

## VALORES MORFOMÉTRICOS EN LARVAS DE YAMÚ *BRYCON AMAZONICUS* (PISCES: CHARACIDAE) OBTENIDAS CON SEMEN FRESCO Y CRIOCONSERVADO

MORFOMETRIC VALUES IN YAMÚ *BRYCON AMAZONICUS* (PISCES: CHARACIDAE) LARVAE OBTAINED FROM FRESH AND CRIOPRESERVED SPERM

Tatiana M. Mira-López<sup>1,2</sup>, Víctor M. Medina-Robles<sup>1,3</sup>, Yohana M. Velasco-Santamaría<sup>1,4</sup>, Pablo Emilio Cruz-Casallas<sup>1,5</sup>

### Resumen

Con el propósito de evaluar diferencias en el desarrollo corporal, el crecimiento y la sobrevivencia de larvas de yamú (*Brycon amazonicus*) obtenidas a partir de la fertilización de oocitos con semen fresco (SF) y semen crioconservado (SC), machos y hembras de la especie fueron inducidos hormonalmente con extracto de hipófisis de carpa. El semen obtenido fue evaluado y diluido en una solución de yema de huevo, glucosa y dimetilsulfoxido y congelado en vapores de nitrógeno. Las larvas fueron obtenidas de la seminación en seco de oocitos obtenidos de una misma hembra, con semen fresco o crioconservado y evaluadas desde la eclosión (0 horas) hasta 60 horas posteclosión (HPE). Se determinó la longitud total (LT), longitud notocordal (LN), el volumen del saco vitelino (VSV) y la sobrevivencia desde 35 HPE hasta 60 HPE. Para LT sólo hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) a la 42 y 54 HPE, siendo mayores las larvas obtenidas de SC ( $6,5 \pm 0,04$  y  $6,8 \pm 0,04$  mm, respectivamente). La LN fue significativamente diferente a las 0, 3 y 54 HPE, con un mayor desarrollo de larvas obtenidas de SF en la hora 0 ( $3,3 \pm 0,02$  mm) y para SC en la 3 y 54 HPE ( $4,1 \pm 0,05$  y  $6,6 \pm 0,04$  mm, respectivamente). El VSV a la 9 HPE fue mayor para SF ( $0,6 \pm 0,01$  mm<sup>3</sup>). Con relación a la sobrevivencia no hubo diferencias entre los dos tratamientos. En conclusión, el desarrollo corporal, crecimiento y la sobrevivencia de larvas de yamú obtenidas con SF y SC bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente no varía significativamente para la LT, LN y VSV hasta la 60 HPE.

*Palabras clave:* *Brycon amazonicus*, crioconservación, desarrollo larval, morfometría, yamú

### Abstract

In order to evaluate the differences in the corporal growth, development and survival of yamú (*Brycon amazonicus*), larvae obtained from eggs fertilized with fresh (FS) and cryopreserved (CS) sperm were used. Males and females of yamú were hormonally stimulated with carp pituitary extract. The sperm obtained was evaluated and diluted in an egg yolk, glucose and dimethylsulfoxide solution and frozen in nitrogen vapours. Eggs from the same female were seminated in dry with fresh and cyopreserved sperm and the larvae obtained were evaluated from the hatching (0 hours) until 60 hours post-hatching (HPH). In each larva, the total length (TL), notocordal length (NL), yolk sac volume (YSV) and larvae survival from 35 to 60 HPH were determined. Significant differences in the TL were observed only at 42 and 54 HPH being the larvae from the CS the longest ( $6.5 \pm 0.04$  and  $6.8 \pm 0.04$  mm, respectively). In terms of NL, the higher lengths were observed at 0, 3 and 54 HPH; larvae from FS was longer at 0 HPH ( $3.3 \pm 0.02$  mm) and larvae from CS were longer at 3 and 54 HPH ( $4.1 \pm 0.05$  and  $6.6 \pm 0.04$  mm, respectively). The highest YSV was observed at 9 HPH in larvae from FS ( $0.6 \pm 0.01$  mm<sup>3</sup>). No significant differences were observed in the survival between treatments. In conclusion, in the experimental condition above described, the corporal growth, development and survival of yamú larvae obtained from FS and CS did not change significantly in terms of TL, NL, and YSV until 60 HPH.

*Key words:* *Brycon amazonicus*, cryopreservation, corporal growth, morphometry, yamú.

Recibido: febrero 2007, aceptado: noviembre 2007.

<sup>1</sup> Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos (GRITOX). Instituto de Acuicultura de los Llanos, Universidad de los Llanos. Villavicencio, Colombia.

Correos electrónicos: <sup>2</sup> <t.mirah@gmail.com>; <sup>3</sup> <mauriciomedina77@gmail.com>; <sup>4</sup> <ymvelasco@yahoo.com>; <sup>5</sup> <pecruzcas@telecom.com.co>.

## INTRODUCCIÓN

El yamú, *Brycon amazonicus* Spix y Agassiz 1829 (Lima, 2003) es un carácido de la cuenca del río Orinoco, distribuido en los Llanos de Colombia y Venezuela, es reofilico y su reproducción natural se lleva a cabo durante la época de lluvias, que comprende el periodo entre febrero y junio (Arias, 1995, 2001). Por sus hábitos alimenticios omnívoros, su rápido crecimiento y la calidad y aceptación comercial de su carne, es una especie de excelentes condiciones para piscicultura (Torres, 2000). Sin embargo, la producción comercial de alevinos aún presenta dificultades debido a su marcada estacionalidad reproductiva y al canibalismo que presentan las larvas durante los primeros días de vida (Atencio, 1999).

