

## Relación ARN/ADN como índice de condición fisiológica del híbrido de la cachama *Colossoma macropomum* y el morocoto *Piaractus brachypomus* durante el desarrollo embrionario

Humberto Gil<sup>1</sup>, Kyung S. Chung<sup>2\*</sup>, Mairin Lemus<sup>2</sup> & Douglas Altuve<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, INIA, Sucre, Venezuela. Correo electrónico: hgil@inia.gov.ve

<sup>2</sup> Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná 6101, Venezuela.

Correo electrónico: kchung@cumana.sucre.udo.edu.ve \*correspondencia; mlemus@sucre.udo.edu.ve

(Recibido 31-VIII-2001. Corregido 12-VI-2002. Aceptado 09-I-2003)

**Abstract:** We evaluated RNA/DNA ratio as an index of physiological condition during larval development of a hybrid between the fishes *Colossoma macropomum* (cachama) and *Piaractus brachypomus* (morocoto). The samples were obtained by induced reproductive technology and the eggs were maintained in acrylic conical incubator with a continuous waterflow. Embryonic development, from egg fertilization to cell division and hatch out, took 12 hours 20 minutes at 29.5°C, dissolved oxygen contents of 6.0 ppm and pH 7.5. Nucleic acids quantification was determined by fluorometry with ethidium bromide and Hoechst 33258 dyes. We observed significant changes of RNA/DNA ratios during all stages of the embryonic larval development. Therefore, RNA/DNA relation is an useful technique to evaluate physiological condition in short period and could be utilized as nutritional condition and/or instantaneous growth for routine check to verify the health status in early life of cultivated species.

**Key words:** Larval fish condition, RNA-DNA ratio, physiological index.

La cachama (*Colossoma macropomum*) y el morocoto (*Piaractus brachypomus*) son considerados como las especies de mayor potencial en piscicultura en aguas cálidas continentales de América Latina, dada a su resistencia al manejo y su fácil adaptación al consumo de alimentos concentrados y alimentos naturales en condiciones de cautiverio, a lo que se le adiciona su rápido crecimiento, con excelentes conversiones alimenticias y gran demanda en el mercado (Díaz & López 1993). Además, otra ventaja de estas especies es la gran capacidad que tienen para efectuar cruces interespecíficos, con lo cual se obtienen híbridos con muy buenas características, altos rendimientos y buen poder de conversión.

En Venezuela, los primeros intentos de producción de híbridos en peces de consumo dul-

ceacuícolas de aguas cálidas, se realizaron entre los machos de *P. brachypomus* con hembras de *C. macropomum* (Kossowski *et al.* 1983). Los resultados han sido prometedores donde hoy en día es rutinaria la producción masiva de este híbrido en varios centros de producción del país. Este híbrido en cultivo supera en ganancia de peso 3.6 veces al peso de sus medio hermanos de cruces uniespecíficos de cachama (González & Heredia 1989).

En las primeras etapas de vida del híbrido cachama-morocoto y de la cachama, el desarrollo está influenciado por numerosos factores, como por ejemplo, la temperatura, oxígeno y disponibilidad de alimento, los cuales afectan principalmente la tasa de crecimiento, como también la condición fisiológica la cual se puede estimar a corto plazo, a través de los

índices bioquímicos, tales como el ADN, ARN y la relación ARN/ADN (Chung *et al.* 1993, Lemus *et al.* 1993, Segnini & Chung 1997, 2001, Bracho *et al.* 2000, Viñoles *et al.* 2000). Esta relación ha recibido una amplia aplicación en investigaciones de la biología del crecimiento de los organismos acuáticos y las respuestas de éstos a cambios ambientales externos o internos, el cual implica que el contenido de ADN, es un factor biológico estable, indicador del número de células o actividad mitótica, es decir, crecimiento por proliferación celular, mientras que el nivel de ARN/ADN, nos indica la actividad metabólica asociada a la síntesis de proteínas, donde esto se refleja en un crecimiento por aumento de volumen. Por otra parte, el análisis de los ácidos nucleicos en los tejidos de los individuos durante todas las etapas de su desarrollo, reviste especial interés para obtener una mejor comprensión de la fisiología de los organismos, esto ha sido de gran utilidad en la evaluación del crecimiento de organismos acuáticos en medios naturales o artificiales, porque implica funciones relacionadas con la formación de tejidos, y por ende con la condición fisiológica del individuo (Bulow 1987, Clemmense 1988, Canino 1994).

