

## Descripción del desarrollo embrionario de cigotos híbridos obtenidos por el cruce de machos de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) y hembras de Cachama Negra (*Colossoma macropomum*)

Mónica Botero<sup>2</sup>, Dr. Sci. Acui.; Adriana Fresneda<sup>1</sup> Ms; Andrés F Montoya<sup>1</sup>; Est. Zoot., Martha Olivera Ángel<sup>1\*</sup>, Dr Sci Agr.  
<sup>1</sup>Grupo de Fisiología y Biotecnología de la Reproducción. <sup>2</sup>GRICA, Facultad de Ciencias Agrarias,  
 Universidad de Antioquia A.A. 1226 Medellín, Colombia  
 \*molivera@catios.udea.edu.co

(Recibido: 28 noviembre, 2003; aceptado: 20 junio, 2004)

### *Resumen*

*Fueron seleccionados tres machos de Piaractus brachypomus y 3 hembras de Colossoma macropomum de 2.5 a 3 años de edad. Los reproductores se trataron con EPC, según el grado de madurez sexual; la fertilización se realizó en seco y se usaron incubadoras de flujo ascendente. Cada 10-15 minutos se observó una muestra del 0.1% y se determinaron sus características. El huevo inicia su hidratación, el corion se separa del vitelo, a los 00:08 minutos comienza el período de “cigote”, se forma el blastodisco, y aparece el espacio perivitelino, a los 00:10 minutos comienza el período de “clivaje”, donde se observa el paso de dos a 64 células entre los 10 minutos y 1:45 horas pos inseminación. El período de “Blástula” y “Gástrula” se caracterizan por la formación del epiboly y el tubo ectodermal (diferenciación de cabeza y cola). A las 10:05 horas se da el engolfamiento del vitelo. A las 11:00 horas se inicia el período de “Segmentación” continúa con el de faringulación correspondientes al desarrollo de somitas (rudimentos de la columna vertebral), diferenciación de órganos básicos, vesícula óptica y los segmentos del mesodermo; a las 17:10 horas se diferencia claramente el saco vitelino y las somitas. Alrededor de las 19:00 horas posinseminación se da 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 tal que éste sea más competitivo y el producto final sea agradable al consumidor. Como línea de investigación básica, la hibridación permite el acercamiento a las características de la selectividad entre gametos, el desarrollo y fisiología del híbrido, y el cruzamiento interespecífica que puede mejorar la resistencia a enfermedades (3). El desarrollo embrionario de los peces es un proceso complejo que permite estudiar la ontogenia de las especie, puede

ser utilizado como objeto de experimentación en procesos biotecnológicos, como bioindicadores de la calidad del ambiente y para evaluar el efecto de sustancias tóxicas sobre la fauna acuática. Los embriones pueden ser utilizados en una gran variedad de estudios (1).

Martino (7) reporta que en Venezuela se ha logrado la hibridación artificial de dos especies de bagres *Leiarius marmoratus* y *Pseudoplatystoma fasciatum*. En el trabajo de Kossowski (4) se habla

de la compatibilidad y el desempeño en el crecimiento y engorde de los cruces intergenéricos *Calophysus macropterus* y *Leiarius marmoratus*, *C. macropterus* y *Pimelodus blochii*, *C. macropterus* y *Pseudoplatystoma fasciatum*, y *P. fasciatum* y *P. blochii*.

La hibridación natural de las especies de cachama es frecuente en el medio natural (2). En estaciones piscícolas se conocen ensayos de otras hibridaciones entre especies de serrasalmidae(4), que han buscado obtener 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* y *Piaractus* (7); sin embargo, son pocas las investigaciones que se realizan en seguimiento sistemático al desarrollo embrionario. Este trabajo presenta el desarrollo embrionario de éste híbrido y los tiempos en que se suceden los diferentes eventos; además, pretende contribuir a incrementar el conocimiento acerca del desarrollo embrionario en peces de aguas cálidas y puede ayudar en estudios de sistemática y de filogenética en estas especies.

### **Materiales 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 donde se introduce una cánula de diámetro entre 0.9-1.2 mm por el 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 transparentan con líquido aclarador (6 partes de alcohol al 90%, 3 partes de formalina al 40% y 1 parte de ácido acético glacial), con el fin de observar la posición de los núcleos.