El significado ontogénico se manifiesta por rápidos y repentinos cambios de forma y función que presentan acentuadas variaciones en el desarrollo inicial dependiendo de la especie, la temperatura del agua, la densidad de incubación y el nivel de oxígeno, pero sobre todo, por la oferta de recursos alimenticios (Iglesias et al., 1995). Así mismo, ocurren cambios que ocasionan detrimento y mortalidad causados por factores tales como depredadores, limitaciones en la reserva alimenticia y la gran sensibilidad de los embriones y larvas a los cambios en las características fisicoquímicas del agua (Atencio, 1999).

El conocimiento de la biología de la larva en los primeros días de vida en condiciones de cultivo reviste especial importancia, especialmente en las especies nativas potencialmente viables para la piscicultura, pues la producción de alevinos a gran escala dependerá del éxito de los sistemas de cultivo de larvas (Pinto y Castagnolli, 1984).

La crioconservación (conservación a bajas temperaturas) de semen de peces abre nuevas posibilidades para la reproducción controlada de especies ícticas de interés comercial, permitiendo ampliar los periodos estacionales de producción de semilla, dis-

poner permanentemente de gametos masculinos de líneas seleccionadas para mejoramiento genético (Ogier et al., 1997) y establecer bancos de germoplasma (Jenkis y Woods, 2002).

El principal requerimiento para el uso de semen crioconservado (SC), es que el proceso de descenso de temperatura no haya producido alteraciones en la célula espermática que impidan el desarrollo de la progenie de manera adecuada. Los espermatozoides alterados pueden producir especies reactivas de oxígeno de manera rápida (Aitken y Fisher, 1994), en particular después de la crioconservación (Alvarez y Storey, 1992). Estos productos de la peroxidación son altamente nocivos para el ADN y pueden producir rompimiento de las cadenas y/o modificación de las bases (Lopes et al., 1998; Rodríguez et al., 1999). Sin embargo las consecuencias de la crioconservación de semen en la progenie han sido escasamente estudiadas (Labbe et al., 2001), se ha demostrado que los espermatozoides expuestos a agentes deletéreos para el ADN alteran el genoma de la progenie (Kubota et al., 1995), así como su viabilidad y desarrollo (Trasler et al., 1985). Urbanyi et al. (2003), observaron en *Clarias gariepinus* gran número de malformaciones individuales en larvas recién eclosionadas provenientes de oocitos fertilizados con semen congelado. En estudios posteriores con la misma especie Miscolczi et al. (2005), encontraron porcentajes altos de malformaciones tanto en larvas obtenidas con semen fresco (SF) como en las obtenidas con semen crioconservado. En trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), se encontraron diferencias en el porcentaje de daño nuclear y fertilización, pero no se encontraron diferencias en la tasa de sobrevivencia embrionaria, ni en la tasa de reabsorción y/o anomalías del saco vitelino (Labbe et al., 2001). González y Fresneda (1999), concluyeron que el desarrollo embrionario, larvario y la etapa de alevinaje en cachama blanca (*Piaractus brachipomus*) y bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*), obtenidos con semen congelado es igual al obtenido con semen fresco.

Existen temores por parte de los productores para usar semen crioconservado, por que existe la creencia que las larvas obtenidas a partir de éste, presentan bajo desarrollo, mayor número de malformaciones y mayor mortalidad que las larvas obtenidas a partir de semen fresco. Dada la posibilidad de implementar de manera masiva prácticas reproductivas a partir de semen crioconservado en las piscifactorías nacionales, el conocimiento de posibles consecuencias desfavorables derivadas de su utilización, es de especial importancia en el desarrollo del sector acuícola. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento y la sobrevivencia de las larvas de yamú (*B. amazonicus*), obtenidas con semen fresco (SF) y crioconservado (SC).

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación fue realizada en el Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos (IALL, Universidad de los Llanos), Villavicencio (Colombia), a 418 msnm, durante un ciclo anual presenta una temperatura ambiental promedio de 29 °C, temperatura promedio del agua de 27 °C, precipitación pluvial de 4.050 mm y humedad relativa del 75%.

Reproductores machos y hembras de yamú en condición de madurez sexual fueron inducidos hormonalmente con extracto de hipófisis de carpa (EHC) vía intramuscular a razón de 5,75 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal distribuidas en tres dosis 0,25 (0 h), 0,5 (24 h) y 5 mg (36 h) para hembras y una única dosis de 4 mg kg<sup>-1</sup> de PC para machos, aplicada simultáneamente con la segunda dosis de la hembra (Cruz-Casallas et al., 2004). Los machos utilizados (n = 3) fueron obtenidos de una finca de la región y las hembras (n = 3) criadas y mantenidas en la estación piscícola del IALL, para un total de tres desoves. Los oocitos y el semen fueron colectados 6 y 18 h después de la última dosis, respectivamente. Previo a la obtención de los gametos los animales fueron tranquilizados me-

dante inmersión en una solución de 300 ppm de fenoxietanol (*Sigma Company*). Oocitos provenientes de una misma hembra se dividieron en dos grupos, los cuales se fertilizaron con semen fresco (SF) y crioconservado (SC), manteniendo una proporción aproximada de 50.000 y 75.000 espermatozoides móviles por oocito, respectivamente (Cruz-Casallas y Velasco-Santamaría, 2004). Para la fertilización con semen crioconservado se utilizó semen diluido en una solución a base de yema de huevo (12%), glucosa (5,5%) y dimetilsulfoxido (DMSO, 10%) y congelado en vapores de nitrógeno líquido a -196 °C, el cual mostró ser eficiente para la especie (Cruz-Casallas et al., 2004). El semen crioconservado fue utilizado con un periodo de 15 días postcongelación. En ambos casos la activación se realizó con bicarbonato de sodio al 1% (Cruz-Casallas et al., 2004). Posteriormente los huevos fertilizados fueron lavados mínimo 5 veces, con agua proveniente del sistema de incubación para permitir su hidratación. La incubación se realizó en incubadoras cónicas de flujo ascendente tipo Woynarovich con una capacidad de 200 l y flujo continuo de agua de 6 l/min. Durante la incubación se monitoreó la temperatura y el pH, mediante una sonda multiparamétrica YSI 556 (*Yellow Spring Instruments*). Las larvas eclosionadas se utilizaron para evaluar la sobrevivencia y el desarrollo larval; éstas se mantuvieron en las incubadoras hasta las 32 horas posteclosión (HPE), momento en el cual las larvas adquirieron la capacidad de nado horizontal y posteriormente se alojaron en acuarios de vidrio con capacidad de 20 l y aireación constante, conservando una densidad de siembra aproximada de 50 larvas por litro (Atencio et al., 2002). Las larvas fueron alimentadas con nauplios de *Artemia salina* (ca. 3 nauplios/ml) cada tres horas (Atencio et al., 2002), desde el momento de la siembra en los acuarios hasta la finalización de los experimentos.

