flujo ascendente (1,0 l) (Figura 2) con agua a 27°C. Las observaciones sobre el desarrollo embrional se realizaron tomando una muestra del 0,1% del total de huevos cada 10-15 minutos, en el estereoscopio Nikon 40x y se fotografiaron con cámara digital provista de zoom.

Figura 2. Huevos de Cachama con disposición en cadena. La hembra está apta para ser inducida hormonalmente.



Algunas muestras de oocitos, espermatozoides y embriones se observaron al microscopio electrónico de transmisión para lo cual fueron fijados en glutaraldehído al 2% en solución de fosfato buffer (0,12 M) por dos horas. Posteriormente se fijaron en tetraóxido de osmio al 1% en la misma solución buffer por una hora.

Resultados

En las Figuras 2 y 3 se muestran los huevos agregados y el micrópilo abierto, las características de los espermatozoides activados se muestran en la Figura 4 en donde se ven con cabezas aplanadas y forma oval.

Figura 3. Microfotografía electrónica que muestra la disposición en cadeneta de los huevos de Cachama y el micrópilo.

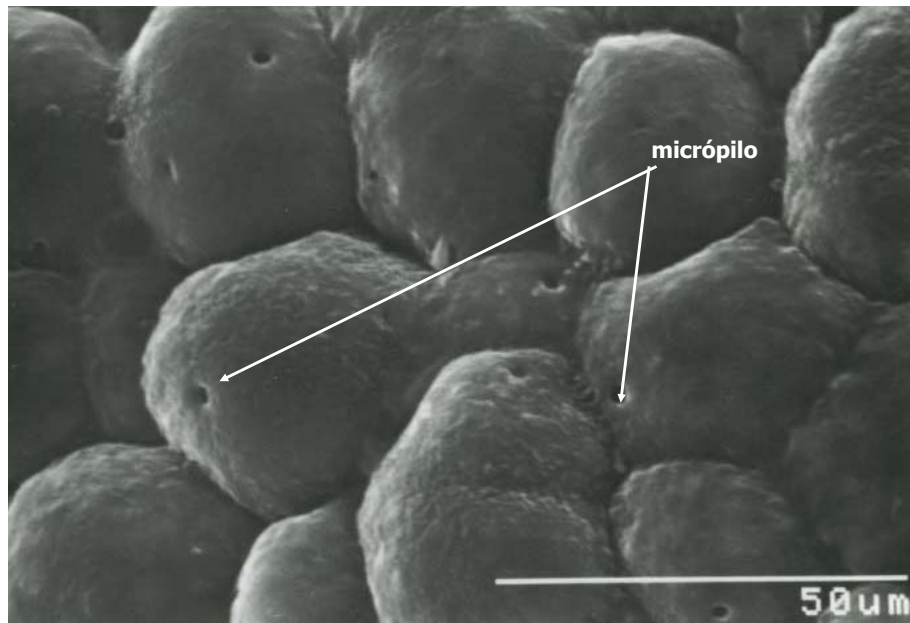
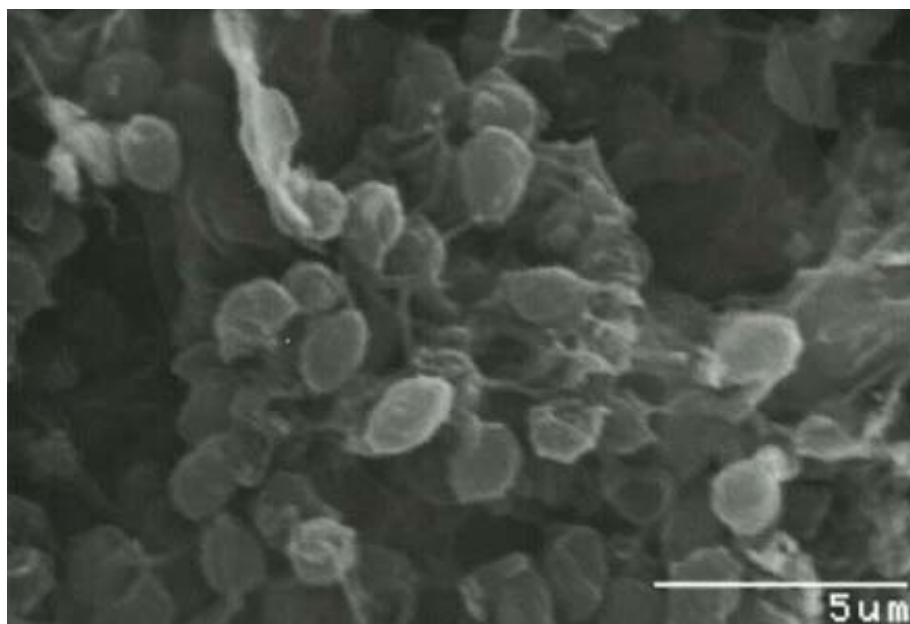


Figura 4. Microfotografía electrónica que muestra los espermatozoides de Cachama posterior a la activación.