Según el estadio de maduración las hembras se clasifican en:

1. Hembra inmadura. Cuando el 80% de los ovocitos son pequeños, irregulares y sin núcleo aparente.

2. Hembra iniciando maduración. Cuando entre 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.

3. Hembra madura. Cuando un 50 a 60% de los núcleos están migrando hacia la periferia (véase Figura 2), los ovocitos van unidos en cadeneta. En este período se puede inducir la hembra para ovular y ovoponer.

4. Hembra sobre-madura. Presentan ovocitos en proceso de atresia, deformes.

Hembras y machos del grupo de reproductores presente en la Estación Piscícola de San José del Nus, de la Universidad de Antioquia, fueron seleccionados de acuerdo con su estado de madurez gonadal. Para confirmarlo, en las hembras se hizo biopsia ovárica y en los machos presión abdominal para comprobar emisión de semen. Óvulos y espermatozoides activados fueron observados en el microscopio electrónico.

Las hembras clasificadas como maduras fueron tratadas con extracto de hipófisis de carpa (EPC) y se les aplicó la dosis universal de Woynarovich: una dosis preparatoria de 0.5 mg/kg de peso y una dosis definitiva de 5 mg/kg. Las hembras clasificadas como iniciando la maduración se trataron con una dosis inicial de 0.25 mg/kg de peso de EPC y a las 12 horas se les hizo el tratamiento descrito para las hembras maduras. Luego de la última dosis, se registró la temperatura del agua cada hora y haciendo la sumatoria hasta alcanzar como referencia 260 – 280°C/hora, período en el cual se inicia el desove.

A los machos maduros (espermiación posterior al estrujamiento abdominal), se les suministró una dosis única de 4 mg/kg de peso de EPC, aplicada simultáneamente con la dosis final de las hembras.

La fertilización se realizó en seco mediante la extracción de los huevos, sin permitirse ovopostura natural. Los huevos se recolectaron en un recipiente seco, evitando el contacto con el agua y se mezcló con el semen durante dos minutos, empleando una pluma. Luego se agregó agua para que el ovocito comenzara su proceso de hidratación y el esperma se activara.

Los huevos fertilizados se llevaron a incubadoras artesanales de flujo ascendente (1.0 l) (véase Figura 1) con agua a 27° C. Las observaciones del desarrollo se realizaron bajo el estereoscopio, tomando una muestra del total de huevos, cercana al 0.1%, cada 10-15 minutos, y se fotografiaron con cámara digital OLYMPUS D-520 ZOOM .

Algunas muestras de oocitos, espermatozoides y embriones se observaron al microscopio electrónico de transmisión, para lo cual fueron fijadas en glutaraldehído al 2% en solución de fosfato buffer (0.12M) por dos horas. Posteriormente se fijaron en tetraóxido de osmio al 1% en la misma solución buffer por una hora.



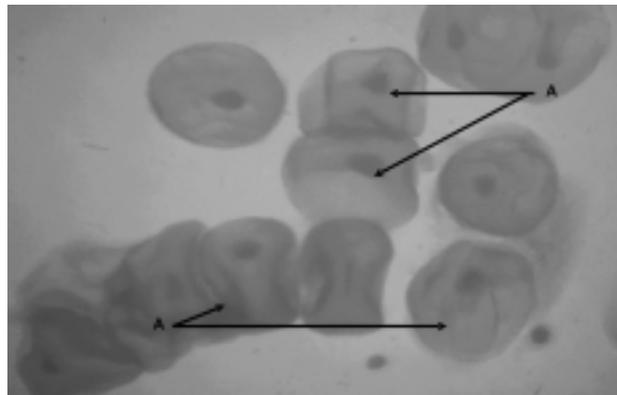
**Figura 1.** Incubadora artesanal de flujo ascendente.

El análisis de los resultados es de tipo descriptivo, mostrando las observaciones morfológicas.