Para evaluar la sobrevivencia larval, 3 réplicas cada una de ca. 200 larvas, se ubicaron en los acuarios anteriormente descritos, a partir de las 32 HPE

hasta las 60 HPE, tiempo en el cual fueron nuevamente cuantificadas, manualmente para determinar el porcentaje de sobrevivencia. Para delimitar el tiempo de desarrollo larval, se tomó como hora cero el momento en que eclosionaron el 90% de las larvas y como hora final las 60 HPE, momento en el cual la larva se encuentra totalmente formada (Galindo, 2002).

Para la descripción de los estadios de desarrollo se tomaron muestras al azar de grupos de larvas en las diferentes horas de muestreo y se registraron los principales cambios o apariciones de órganos y estructuras importantes de los diferentes sistemas tales como el circulatorio, respiratorio y muscular. De igual manera, se identificaron defectos y/o malformaciones que pudieran estar alterando la viabilidad de las larvas tales como edema pericárdico, malformaciones de la cabeza (microcefalia, agenesia, policefalia), del saco vitelino y de la cola (sifosis, lordosis, escoliosis, cola corta). Para lo anterior, fueron tomadas registros videográficos y fotografías por medio de una cámara digital (*Nikon*) acoplada a un microscopio óptico (*Nikon Eclipse E-400*), con el propósito de realizar una descripción de los eventos en vivo. Una vez realizado el registro fotográfico, el grupo de larvas utilizado, fue descartado y se reemplazó en el acuario una cantidad igual de larvas mantenidas bajo las mismas condiciones, con el fin de conservar la densidad de 50 larvas/l.

Para la evaluación del crecimiento se recolectaron muestras al azar de 60 larvas por tratamiento, cada tres horas, desde las 0 hasta las 60 HPE (Galindo, 2002). Las muestras se fijaron en formaldehído tamponado al 4% (Potthoff, 1984). Posteriormente, se tomaron las siguientes variables morfométricas: longitud total (**LT** = distancia entre el extremo anterior de la cabeza hasta el final de la aleta primigenia); longitud notocordal (**LN** = distancia entre el extremo anterior de la cabeza hasta el final de la notocorda) y; largo y alto del saco vitelino para determinar su volumen (**VSV**) mediante la fórmula:

$$\text{VSV} = (\delta/6) \times L \times h^2$$

donde, **L** = largo y **h** = altura; ambas longitudes fueron expresadas en milímetros (mm) y el volumen en milímetros cúbicos (mm<sup>3</sup>) (Galindo, 2002; Nascimento y Lima, 2000; Sánchez et al., 1999). Todas las medidas fueron registradas con una cámara digital (*Nikon M331E*) dispuesta en un estereomicroscopio (*Zeiss Stemi 2000C*) y analizadas con un programa computacional analizador de imágenes (*ACTU-2U*). Al igual que en el experimento del seguimiento del desarrollo, después de cada muestreo, se repuso las larvas extraídas en los acuarios.

Las variables analizadas fueron: LT (mm), LN (mm) y VSV (mm<sup>3</sup>). Los datos obtenidos fueron organizados y sometidos a estadística descriptiva y expresados como media error estándar de la media (SEM). Posteriormente, todos los resultados fueron sometidos a análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de comparación de Tukey cuando hubo diferencia significativa. Previo a cada análisis, la homogeneidad de las varianzas fue establecida por medio de la prueba de Bartlett. En todos los casos  $p < 0,05$  reveló diferencia significativa. Todos los procedimientos estadísticos fueron realizados empleando el programa computacional (*software*) SAS versión 8,02 para Windows (SAS Institute Inc., 1999-2001).

## RESULTADOS

La temperatura del agua de incubación fue de  $28,2 \pm 1,5$  °C y un pH de  $6,5 \pm 0,2$ . El porcentaje de fertilidad de los desoves realizado fue de  $85 \pm 2,0$  % para SF y  $75 \pm 2,0$  % para SC, el periodo embrionario tuvo una duración de 13,5 horas y las larvas eclosionaron aproximadamente a las 380 horas/grado. El periodo embrionario y el momento de eclosión fue igual para ambos tratamientos.

El desarrollo larvario del yamú no presentó diferencias entre los tratamientos evaluados, los principales cambios morfológicos se encuentran descritos en la tabla 1.