A continuación (Tabla 1) se describen los hallazgos desde la fecundación hasta la eclosión de la larva.

Tabla 1. Estadios de desarrollo embrional de acuerdo con los hallazgos macroscópicos y la hora de fertilización.

Estadio	Número de blastómeras	Hora (hh:mm)	Figura	Características
Cigoto		00:08	5	Separación vitelo
Periodo de división celular	2	00:10		Observación de estructuras filamentosas
	4	00:30	6	Disposición 4x1
	8	00:45		Disposición 4x2
	16	01:00		Disposición 4x4
	32	01:30	7	
	64	01:35		Mórula
Periodo de blástula	128	01:45		Periodo de cresta o moño
		02:40	8	Finalización del estadio de cresta o moño Estadio de balón
Periodo de gástrula		05:45	9	50% de estadio de epiboly
		05:50	10	Anillo germinal
	Periodo de brote	10:05	11	Blastodermo termina de cubrir el saco vitelino, epiboly 80%
Periodo de segmentación y faringulación	Estadio de somitas	11:00	12	Rudimentos de columna vertebral
		17:10		Somitas claras y saco vitelino, inicia movimientos
		17:30-18:45	13	Movimientos fuertes, avance rectilíneo
Eclosión larval		19:00	14	

Figura 5. Período de cigoto.



Figura 6. Período de división celular. Embriones de dos, cuatro y 8 células.

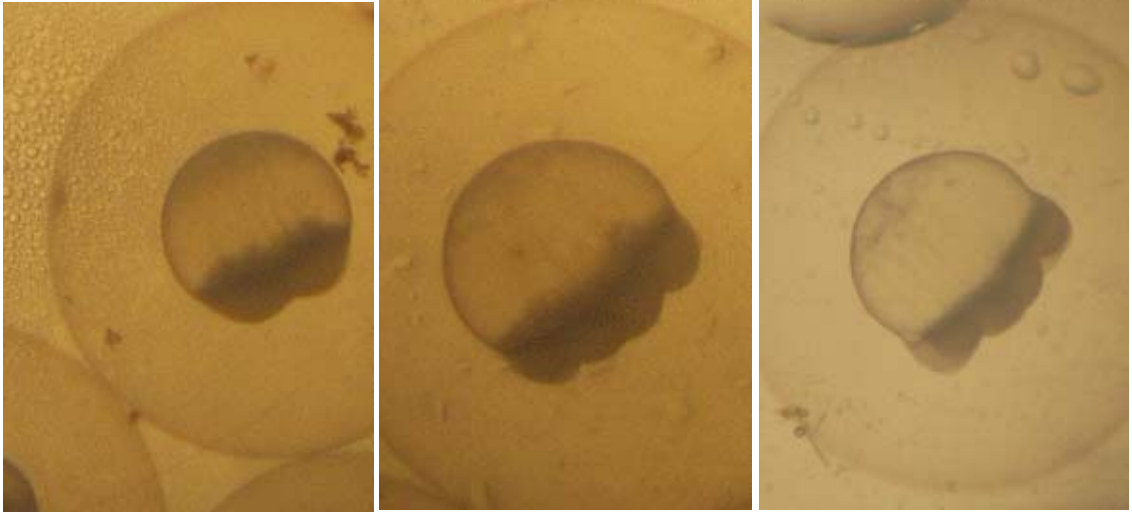


Figura 7. Período de división celular. Embriones de 16, 32 y 64 células.