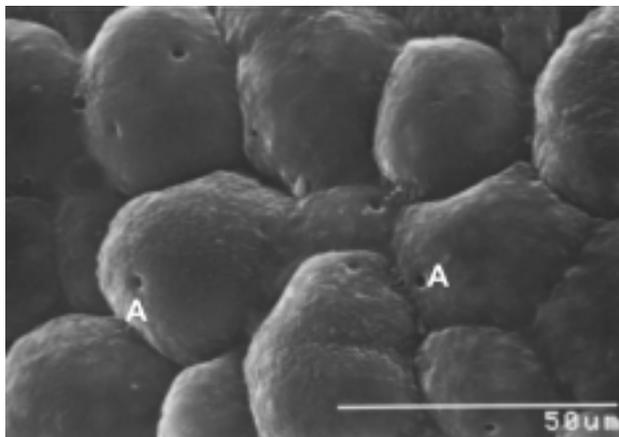
## Resultados

Se indujeron las hembras cuyos óvulos presentaron disposición en cadeneta y núcleos en migración (véase Figura 2). Una vez extruidos los huevos se observaron algunas agregaciones y el micrópilo abierto (véase Figura 2a). Los espermatozoides aparecen con cabezas aplanadas y ovals (véase Figura 2b).

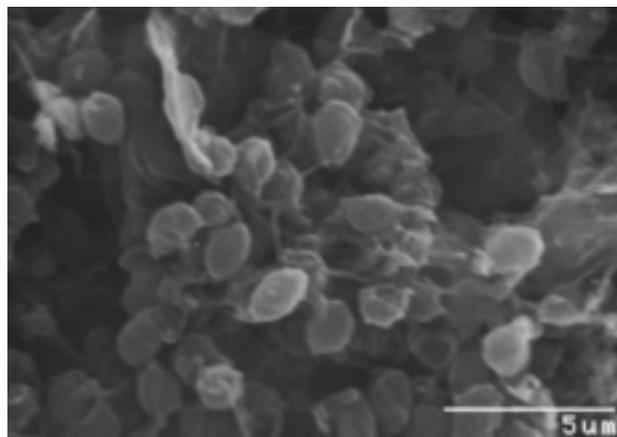
A continuación se describen los hallazgos desde la fecundación hasta la eclosión de la larva (véase Tabla 1).



**Figura 2.** Huevos de cachama con disposición en cadena. La hembra está apta para ser inducida hormonalmente. (A) Núcleos en migración.



**Figura 2a.** Microfotografía electrónica que muestra la disposición en cadeneta de los huevos de cachama y el micrópilo (A).



**Figura 2b.** Microfotografía electrónica que muestra los espermatozoides de cachama, posterior a la activación.

Tabla 1. Estadios de desarrollo embrionario de acuerdo a los hallazgos macroscópicos y la hora de fertilización

Hora (hh:mm)	Estadio	Número de blastómeros	Figura Número	Características
00:08	Cigoto		3	Separación del vitelo
00:10	Período de clivaje	2	4	
00:30		4	4	Disposición 4x1
00:45		8	4	Disposición 4x2
01:00		16	5	Disposición 4x4
01:30		32	5	
01:35		64	5	Mórula
01:45	Período de blástula	128	6	Período de cresta o moño
02:40			6	Finalización del estadio de cresta o moño
05:45	Periodo de gástrula		7	Estadio de balón
05:50			8	50% de estadio de epiboly
10:05			9	Anillo germinal
11:00			9	Blastodermo termina de cubrir el saco vitelino, epiboly 80%
17:10	Periodo de segmentación y faringulación	Estadio de somitas	10	Rudimentos de columna vertebral.
17:30-18:45			11	Somitas claras y saco vitelino, inicia movimientos
19:00	Eclosión larval		12	Movimientos fuertes, avance rectilíneo

## Discusión

Aunque el desarrollo embrional en pez cebra (*Danio rerio*) (8) se produce más lentamente (48 h) que el híbrido de este experimento (12h) consideramos que es el modelo para comparar el desarrollo de la cachama, ya que ha sido descrito detalladamente tanto macro como microscópicamente y es el que sirve como guía para los cursos de embriología.

### *Período de cigote*

Este período se pudo visualizar a los 8 minutos posteriores a la fertilización, caracterizado por que el citoplasma diferente al vitelo se distingue en el polo animal ( véase Figura 3). En el pez cebra este período ocurre a los 10 minutos posteriores a la fertilización.