**Tabla 1.** Descripción del desarrollo larval del yamú (*Brycon amazonicus*) (HPE: horas posteclosión)

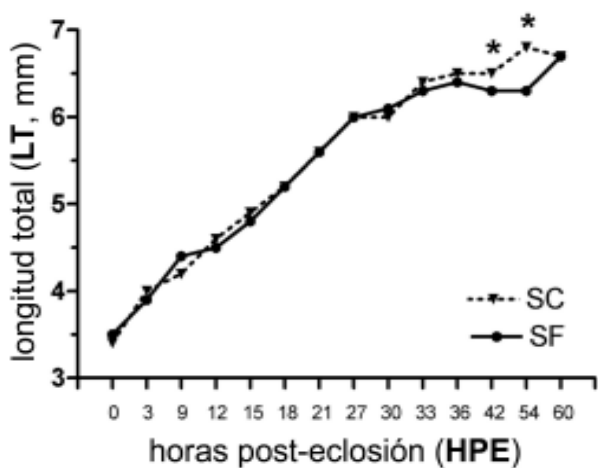
<b>HPE</b>	<b>descripción morfológica</b>
0	Las larvas eclosionan sin ningún tipo de pigmentación, están poco desarrolladas y presentan movimientos vibratorios; en la cabeza se observa: las copas ópticas, las vesículas óticas, las narinas y el ventrículo encefálico; la boca se encuentra cerrada; a lo largo del cuerpo se aprecia la notocorda desarrollada, rodeada por los miómeros y el tubo digestivo conectado al saco vitelino así como la aleta primigenia desarrollada a partir del séptimo somito.
3-6	Las larvas presentan movimientos vibratorios; con desplazamientos progresivos pausados o circulares, se observa el inicio de la pigmentación alrededor de las narinas y la copa óptica; las vesículas óticas se ven más diferenciadas y se pueden observar claramente dos otolitos en cada una; se observa el cristalino diferenciado; comienzan a formarse los pliegues orales y la protrusión del ano; comienza la formación de la cavidad cardiaca; se observan diferenciados el tercer y cuarto ventrículo del cerebro.
9-12	El 60% del ojo se encuentra pigmentado y comienzan a aparecer pigmentos en la región del corazón y del intestino; comienza la formación de los cuatro arcos branquiales y la comisura de la boca se ve más desarrollada y los pliegues orales empiezan a separarse; el corazón se ve como una vesícula dividida transparente en la parte anterior del saco vitelino y se observa el intestino posterior.
15-18	70% del ojo esta pigmentado; los arcos mandibulares están bien definidos; los arcos branquiales se diferencian claramente y se puede observar la formación de las lamelas branquiales; el intestino toma una coloración amarilla; a la 15 HPE la boca esta más abierta y a la 18 HPE hay movimientos mandibulares suaves; aletas pectorales en formación.
21-24	La línea dorsal sobre el saco vitelino y el intestino se encuentra totalmente pigmentada, así como la zona del corazón, la mandíbula y el ojo en un 90%; el corazón presenta pigmentación roja y se observa la circulación; en el corazón se notan tres cámaras; la boca se abre y se cierra con movimientos fuertes y se comienzan a formar los dientes; se observa abierto el opérculo; las paredes intestinales se diferencian y el estómago empieza a ensancharse; movimiento de aletas pectorales.
27-33	Boca abierta y dientes puntiagudos; estómago diferenciado y de color amarillo; el ojo se encuentra totalmente pigmentado; se observan más pigmentos a lo largo del cuerpo; se nota la circulación en la vena y arteria dorsal, con una coloración rosado tenue y se observa movimiento de células; comienza a observarse canibalismo; transición de nado vertical a nado horizontal.
36-42	Se observa la primera alimentación y defecación; presencia de artemia en la boca, estómago e intestino; la sangre se torna cada vez más roja; la pigmentación oscura de la línea del intestino se desplaza hacia atrás; el saco vitelino se ha consumido en su totalidad.
54-60	Los cambios observados son principalmente los relacionados con la pigmentación externa del cuerpo; los órganos se encuentran ya desarrollados y pigmentados; la vejiga natatoria está llena y la larva nada horizontalmente; boca y dientes desarrollados.

La longitud total presentó diferencias significativas (F = 10,12, gl = 13, n = 2.998, p < 0,05) a las 42

y 54 HPE, siendo más largas, las larvas obtenidas con SC (figura 1 y tabla 2).

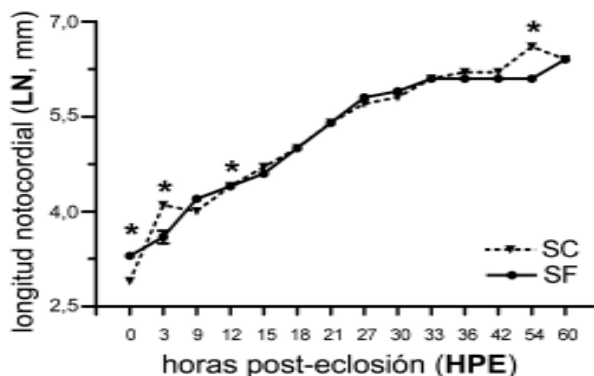
**Tabla 2.** Morfometría larval del yamú (*Brycon amazonicus*): longitud total (LT), longitud notocordal (LN) y volumen del saco vitelino (VSV) en ambos tratamientos: semen fresco (SF) y semen crioconservado (SC) (valores mostrados como media ± SEM; letras diferentes revelan diferencia estadística significativa: p < 0,05; n = 2.998; LT 2.651; LN 2.506 VSV)