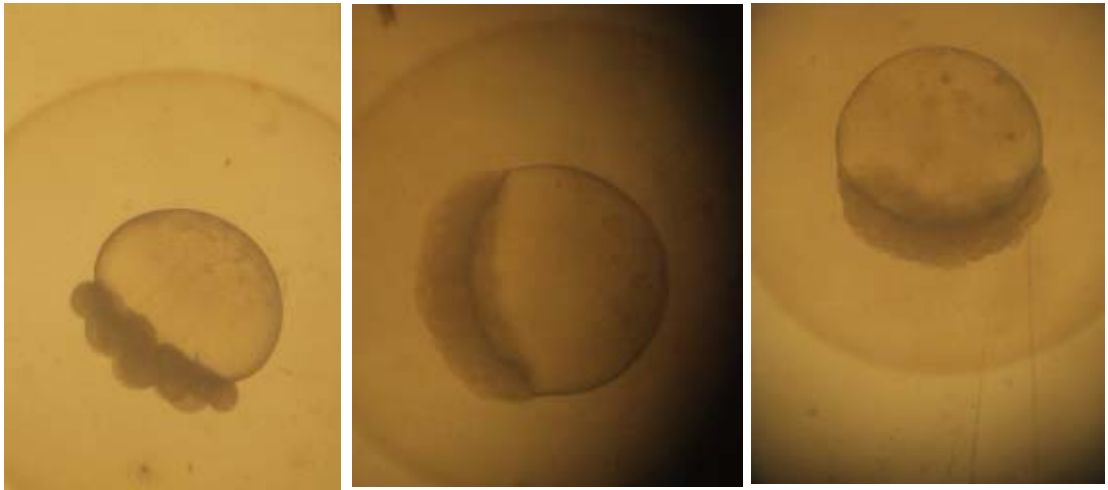


Figura 8. Período de blástula. 128 células.

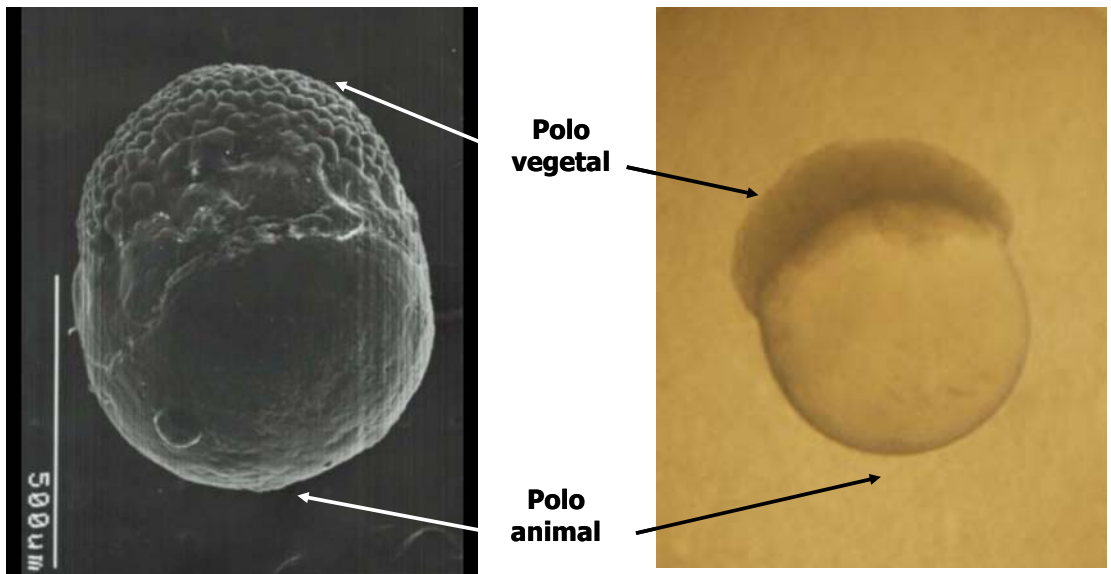


Figura 9. Período de gástrula. 50% epiboly o botón.

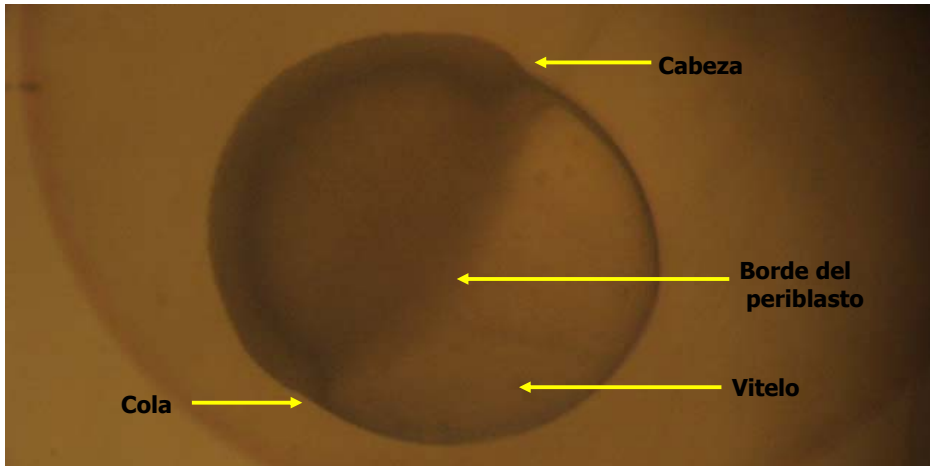


Figura 10. Período de gástrula.