### *Período de clivaje*

Se caracteriza por las divisiones celulares desde dos hasta las 64 células. A los 10 minutos se reconocen dos células, se ve un surco que atraviesa desde la mitad del polo animal y termina en la unión con el polo vegetal. A los 30 minutos se ven cuatro células (véase Figura 4), la división parece incompleta; se reconoce como un surco que divide las dos células del polo animal en forma perpendicular al surco de clivaje anterior, sin

embargo no divide claramente los cuatro blastómeros. A los 45 minutos se reconocen 8 células organizadas en una distribución 2x4 y a la hora se pueden contar 16 blastómeros en una distribución de 4x4. (véase Figura 5)

Los clivajes de 32 y 64 células, son difíciles de clasificar en el estereoscopio; lo que si se ve claramente es como unas blastómeros cubren a las otras y se aprecia la envoltura del blastodisco ( véase Figura 5). Por lo tanto consideramos que concluyó este estadio cuando se reconoce la blástula a la hora y cuarenta y cinco minutos.

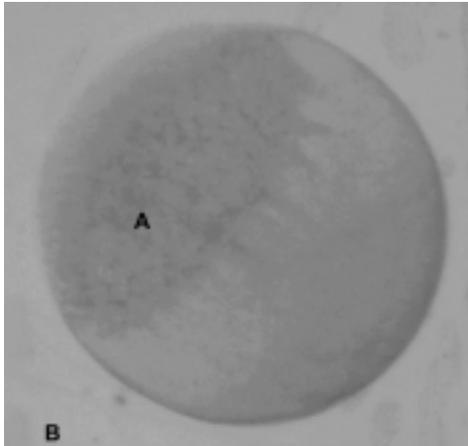
Se concluyó que al igual que en el pez Cebra (4), la división celular es meroblástica ya que el clivaje es orientado verticalmente y se pueden contar fácilmente el número de células. Mientras el período de clivaje del híbrido de cachama termina en una hora y 25 minutos, en el pez Cebra se demora dos horas y media.

### *Período de blástula y gástrula*

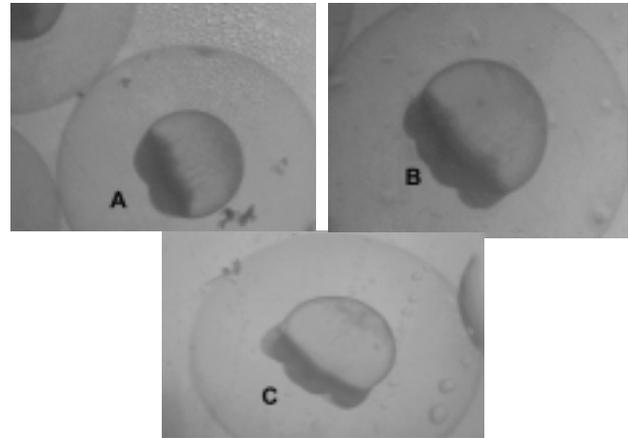
En el cigote se aprecia el borde de la capa sincitial vitelina y el embrión toma forma ovalada. El eje de la blástula del polo animal al polo vegetal se acorta, el

blastodisco comprime el vitelo. Se reconoce claramente el epiboly, ya que se hay una fracción de vitelo que sobresale de la parte que está cubriendo el blastodermo (véanse Figuras 6 y 7). Este período dura aproximadamente cuatro horas, similar al pez Cebra. Claramente no se puede diferenciar el paso de blástula a gástrula solamente a través del aumento del