HPE	LT (mm)		LN (mm)		VSV (mm <sup>3</sup> )	
	SF	SC	SF	SC	SF	SC
0	3,5 ± 0,02 <sup>o</sup>	3,4 ± 0,04 <sup>o</sup>	3,3 ± 0,02 <sup>q</sup>	2,9 ± 0,04 <sup>r</sup>	0,7 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,02 <sup>a</sup>
3	3,9 ± 0,05 <sup>n</sup>	4,0 ± 0,05 <sup>n</sup>	3,6 ± 0,10 <sup>q</sup>	4,1 ± 0,05 <sup>p</sup>	0,6 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,01 <sup>b</sup>
9	4,4 ± 0,04 <sup>m</sup>	4,2 ± 0,05 <sup>m</sup>	4,2 ± 0,05 <sup>p</sup>	4,0 ± 0,05 <sup>p</sup>	0,6 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,01 <sup>c</sup>
12	4,5 ± 0,02 <sup>l</sup>	4,6 ± 0,03 <sup>kl</sup>	4,4 ± 0,02 <sup>o</sup>	4,4 ± 0,03 <sup>n</sup>	0,5 ± 0,01 <sup>cd</sup>	0,5 ± 0,01 <sup>c</sup>
15	4,8 ± 0,02 <sup>ik</sup>	4,9 ± 0,02 <sup>j</sup>	4,6 ± 0,02 <sup>mn</sup>	4,7 ± 0,02 <sup>m</sup>	0,4 ± 0,01 <sup>ef</sup>	0,4 ± 0,01 <sup>cde</sup>
18	5,2 ± 0,01 <sup>i</sup>	5,2 ± 0,02 <sup>i</sup>	5,0 ± 0,01 <sup>l</sup>	5,0 ± 0,02 <sup>l</sup>	0,3 ± 0,01 <sup>fg</sup>	0,3 ± 0,01 <sup>fg</sup>
21	5,6 ± 0,01 <sup>h</sup>	5,6 ± 0,02 <sup>h</sup>	5,4 ± 0,01 <sup>k</sup>	5,4 ± 0,02 <sup>k</sup>	0,3 ± 0,01 <sup>gh</sup>	0,2 ± 0,01 <sup>hi</sup>
27	6,0 ± 0,01 <sup>f</sup>	6,0 ± 0,02 <sup>fg</sup>	5,8 ± 0,01 <sup>i</sup>	5,7 ± 0,02 <sup>ij</sup>	0,2 ± 0,01 <sup>hi</sup>	0,2 ± 0,01 <sup>hi</sup>
30	6,1 ± 0,01 <sup>f</sup>	6,0 ± 0,04 <sup>fg</sup>	5,9 ± 0,01 <sup>hi</sup>	5,8 ± 0,04 <sup>ij</sup>	0,1 ± 0,01 <sup>ij</sup>	0,1 ± 0,01 <sup>ij</sup>
33	6,3 ± 0,01 <sup>e</sup>	6,4 ± 0,01 <sup>cde</sup>	6,1 ± 0,01 <sup>efg</sup>	6,1 ± 0,01 <sup>de</sup>	0,1 ± 0,01 <sup>ij</sup>	0,1 ± 0,01 <sup>ij</sup>
36	6,4 ± 0,01 <sup>cde</sup>	6,5 ± 0,01 <sup>bc</sup>	6,1 ± 0,02 <sup>def</sup>	6,2 ± 0,01 <sup>cde</sup>	0,2 ± 0,01 <sup>hi</sup>	0,2 ± 0,01 <sup>hi</sup>
42	6,3 ± 0,02 <sup>e</sup>	6,5 ± 0,04 <sup>b</sup>	6,1 ± 0,02 <sup>defg</sup>	6,2 ± 0,04 <sup>bcd</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>ij</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>j</sup>
54	6,3 ± 0,04 <sup>e</sup>	6,8 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,04 <sup>efgh</sup>	6,6 ± 0,04 <sup>a</sup>	-	-
60	6,7 ± 0,03 <sup>ab</sup>	6,7 ± 0,04 <sup>ab</sup>	6,4 ± 0,03 <sup>abc</sup>	6,4 ± 0,03 <sup>b</sup>	-	-



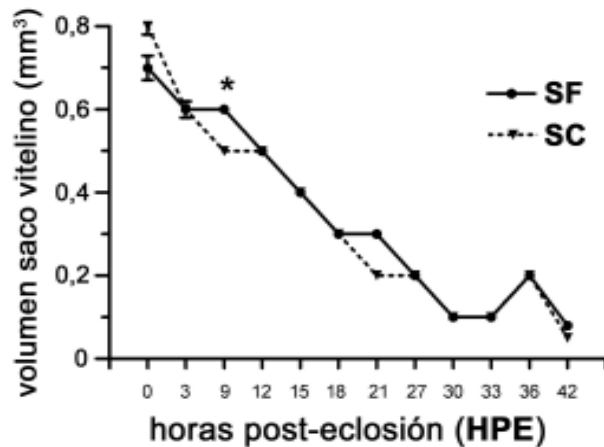
**Figura 1.** Longitud total (LT, mm) de larvas del yamú (*Brycon amazonicus*) obtenidas a partir de tratamientos de semen crioconservado (SC) y semen fresco (SF) a las 42 y 54 HPE (HPE = horas post-eclosión; los valores son mostrados como media ± SEM; \* se observan diferencias significativas entre tratamientos; p < 0,05, n = 2.998)

La longitud notocordal fue significativamente diferente (F = 14,95, gl = 13, n = 2.651, p < 0,05) a las 0, 3, 12 y 54 HPE, observándose mayor desarrollo de las larvas obtenidas con SF en la primera hora y para SC en las dos siguientes (figura 2 y tabla 2).



**Figura 2.** Longitud notocordal (LN, mm) de larvas del yamú (*Brycon amazonicus*) obtenidas a partir de tratamientos de semen crioconservado (SC) y semen fresco (SF) a las 0, 3, 12 y 54 HPE (HPE = horas post-eclosión; los valores son mostrados como media ± SEM; \* se observan diferencias significativas entre tratamientos; p < 0,05, n = 2.651)

El VSV disminuyó proporcionalmente tanto en larvas obtenidas con SF como con SC, sin diferencias significativas entre éstas ( $F = 3,05$ ,  $gl = 11$ ,  $n = 2.506$ ,  $p > 0,05$ ), a excepción de la 9 HPE cuando fue mayor para SF (figura 3 y tabla 2).