El objetivo de este trabajo es evaluar la condición fisiológica del híbrido de cachama, *C. macropomum* y de morocoto *P. brachypomus*, en sus primeras fases de vida usando la relación ARN/ADN como índice de condición fisiológica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una reproducción inducida a una pareja de reproductores de cachama *Colossoma macropomum* y se utilizó un macho de morocoto, *Piaractus brachypomus*, para la obtención de híbridos en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Tucupita, Estado Delta Amacuro. En el período de incubación se tomaron las muestras para la cuantificación de los ácidos nucleicos durante todo el desarrollo embrionario hasta que las larvas reabsorbieran el saco vitelino, preservándolos con nitrógeno líquido en viales de polipropileno de 1.5 ml para su posterior análisis en el laborato-

rio. Así mismo, se registraron parámetros físico-químicos de temperatura, pH y oxígeno disuelto durante todo el proceso de incubación. Para la determinación de los ácidos nucleicos se usó la técnica fluorométrica descrita por Canino & Calderone (1995).

Tanto para el híbrido como la cachama, los datos fueron agrupados de acuerdo a las siguientes tres fases: A = desde la segmentación hasta la gastrulación, B = organogénesis y C = larvas (a partir de la eclosión de los huevos hasta la reabsorción del saco vitelino por parte de las larvas). Por la naturaleza de los datos el ADN fue transformado (1/concentración de ADN) para realizar un análisis de varianza de dos vías con repetición según Sokal & Rohlf (1997), para establecer las posibles diferencias de las concentraciones promedios de los ácidos nucleicos y del índice ARN/ADN entre las fases y las especies estudiadas.

## RESULTADOS

El proceso del desarrollo embrionario del híbrido cachama - morocoto se realizó en 12 horas y 20 minutos a partir de la fertilización, entre 28 y 30°C. El oxígeno disuelto se registró permanentemente manteniéndose a una concentración entre 6.0 y 6.5 ppm y el pH permaneció constante con un valor de 7.5 (Cuadro 1).

CUADRO 1

*Los valores de la temperatura, oxígeno y pH en el proceso de incubación de los huevos en el desarrollo embrionario del híbrido, cachama (Colossoma macropomum) – morocoto (Piaractus brachypomus)*

Tiempo (hr)	Temperatura (°C)	Oxígeno (ppm)	PH
1	28	6.0	7.5
2	30	6.0	7.5
5	30	6.5	7.5
8	29	6.5	7.5
10	30	6.5	7.5
12	29	6.5	7.5
Rango	28 – 30	6.0 – 6.5	7.5

CUADRO 2

Valores promedios (\*g estadio embrionario<sup>-1</sup> ± SD) del contenido de los ácidos nucleicos y la relación ARN/ADN de las diferentes fases del desarrollo embrionario del híbrido, cachama (*Colossoma macropomum*) – morocoto (*Piaractus brachypomus*)

Etapas	N	ARN	ADN	ARN/ADN
A	62	4.971 ± 0.131	1.559 ± 0.059	3.534 ± 0.125
B	23	5.606 ± 0.216	1.380 ± 0.098	4.309 ± 0.205
C	31	5.478 ± 0.186	1.434 ± 0.084	3.890 ± 0.176
Promedio		5.352 ± 0.103	1.464 ± 0.097	3.911 ± 0.099

N = Número de análisis; A = Segmentación y Gastrulación; B = Organogénesis; C = Larvas.

CUADRO 3

Valores promedios (\*g estadio embrionario<sup>-1</sup> ± SD) del contenido de los ácidos nucleicos y la relación ARN/ADN de las diferentes fases del desarrollo embrionario de la cachama (*Colossoma macropomum*)

Etapas	N	ARN	ADN	ARN/ADN
A	55	3.002 ± 0.139	1.737 ± 0.063	1.864 ± 0.132
B	50	5.032 ± 0.146	2.056 ± 0.066	2.473 ± 0.139
C	23	4.591 ± 0.207	0.996 ± 0.094	4.473 ± 0.196
Promedio		4.208 ± 0.097	1.596 ± 0.047	3.004 ± 0.091

N = Número de análisis; A = Segmentación y Gastrulación; B = Organogénesis; C = Larvas.

Las concentraciones promedios de ARN, ADN y la relación ARN/ADN de las primeras etapas de vida del híbrido se representan en el Cuadro 2. Se observó que los valores de ARN obtenidos para el híbrido en las fases estudiadas son superiores en relación con los obtenidos para el ADN, lo cual confirma que existe una mayor síntesis de proteínas.