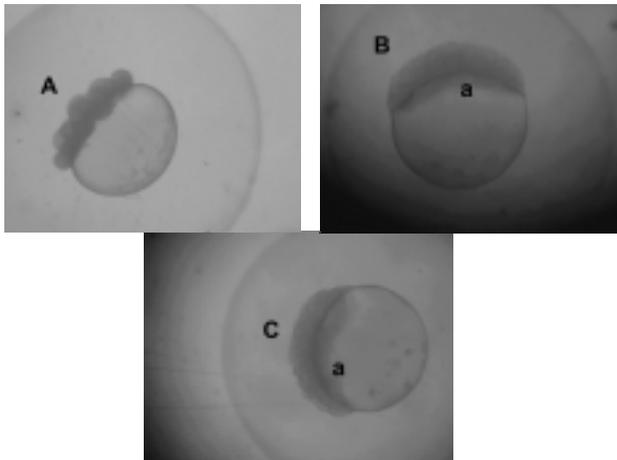
porcentaje del epiboly. La gástrula se diferencia por el eje germinal (eje embrional) y por la capa sincitial del vitelo. La clasificación del período de gástrula se realizó de acuerdo al porcentaje de epiboly presentado, cuando se reconoció el 50% de epiboly hasta el 90% (véanse Figuras 7 y 8). El período de gástrula dura lo mismo en el modelo de pez Cebra que en el híbrido.



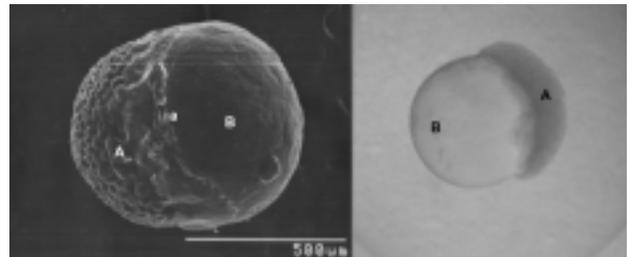
**Figura 3.** Período de cigote. (A) blastodisco, (B) espacio perivitelino.



**Figura 4.** Período de división celular. (A) embrión de dos células, (B) embrión de cuatro células, (C) embrión de ocho células.



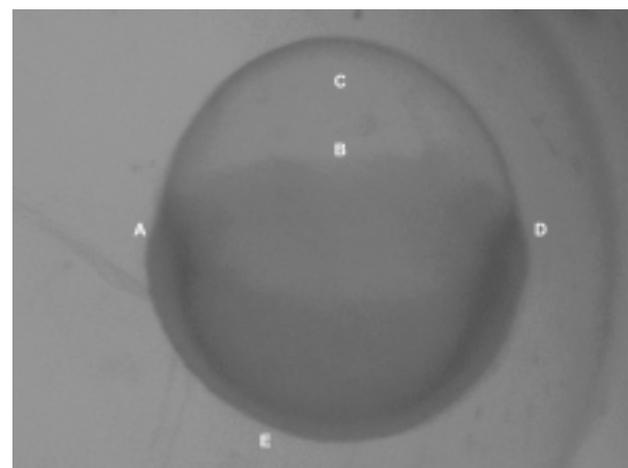
**Figura 5.** Período de división celular. Embriones de 16 células (A), 32 células (B) y 64 células (C). a. envoltura de blastodisco.



**Figura 6.** Período de blástula. (A) polo animal, (B) polo vegetal. a. Capa sincitial del blastodisco.



**Figura 7.** Período de gástrula, 50% epiboly o botón. (A) cabeza, (B) capa sincitial del vitelo, (C) vitelo, (D) cola.



**Figura 8.** Período de gástrula. (A) cabeza, (B) borde del periblasto, (C) vitelo, (D) cola, (E) anillo germinal.

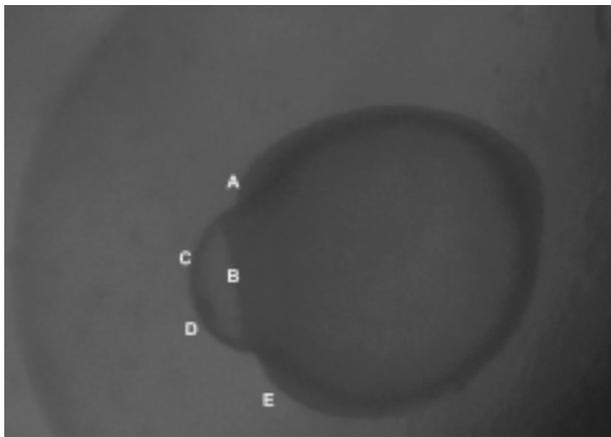
*Período de segmentación y de faringulación*

El período de segmentación (véase Figura 10), es caracterizado por la morfogénesis, el desarrollo de somitas y la elongación del embrión, ocurrió entre las 11 y las 17 horas posteriores a la inseminación. El período de faringulación (véase Figura 11), se reconoció porque el embrión presenta morfología con simetría bilateral, se ve alargado, la cola se distingue claramente y crece.