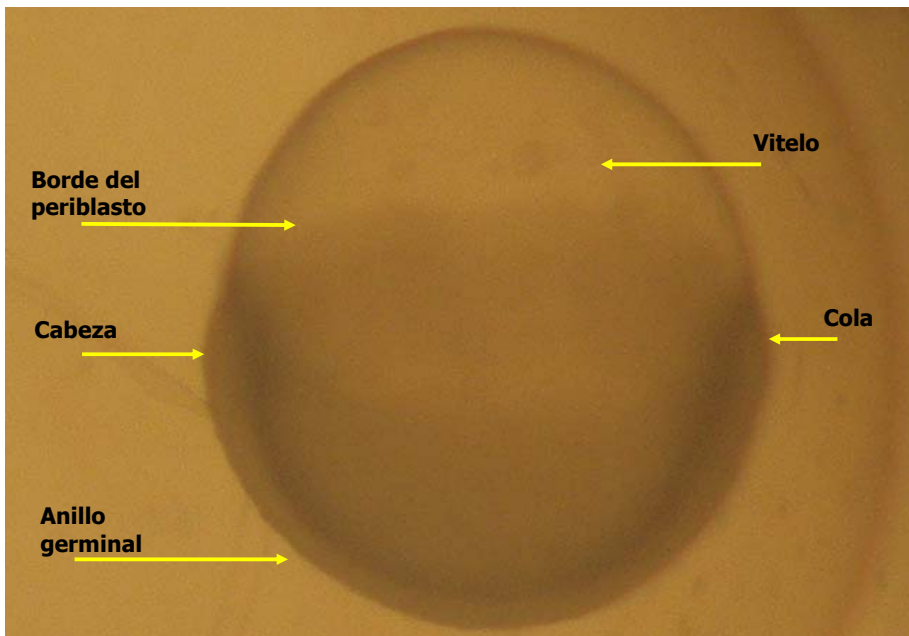


Figura 11. Período de gástrula. 80% epiboly o brote.

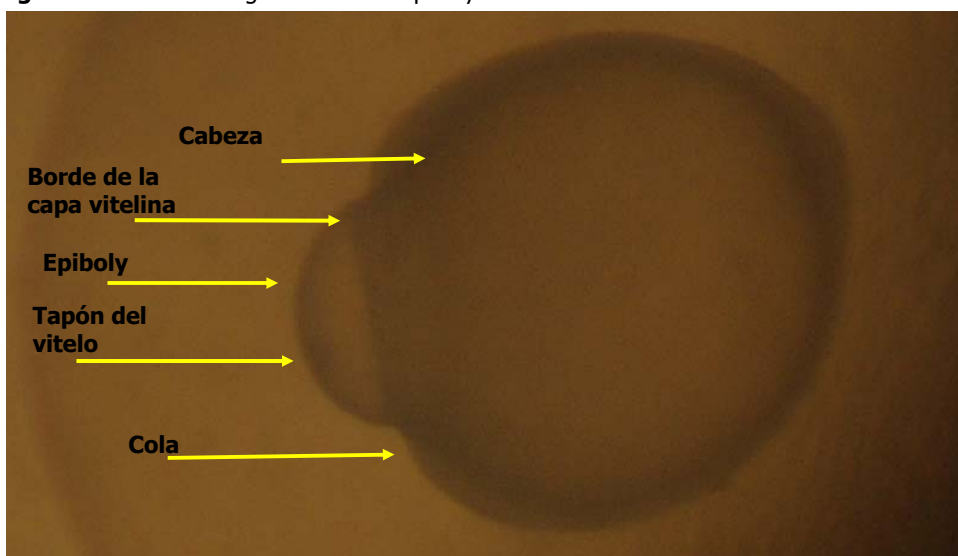


Figura 12. Período de segmentación. Diferenciación de somitas.