En lo que respecta a la relación ARN/ADN, los valores obtenidos demuestran que existe una buena condición fisiológica para el híbrido en las distintas fases del desarrollo embrionario.

Por otra parte, las concentraciones promedios de ARN, ADN y la relación ARN/ADN de los primeros estadios de vida de la cachama (*C. macropomum*) están representadas en el Cuadro 3. Las concentraciones promedios de ARN obtenidas también son superiores en relación con las concentraciones obtenidas para

el ADN en esta especie, confirmándose la síntesis de proteínas.

En la cachama, *C. macropomum*, la relación ARN/ADN, presentó un incremento continuo de dicho índice a medida que transcurre el ciclo de vida de esta especie, determinándose un valor promedio total del índice ARN/ADN de  $3.004 \pm 0.091$ , lo que indica que esta especie presenta también una buena condición fisiológica. Al comparar los resultados obtenidos de ARN, ADN y el índice ARN/ADN, tanto para el híbrido como para la cachama, en las fases de vida y entre ellos, se observó que existieron diferencias altamente significativas para las fases estudiadas y entre las especies, tanto para el ARN y la relación ARN/ADN, mientras que no se observó diferencias significativas en las especies para el ADN. Además, se observa que en los híbridos el ARN y la relación

ARN/ADN es mayor que en la cachama y respecto al ADN es similar tanto para el híbrido como la cachama (Cuadro 4).

### DISCUSIÓN

Las variaciones de la temperatura, pH y oxígeno disuelto registradas durante todo el desarrollo embrionario, estuvieron dentro de los límites tolerables, indicados para el cultivo de estas especies en aguas cálidas (González & Heredia 1989). Hay que señalar que los factores ambientales actúan sobre el desarrollo embrionario, al respecto Blaxter (1969) afirma que el tiempo de incubación está determinado principalmente por la temperatura y el oxígeno. El oxígeno insuficiente retarda el desarrollo de los huevos y si es escaso, estos mueren.

Al comparar los resultados obtenidos de ARN, ADN y el índice ARN/ADN, tanto para el híbrido como para la cachama, en las diferentes fases de vida y entre ellos, se observó que en las primeras etapas de vida se encontró que el contenido de ARN fue superior para el híbrido que en la cachama. Esta variación del ARN pudiese estar reflejada a la actividad metabólica asociada con la síntesis proteica, desde la primera división celular, que comienza a transformarse el huevo, hasta la eclosión de las larvas. Además, cuando las larvas están reabsorbiendo el saco vitelino, se ob-

servó una pequeña disminución de la concentración de ARN (Fase C), posiblemente, esto se deba al agotamiento progresivo del alimento endógeno proporcionado por el saco vitelino. Al parecer, las larvas pasan de un estado de alimentación endógena hacia un alimento exógeno a partir de las 72 horas después de la eclosión (Contreras & Contreras 1993), es quizás, por esto, que el contenido de ARN disminuyó para esta fase. Por otra parte, las larvas están aptas para procurarse su alimento por sí misma (microplancton) y en este período, también ocurren muertes por inanición, debido a que las larvas son poco eficientes para conseguir el alimento, ocurriendo así altas mortalidades. Esto ha sido comprobado por Buckley (1984) con varias especies de larvas de peces (*Paralichthys dentatus*, *Pseudopleuronectes americanus*, *Gadus morhua*, *Morone saxatilis*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Serombrus scrombrus*) y por Robinson & Ware (1988) con la sardina (*Clupea herengus pallasii*).

En relación con el ADN, al no conseguirse diferencias significativas en cuanto al híbrido y la cachama, se evidencia así que el contenido de ADN es un factor biológico estable indicador del número de células o actividad mitótica.

En cuanto a la relación ARN/ADN el híbrido presentó mejor condición fisiológica; quizás esto se deba a que éstos son más eficientes para canalizar y utilizar mejor la energía suministrada por el vitelo. Estas diferencias pueden ser el resultado de la condición conocida como vigor híbrido o heterosis, debido a que, en los híbridos a menudo es mayor que el de los padres. Se piensa que la ventaja de los heterocigotos, provienen de alelos recesivos no expresados y de la habilidad de producir proge- nie de constitución genética variada, esta superioridad puede expresarse en algunos caracteres cuantitativos, tales como crecimiento, fertilidad y supervivencia (Pérez 1996); presentándose que el crecimiento fue más rápido que el de la cachama y por lo tanto la actividad metabólica debe ser mayor. Por consiguiente, debido a que las necesidades fisiológicas involucradas en el crecimiento durante los primeros estadios de desarrollo requieren de una mayor velocidad de biosíntesis de ARN, se explicarían los mayores niveles obtenidos en este organismo.