**Figura 3.** Volumen del saco vitelino (VSV, mm<sup>3</sup>) de larvas del yamú (*Brycon amazonicus*) obtenidas a partir de tratamientos de semen crioconservado (SC) y semen fresco (SF) a las 9 HPE (HPE = horas post-eclosión); los valores son mostrados como media  $\pm$  SEM; \* se observan diferencias significativas entre tratamientos;  $p < 0,05$ ,  $n = 2.506$ )

Las principales anomalías encontradas fueron edema pericárdico, agenesia y cola corta, estas solo se encontraron durante las primeras horas posteclosión y no hubo diferencias entre las larvas obtenidas con SF y SC.

La sobrevivencia obtenida de las 32 HPE a las 60 HPE en SF fue  $84,5 \pm 6,5$  % y en SC fue de  $82 \pm 1,0$ %.

## DISCUSIÓN

En este estudio no se encontró efecto de la crioconservación del semen sobre el desarrollo de la progenie obtenida. En estudios previos realizados con larvas obtenidas a partir de semen fresco (Arias et al., 2003 y Galindo, 2002) se encontraron

patrones de desarrollo similares a los encontrados en el presente estudio.

Las larvas de *B. amazonicus* tienen un desarrollo similar a las larvas de *B. cephalus* (Ceccarelli, 1997; Lopes et al., 1995) y es más rápido que en otras especies de peces suramericanos como *Colossoma mitrei* (Pinto y Castagnolli, 1984) y *Piaractus mesopotamicus* (Senhorini, 1995) donde el desarrollo tiene una duración aproximada de 7 días.

Este desarrollo acelerado se evidencia en el proceso de pigmentación del ojo, el cual se completó a las 33 HPE momento en el cual la larva necesita de su visión para cazar sus presas, pues su sistema digestivo se encuentra en el grado de desarrollo necesario para comenzar la alimentación exógena, así mismo, le permite ver y evitar los predadores (Atencio, 2000). La larva de yamú es un predador visual debido a sus ojos grandes y pigmentados que le permiten una persecución y captura más eficiente de sus presas (Atencio, 2000).

El cambio de alimentación endógena (vitelo) a exógena se observó entre la 33 y 36 HPE, momento en el cual la larva toma su primera alimentación, este periodo coincide con las primeras observaciones de canibalismo. Esta etapa es crítica para las larvas de peces e implica cierto grado de desarrollo de los órganos y los músculos de tal manera que le permitan al individuo perseguir, capturar e ingerir la presa (Osse y van den Boogaart, 1995).

A diferencia de otras especies en las cuales la alimentación exógena comienza cuando ha sido absorbido el saco vitelino en su totalidad (Gisbert y Williot, 1997), en este estudio, la larva de yamú inició la búsqueda de alimento entre las 32 y 36 HPE cuando aún el vitelo no había sido reabsorbido totalmente, esto podría ser una desventaja, porque la presencia del saco vitelino dificultaría el nado y por ende la captura de presas (Atencio, 2000). Por otro lado, esto probablemente le permitiría sobrevivir por más horas ante las dificultades para encontrar alimento (Atencio, 2000). Con base en esto podría-

mos decir que en el yamú, la etapa más crítica, es el momento en el cual las reservas vitelinas se han agotado totalmente lo cual fue determinado en este estudio a las 42 HPE y no cuando inicia su primera alimentación exógena, como ha sido reportado por otros autores (32 a 36 HPE) (Atencio, 2000).

La sobrevivencia larval está fuertemente influenciada por características morfológicas tales como la talla corporal y tamaño del saco vitelino. Una larva más larga tiene una capacidad de nado superior que una larva más pequeña y por ende va a ser más exitosa en la búsqueda y captura de la presa (Pepin y Myers, 1991), así mismo, una larva con saco vitelino grande, va a tener mayor habilidad para sobrevivir en épocas de presas insuficientes (Rana, 1985).

En la 42 y 54 HPE se encontraron diferencias en LT siendo mayor con el semen crioconservado, en la LN a las 0 y 12 HPE fueron más grandes las larvas producidas con semen fresco y a la 3 y 54 HPE las del semen crioconservado fueron más grandes.

En la mayoría de las horas evaluadas no se encontró diferencia significativa, por lo que se concluye que no hay un efecto del uso de semen crioconservado sobre las características morfométricas evaluadas, que impidan que la progenie de yamú, se desarrolle y crezca adecuadamente.

Aunque algunas condiciones ambientales fueron controladas y homogéneas (temperatura, pH y densidad de población) para los tratamientos, no se descarta la posibilidad que otros factores fueran responsables de las diferencias encontradas en LT y LN. La variación en características morfométricas como las evaluadas en este estudio es producto de influencias ambientales y parentales. Entre las influencias de tipo ambiental se destacan la temperatura, disponibilidad de oxígeno, densidad, sanidad y sistema de alimentación. En peces marinos se han comprobado influencias parentales en el tamaño de los oocitos, en el tamaño del saco vitelino

(Marteinsdottir y Steinarsson, 1998) y en la longitud notocordal en el momento de la eclosión (Panagiotaki y Geffen, 1992), entre otras.

En peces la contribución materna al oocito fertilizado, compromete no solo el material genético nuclear, sino también un material extranuclear (reserva vitelínica), convirtiéndose este aporte en más del 50% del peso seco del huevo fertilizado. En contraste, los machos contribuyen a su progenie sólo el material genético. Debido a esto, se asume comúnmente que la influencia parental (no inducida ambientalmente) sobre la talla de las larvas, es principalmente de origen materno, por lo que hay pocos estudios donde se evalúe el efecto paterno sobre características morfométricas en la vida temprana de la progenie (Rideaut et al., 2004).