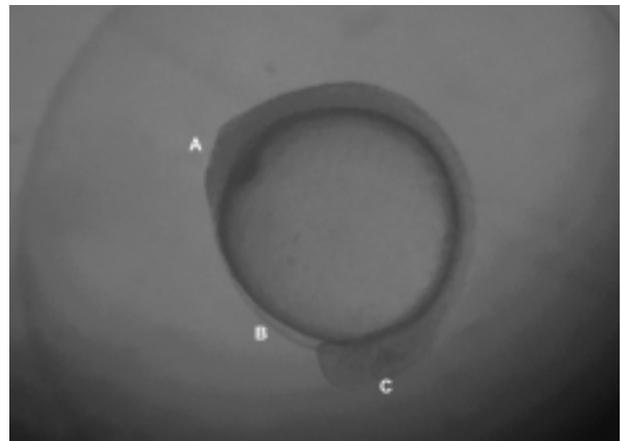
*Período de eclosión*

A las 17 horas posteriores a la inseminación el embrión comienza el movimiento fuerte y avanza en forma rectilínea, para alcanzar la eclosión a las 19 horas. No todos los embriones eclosionan al mismo tiempo, se da un 90% de eclosión en dos horas (véase Figura 12).

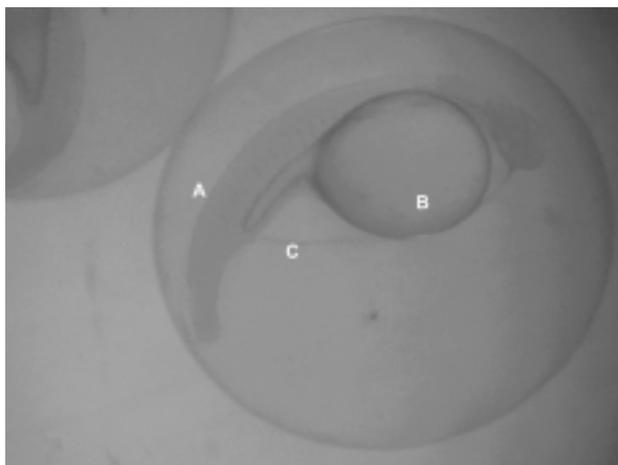
Como se puede concluir, los estadios de desarrollo embrional descritos en el pez Cebra, sirven para comparar el desarrollo en el híbrido de cachama, sin embargo la diferenciación en los cambios de etapas no fue fácil debido a la herramienta utilizada. Tal vez debido a que el desarrollo embrional de la cachama híbrido es más rápido (19h) que el del pez Cebra (48 h), se requieren observaciones más continuas y colorear los embriones para determinar mejor su tasa de desarrollo. Es importante además realizar los estudios a las mismas temperaturas, en este caso a 27°C ya que algunos estudios en la embriogénesis han concluido que la temperatura induce variaciones en la sincronización relativa al estado de desarrollo: epiboly, primer latido cardíaco, formación de aleta pélvica, formación del sistema digestivo y esquelético, pigmentación y desove (5).



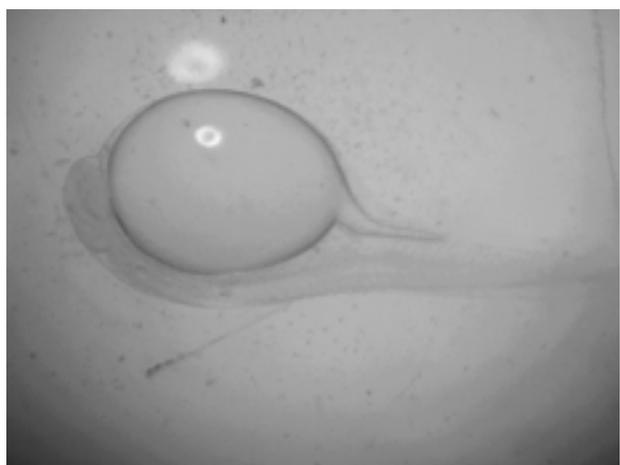
**Figura 9.** Período de gástrula, 80% epiboly o brote. (A) cabeza, (B) borde de la capa vitelina, (C) epiboly, (D) tapón del vitelo, (E) cola.