CUADRO 4

Valores de Fisher obtenidos del análisis de varianza doble para las concentraciones promedios de ARN, ADN y la relación ARN/ADN para cada uno de los factores

Variabes	Factor	Valor de F	Grupos
ARN	Fases	40.491**	A < B = C
	Especie	64.467**	Cachama < Híbrido
ADN	Fases	26.898**	A = B < C
	Especie	0.119Ns	Cachama = Híbrido
ARN/ADN	Fases	49.732**	A < B < C
	Especie	45.268**	Cachama < Híbrido

Ns = No significativo. \*\* = Significancia al nivel de 1%. N = Número de análisis; A = Segmentación y Gastrulación; B = Organogénesis; C = Larvas.

Bulow (1987) propuso que la relación ARN/ADN para una especie de peces, por ejemplo, en *Notemigonus crysoleucas*, un valor promedio menor o cercano de 2.0 indica que estos peces no presentan una buena condición nutricional, presentando así una pérdida de peso, pero con un valor promedio mayores o cercano a 4.0 puede indicar un rápido crecimiento. Por otra parte, Richard *et al.* (1991) encontró una relación ARN/ADN baja alrededor de 2 durante el desarrollo ontogenético en las larvas cultivadas de *Solea solea*. Clemmesen (1987) consiguió una relación baja de ARN/ADN alrededor de 2.4 en las larvas de *Clupea harengus* y *Scophthalmus maximus*, pero en otros trabajos esta relación ha sido reportada con valores más altos entre 3 y 4 (Buckley 1984, Buckley *et al.* 1984, Wright & Martin 1985). La relación ARN/ADN en larvas cultivadas es generalmente más baja que en las larvas capturadas en los medios naturales con valores que oscilan entre 6 a 8, razón por la cual, esta relación ha sido ampliamente usada por muchos autores como un índice nutricional (Buckley 1984, Robinson y Ware 1988). Raae *et al.* (1988) obtuvo valores promedios para la relación ARN/ADN de 4.5 en larvas de *Gadus morhua* alimentadas en tanques y valores entre 6 a 13 en larvas alimentadas con plancton natural en lagunas de tierra. De acuerdo al promedio obtenido ( $3.911 \pm 0.09$ ) en la relación ARN/ADN en las primeras fases de vida del híbrido cachama-morocoto indica que el híbrido presentó una buena condición fisiológica, confirmando lo dicho por varios autores que esta relación puede ser usada como un índice para chequeos rutinarios en acuicultura.

#### RESUMEN

Se evaluó la relación ARN/ADN como índice de condición fisiológica durante el desarrollo embrionario del híbrido proveniente del cruce de los peces cachama (*Colossoma macropomum*) y morocoto (*Piaractus brachyomus*). Las muestras fueron obtenidas mediante la técnica de reproducción inducida y los huevos fueron mantenidos en incubadoras cónicas de acrílico con flujo de agua continuo. Todo el proceso de desarrollo embrionario,

desde la fertilización hasta la eclosión, se realizó en 12 horas y 20 minutos a 29.5°C, con una concentración mínima de oxígeno de 6.0 ppm y un pH de 7.5 que permaneció constante durante todo el proceso. La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó por el método fluorométrico con bromuro de etidio y bisbenzimidazol (Hoechst 33258). Se evidenciaron cambios significativos en la relación ARN/ADN durante las etapas de desarrollo evaluadas en el presente trabajo. Por consiguiente, la relación ARN/ADN es una técnica útil para evaluar la condición fisiológica a corto plazo y puede ser utilizada como condición nutricional y/o crecimiento instantáneo para chequeos rutinarios para verificar el estado de salud en los primeros estadios de vida de especies cultivadas.

#### AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada parcialmente por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente (CI-5-1803-0791/97), el postgrado de Ciencias Marinas del Instituto Oceanográfico de Venezuela y por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - Estación Experimental Delta Amacuro.