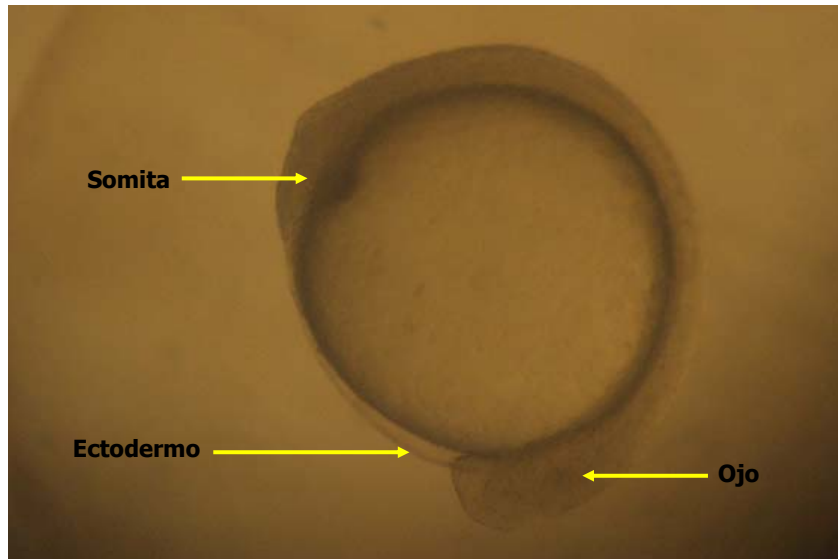


Figura 13. Período de segmentación. 20-25 somitas.

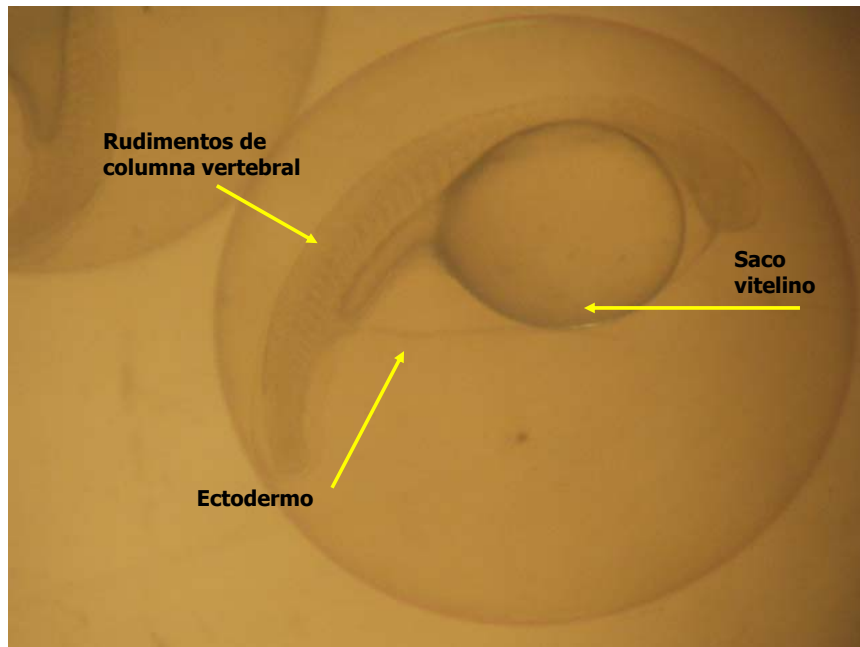
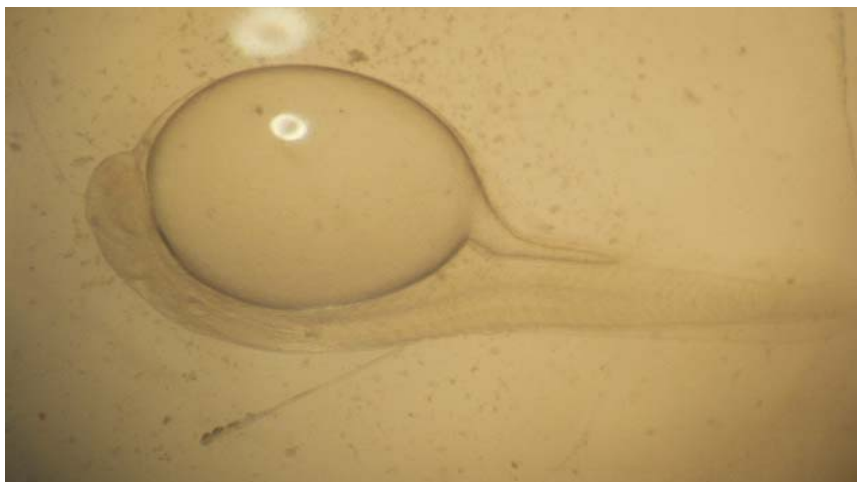


Figura 14. Eclosión.