Rideaut et al. (2004) y Probst et al. (2006) demostraron que hay un efecto paterno significativo sobre la longitud notocordal y el tamaño del saco vitelino de larvas *Melanogrammus aeglefinus*. Otros autores reportan efecto paterno significativo en la talla de las larvas de *Clupea arengus* y *Solea solea* (Panagiotaki y Geffen, 1992), contrario a ésto Saillant et al. (2001), reporta que la influencia parental sobre la talla de larvas de *Dicentrarchus labrax* sólo es de origen materno. En *Salmo salar*, la variación en la talla de larvas tiene influencia materna y en las larvas más pequeñas encontraron influencia de ambos parentales. (Thorpe y Morgan, 1978). Esto sugiere que si procesos como la crioconservación llegaran a alterar el material genético del espermatozoide, esto podría tener un efecto negativo sobre el desarrollo de la progenie.

Debido a que la criopreservación puede afectar los componentes subcelulares (Ogier et al., 1999) y comprometer la capacidad del espermatozoide de vesicular la envoltura nuclear y exponer la cromatina condensada al citoplasma del huevo, esto podría influir en la adecuada descondensación del núcleo para formar un pronúcleo masculino normal (Gilbert, 1949).



No hubo un efecto significativo del uso de semen crioconservado en el VSV de las larvas obtenidas a partir de éste, a excepción de la 9 HPE, donde tuvieron mayor VSV las larvas obtenidas a partir de semen fresco. Esta diferencia podría atribuirse a factores ambientales o a influencias maternas, esto ha sido reportado en *Melanogrammus aeglefinus*, en la cual encontraron efecto materno significativo en el tamaño del saco vitelino de la larva en el momento de la eclosión y en el segundo tercio del desarrollo de la larva dependiente de saco vitelino efecto significativo materno y paterno (Probst et al., 2006; Rideout et al., 2004). En otra investigación, se encontró efecto materno y paterno significativo sobre el tamaño del saco vitelino en el último tercio del desarrollo (Rideout et al., 2004).

Hay pocos estudios disponibles sobre las consecuencias de la crioconservación de semen en la progenie, en estos se han evaluado la proporción de malformaciones (Urbanyi et al., 2003; Miscolczi et al., 2005), el cariotipo de larvas malformadas (Miscolczi et al., 2005) y las anomalías en el saco vitelino (Labbe et al., 2001), sin embargo, la evaluación de características morfométricas, no ha sido evaluada, siendo este trabajo el primer reporte para la especie.

Finalmente, se concluye que el uso de semen crioconservado, en las condiciones experimen-

tales anteriormente descritas, no tiene efecto sobre el desarrollo, crecimiento y sobrevivencia de las larvas obtenidas por medio de esta biotecnología. Se sugiere, de acuerdo a los estudios disponibles y a los resultados obtenidos, que aunque no existen diferencias en la especie estudiada, del efecto de la crioconservación del semen sobre el desarrollo larvario, se realicen estudios donde se evalúen otras variables como sobrevivencia temprana y peso, así como el efecto del uso del semen crioconservado sobre el desempeño productivo y/o reproductivo de los juveniles y adultos obtenidos, para que esta herramienta sea usada sin que represente riesgos en el desempeño esperado de la especie.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Los Llanos (IALL-UNILLANOS) y a todos aquellos que de alguna manera contribuyeron para la realización de este trabajo, especialmente a Jhon Clavijo, Paola Villamil y Luis Herrera. A Martha Olivera Ángel y Carlos Javier Tabares Serna, por sus revisiones y comentarios en la edición del manuscrito. Al Instituto de Investigación de la Orinoquia Colombiana (IIOC) por la financiación de este trabajo.

## REFERENCIAS

- Aitken J, Fisher H.** 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *BioEssays*, 16:259-267.
- Alvarez E, Storey BT.** 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology*, 13:232-241.
- Arias-Castellanos JA.** 1995. *Contribución al conocimiento biológico de los peces de los llanos yamú (Brycon siebenthalae) y sapuara (Semaprochilodus laticep), con fines de cultivo.* Informe final Universidad de los Llanos-COLCIENCIAS. Colombia.
- Arias-Castellanos JA.** 2001. Avances en la nutrición y alimentación del yamú. Pp. 4-8. En: Eslava MPR (ed.). *Memorias VII jornada de acuicultura tercera reunión regional del género Brycon.* Universidad de los Llanos (IALL). Villavicencio, Colombia.
- Arias-Castellanos JA; Balaguera D; Rodríguez CM.** 2003. Desarrollo larvario del yamú *Brycon siebenthalae*. *Revista Orinoquia*, 7(1-2):28-33.
- Atencio-García VJ.** 1999. *Alguns aspectos da fisiologia do yamú (Brycon siebenthalae, Eigenman 1912). Revisión teórica acerca de la especie yamú.* Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil.