**Figura 10.** Período de segmentación. Diferenciación de somitas. (A) somita, (B) ectodermo, (C) ojo.



**Figura 11.** Período de faringulación, >25 somitas. (A) rudimentos de columna vertebral, (B) saco vitelino, (C) ectodermo.



**Figura 12.** Eclosión.

## 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 circundando completamente el vitelo. El epiboly comienza en el estadio de cresta, convierte el blastodisco en blastodermo y se considera que finaliza cuando está cubierto casi totalmente el vitelo y se ve el tapón de vitelo totalmente encerrado.

*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.

*Capa sincitial externa del vitelo*: porción de la línea sincitial al vitelo que está por fuera de la margen del blastodermo durante la fase de “epiboly”.

## Summary

*Embryonary development of hybrid Zygote obtained from males of Piaractus brachypomus and females of Colossoma macropomum.*

*Three male Piaractus brachypomus and three female Colossoma macropomum were selected, all of them were in a range of 2.5 to 3 years of age. They were treated with CPE depending on their sexual maturation status. Fertilization was performed “on dry” and ascendant flow incubators were used. A 0.1% sample was taken every 10 to 15 minutes and it’s characteristics were described. The egg begins to hydrate it self, the corium separates from the vitelum. At 00:08 minutes the zygote period starts, the blastocyst forms itself and the perivitelin space appears. Then at 00:10 minutes starts the cleavage period and between 10 minutes and 1:45 hours post fertilization occurs the 2 to 64 cell development. The blastule and gastrule period are characterized by the formation of the epiboly and the ectodermal tube (head to tail differentiation). At 10:05 hours there occurs the engulfing of the vitelum and at 11:00 hours the segmentation period begins and faringulation ensues, which corresponds to the development of somites (spinal cord rudiments) and formation of the basic organs, the optical vesicle and the segments of the mesoderm. At 17:10 hours the vitelin sac and the somites are clearly defined and at 19:00 hours there occurs the hatching of larva.*

**Key words:** *embryology, fisheries, hybridization*

## Referencias

1. Benítez JC, Fernández MA, González MR. Desarrollo embrionario de *Ctenopharyngodon idella* (Carpa herbívora). CIVA 2002; 792-797 URL:<http://www.civa2002.org>.
2. Bermúdez D. Evidencias sobre hibridación natural de “cachamas”. Híbridos artificiales y notas sobre su cultivo (géneros *Colossoma* y *Piaractus*; Teleostei, Characidae, Serrasalminae). Barquisimeto: Cuyuní, 1980, 23 p.
3. Dunham, R. A. The contribution of genetically improved aquatic organisms to global food security. Thematic paper presented at the Japan/FAO International Conference on Sustainable Contribution of Fisheries to Food Security, 4 - 9 December 1995, Kyoto, Japan.
4. Kimmel CB, Ballard W, Kimmel SR, Ullmann B, Thomas F. Schilling stages of embryonic development of the zebrafish developmental dynamics. 1995, 203:253-310. URL: [http://zfinfo.org/zf\\_info/zfbook/](http://zfinfo.org/zf_info/zfbook/).
5. Killeen J, McLay HA, Johnston A. Development in *Salmo trutta* at different temperatures, with a quantitative scoring method for intraspecific comparisons. J. Fish. Biol., 1999, 55: 382-404.
6. Kossowski C. Hibridación del bagre zamurito *Calophysus macropterus* (Pisces, Pimelodidae). Bioagro, 2001, 13(2): 71-77.

7. Martino G. Retrocruce de hembras híbridos (F1) (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) con machos de las especies parentales. CIVA 2002, 688-693. URL: <http://www.civa2002.org>.
8. Sawtell T. Report on endocrine techniques in aquaculture. Induced spawning, maturation and sex reversal. Año??.URL: <http://www.argent-labs.com>.