La longitud de una larva es de aproximadamente 5 mm, su cuerpo no presenta pigmentación, la cantidad de segmentos musculares es de 29-31 y en la cola es de 12-14.

Discusión

El pez cebra (*Danio rerio*) como modelo de investigación ha sido caracterizado en muchas de sus estrategias reproductivas (Sawtell). Lo tomamos como modelo para comparar el desarrollo embrional del híbrido de Cachama.

La división celular consideramos que es meroblástica (ver Glosario) ya que el clivaje es orientado verticalmente y se pueden contar fácilmente el número de células.

Cuando pasa a 16 células las mórulas se distinguen claramente en dos planos paralelos produciendo un arreglo de 4x4.

Durante el periodo de blástula, el embrión se redondea en forma de balón, pero se pudo diferenciar claramente el paso de blástula a gástrula. En el estadio de gástrula se diferencia el eje germinal o también llamado eje embrional, así como la capa sincitial del vitelo. Durante el desarrollo de la gástrula se diferencia el "epiboly". Se refiere al adelgazamiento y dispersión de la capa sincitial del vitelo y del blastodermo, sobre el vitelo hasta cubrirlo casi totalmente.

El periodo de segmentación es claro, pero no se distingue el paso a estadio de faringula, estadio en que el embrión desarrolla características que lo definen como vertebrado: notocordio, tubo neural, somitas, cola post natal.

Podemos concluir que el desarrollo embrional de la Cachama híbrido es más rápido (19 h) que el del Pez Cebra (48 h), y que los estadios de desarrollo embrional son comparables.

Glosario

- *Eje germinal*: es el eje principal del embrión sinónimo de eje rostrocaudal y de eje embrional.
- *Blastodermo*: parte celular del embrión que excluye el vitelo, es derivado del blastodisco en la morfogénesis temprana; se refiere particularmente al tiempo durante el cual las células se distribuyen en forma de capa, entre la formación del 30% del epiboly y la finalización de la gastrulación.
- *Blastodisco*: citoplasma que queda en el polo animal y tiene forma de cúpula que se segrega del vitelo durante y después del estadio de una célula y mientras sucede el primer clivaje.
- *Epiboly*: la capa sincitial del vitelo y el blastodermo que está por encima y recubre el vitelo, eventualmente circundándolo completamente; el epiboly comienza en el estadio de cúpula, convierte el blastodisco en blastodermo y se considera que finaliza cuando está cubierto casi totalmente el vitelo.
- *Epiblasto*: Lo más externo de las dos capas del blastodermo, que se forman durante la gastrulación; corresponden al ectodermo primitivo durante la gastrulación y al ectodermo definitivo después de la misma.

Bibliografía

1. Benítez, J.C., M.A. Fernández y M.R. González. (2002). Desarrollo embrionario de *Ctenopharyngodon idellus* (Carpa Herbívora). Primer Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2002. 792-797 URL: <http://www.civa2002.org>
2. Bermudez, D. (1984). Evidencias sobre hibridación natural de "cachamas". Híbridos artificiales y notas sobre su cultivo (géneros *Colossoma* y *Piaractus*; *Teleostei*, *Characidae*, *Serrasalminae*). Trabajo de Ascenso para optar al escalafón de Profesor Agregado.
3. Dunham, R. (1997). Contribución de los organismos acuáticos mejorados genéticamente a la seguridad alimentaria mundial. Resultados de la Conferencia de Kyoto y documentos presentados. FAO Departamento de Pesca
4. Kimmel, C.B., W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann y T.F. Schilling. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish Developmental. Dynamics, 203:253-310 Copyright © 1995 Wiley-Liss, Inc. Reprinted only by permission of Wiley-Liss, a subsidiary of John Wiley & Sons, Inc. CONTENTS URL: http://zfin.org/zf_info/zfbook/
5. Kossowski, C. (2001). Hibridación del bagre zamurito *Calophysus macropterus* (Pisces, Pimelodidae) Bioagro, 13(2):71-77
6. Martino, G. (2002). Retrocruce de hembras híbridas (F1) (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) con machos de las especies parentales. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2002. 688-693 URL: <http://www.civa2002.org>
7. Sawtell, T. Report on endocrine techniques in aquaculture. Induced Spawning, Maturation and Sex reversal. URL: <http://www.argent-labs.com>