- Atencio-García VJ.** 2000. Influência da primera alimentação na alevinagem do yamú *Brycon siebenthalae* (Eigenmann, 1912). Disertación (M.Sc Acuicultura). Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil.
- Atencio-García VJ, Zaniboni FE, Pardo CSC, Arias CJA, Vásquez TW.** 2002. Influência de la primera alimentación en el alevinaje del yamú *Brycon siebenthalae*. Pp. 65-76. En: Eslava MPR (ed.). *Memorias VIII jornada de acuicultura*. Universidad de los Llanos (IALL). Villavicencio, Colombia.
- Ceccarelli P.** 1997. Canibalismo em larvas de matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869). Disertación de maestría. Instituto de Biociências de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, Brasil.
- Cruz-Casallas PE, Pardo CSC, Arias CJA, Lombo RDA.** 2004. Cryopreservation of yamú *Brycon siebenthalae* (Milt). *Journal of the World Aquaculture Society*, 35(4):529-535.
- Cruz-Casallas PE, Velasco-Santamaría YM.** 2004. Criopreservación de semen de yamú (*Brycon siebenthalae*): calidad seminal, dosis inseminante y sistemas de empaque. Pp. 27-34. En: Eslava MPR (ed.). *Memorias II Congreso Colombiano de Acuicultura*. Universidad de los Llanos (IALL). Villavicencio, Colombia.
- Galindo BD.** 2002. Descripción del desarrollo larval del yamú (*Brycon siebenthalae*). Tesis de pregrado. Facultad de Zootecnia. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia.
- Gilbert SF.** 1949. *Developmental biology*. Sinauer Associates, Inc. U. S. A.
- Gisbert E, Williot P.** 1997. Larval behavior and effect of the timing of initial feeding on growth and survival of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) larvae under small scale hatchery production. *Aquaculture*, 156:63-76.
- González E, Fresneda A.** 1999. Criopreservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachipomus*) y bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 12(suplemento):197-199.
- Iglesias J, Rodríguez-Ojea G, Peleteiro JB.** 1995. Effect of light and temperature on the development of turbot eggs (*Scophthalmus maximus* L.). *ICES Marine Science Symposia*, 201:40-44.
- Jenkis KK, Woods LC.** 2002. The cryopreservation of striped bass *Morone saxatilis* semen. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33(1):70-77.
- Kubota Y, Shimada A, Shima A.** 1995. DNA alteration detected in the progeny of paternally irradiated Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Proceedings National Academy of Science (U. S. A.)*, 92:330-334.
- Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maise G.** 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 60:397-404.
- Lima F.** 2003. Subfamily Briconinae (Characins, tetras). Pp. 742. En: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ (eds.). *Check list of the freshwater fishes of South and Central American*. Porto Alegre: Edipucrs. Brasil.
- Lopes R, Senhorini JA, Suarez.** 1995. Desenvolvimento embrionario e larval do matrinxã (*Brycon cephalus*). Boletín técnico CEPTA. Pirasununga Brasil.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF.** 1998. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 13:896-900.
- Marsteinsdottir G, Steinarsson A.** 1998. Maternal influences on the size and viability of Iceland cod *Gadus morhua* eggs and larvae. *Journal of Fish Biology*, 52:1241-1258.
- Miskolczi E, Mihalfy S, Patakiné E, Urbányi B, Horváth A.** 2005. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. *Aquaculture*, 247:119-125.
- Nascimento FL, Lima CARMA.** 2000. Descrição de larvas das principais espécies de peixes utilizadas pela pesca no Pantanal. *Boletim de Pesquisa (EMBRAPA Pantanal, Brasil)*, 25:1-25.
- Ogier B, Le Vern Y, Kerboeuf D, Maise G.** 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology*, 34:141-149.
- Ogier B, Labbé C, Maise G.** 1999. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology*, 39:177-184.
- Osse JWM, van den Boogaart JGM.** 1995. Fish larvae, development, allometric growth, and the aquatic environment. *ICES Marine Science Symposia*, 201:21-34.
- Panagiotaki P, Geffen AJ.** 1992. Parental effects on size variation in fish larvae. *Journal of Fish Biology*, 41:37-42.
- Pepin P, Myers RA.** 1991. Significance of egg and larval size to recruitment variability of temperate marine fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48:1802-1828.
- Pinto M, Castagnoli N.** 1984. Desenvolvimento inicial do pacu *Colossoma mitrei* (Berg, 1895). *Anuarios Simpósio Brasileiro Aquicultura*, 3:12.
- Potthoff T.** 1984. Clearing and staining techniques. Pp. 35-37. En: Moser HG, Richards WJ, Cohen DM, Fahay MP, Kendall AW, Richardson SL (eds.). *Ontogeny*

- and systematics of fishes*. American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Florida, U. S. A.
- Probst WN, Kraus G, Rideout RM, Trippel EA.** 2006. Parental effects on early life history traits of haddock *Melanogrammus aeglefinus*. *ICES Journal of Marine Science*, 63:224-234.
- Rana KJ.** 1985. Influence of egg size on the growth, onset of feeding, point-of-no-return and survival of unfed *Oreochromis mossambicus* fry. *Aquaculture*, 46:1802-1828.
- Rideout RM, Triple EA, Litvak MK.** 2004. Paternal effects on haddock early life history cleavage patterns. *Journal of Fish Biology*, 64:695-701.
- Rodriguez H, Valentine MR, Holmquist GP, Akman SA, Termini J.** 1999. Mapping of peroxy radical induced damage on genomic DNA. *Biochemistry*, 38:16578-16588.
- Saillant E, Chatain B, Forstier A, Przybyla C, Fauvel C.** 2001. Parental influence on early development in the European sea bass. *Journal of Fish Biology*, 58:1585-1600.
- Sanches PV, Nakatani K, Bialecki A.** 1999. Morphological description of the developmental stages of *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes, Auchenipteridae) on the floodplain of the upper Paraná river. *Revista Brasileira de Biologia*, 59(3):429-438.
- Senhorini JA.** 1995. Desenvolvimento larval do pacu *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1987 (Pisces Characidae), em viveiros. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
- Thorpe JE, Morgan GIG.** 1978. Parental influence on growth rate, smolting rate and survival in hatchery reared juvenile Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 13:549-556.
- Torres QE.** 2000. Apuntes sobre el cultivo del yamú en los Llanos Orientales. Pp. 9-10. En: Eslava MPR (ed.). *Memorias VI jornada de acuicultura segunda reunión regional del género Brycon*. Universidad de los Llanos (IALL). Villavicencio, Colombia.
- Trasler JM, Hales BF, Robaire B.** 1985. Paternal cyclophosphamide treatment of rats causes fetal loss and malformations without affecting male fertility. *Nature*, 316:144-146.
- Urbányi B, Miskolczi E, Mihálffy S, Patakiné EV, Horváth Á.** 2003. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. *Book of abstracts World Aquaculture*. Salvador, Brasil.