#### REFERENCIAS

- Blaxter, J. 1969. Development, eggs and larvae, p. 177-252. In W.S. Hoar & D.J. Randall (eds.). Fish Physiology, Vol III, Nueva York.
- Bracho, M.A., M.I. Segnini de B., I. Viñoles & K.S. Chung. 2000. Efecto de la alimentación sobre la condición fisiológica del mejillón verde *Perna viridis* (L. 1758) (Mollusca: Mytilidae), medido por la relación ARN/ADN. Rev. Biol. Trop. 48. Supl. 1: 171-182.
- Buckley, L. 1984. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. Mar. Biol. 80: 291-298.
- Buckley, L., S. Turner, T. Halavik, A. Smigielski, S. Drew & G. Laurence. 1984. Effects of temperature and food availability on growth, survival, and RNA/DNA ratio of larval sand lance (*Ammodytes americanus*). Mar. Ecol. Prog. Ser. 15: 91-97.
- Bulow, F. 1987. RNA-ADN ratios as indicators of growth in fish: A review, p. 45-64 In R.C. Summerfelt & G.E. Hall (eds.). The Age and Growth of Fish. Iowa State University, Iowa.

- Canino, M. 1994. Effects of temperature and food availability on walleye pollock, *Theragra chalcogramma* (Pallas) eggs and larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 175: 1-16.
- Canino, M. & E. Calderone. 1995. Modification and comparison of two fluorometric techniques for determining nucleic acid contents of fish larvae. *Fish. Bull.* 93: 158-165.
- Chung, K., G. Holt & C. Arnold. 1993. Influence of salinity and food deprivation on growth and RNA-DNA ratio in red drum *Sciaenops ocellatus* (Pisces: Sciaenidae). *Rev. Biol. Trop.* 41: 187-195.
- Clemmensen, C. 1987. Laboratory studies on RNA/DNA ratios of starved and fed herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 43: 122-128.
- Clemmensen, C. 1988. A RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. *Meeresforsch.* 32: 134-143.
- Contreras, P. & J. Contreras. 1993. Reproducción inducida de peces tropicales, p. 125-138. In H. Rodríguez, G. Polo & G. Salazar (eds.). *Fundamentos de Acuicultura Continental*. Ministerio de Agricultura – Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, INPA, Santafé de Bogotá, Colombia.
- Díaz, G., F. & R. López. 1993. El cultivo de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y de la cachama negra (*Colossoma macropomum*), p. 207-219. In H. Rodríguez, G. Polo & G. Salazar (eds.). *Fundamentos de Acuicultura Continental*. Ministerio de Agricultura – Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, INPA, Santafé de Bogotá, Colombia.
- González, J. & B. Heredia, 1989. El cultivo de la cachama (*Colossoma macropomum*), Maracay, Venezuela. FONAIAP, Est. Exp. Guárico, Sub-Estación Guanapito. 124 p.
- Kossowski, C., N. Ottolina & J. Quero. 1983. Cariotipo del híbrido de "cachama" *Colossoma macropomum* (hembra) (Cuvier) 1818 x "Palometa" *Mylossoma duriventris* (macho) (Cuvier) 1818 y sus progenitores (Pises, Cypriniformes, Characidae). *Acta Cient. Venezuela.* 34: 173-175.
- Lemus, M., K. Chung & G. Holt. 1993. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de juveniles de *Petenia kraussii* (Pisces: Cichlidae): Relación ARN-ADN. *Rev. Biol. Trop.* 41: 45-48.
- Pérez, J. 1996. Mejoramiento genético en acuicultura. Coordinación de Publicaciones del Rectorado de la Universidad de Oriente, Cumaná, Estado Sucre, Venezuela. 178 p.
- Raae, A., I. Opstad, P. Kvenseth & B. Walther. 1988. RNA, DNA and protein during early development in feeding and starved cod (*Gadus morthua* L.) larvae. *Aquacul.* 73: 247-259.
- Richard, P., J. Bergerson, M. Boulhic, R. Galois & J. Leruyet. 1991. Effect of starvation on RNA-DNA and protein content of laboratory-reared larvae and juveniles of *Solea solea*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 72: 69-77.
- Robinson, S. & D. Ware. 1988. Ontogenetic development of growth rates in larval Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*, measured with RNA-DNA ratios in the Strait of Georgia, British Columbia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 1422-1429.
- Segnini de B., M. & 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. Venezuela* 36: 21-29.
- Segnini de B., M.I. & K.S. Chung. 2001. Ecophysiological behavior *Caquetaia kraussii* (Steinachner, 1878) (Pisces: Cichlidae) exposed to different temperatures and salinities. *Rev. Biol. Trop.* 49: 147-154.
- Sokal, R. & J. Rohlf. 1997. *Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. W. H. Freeman, Nueva York. 887 p.
- Viñoles, I.V., M.I. Segnini de B., M.A. Bracho & K.S. Chung. 2000. Efecto de la temperatura de aclimatación sobre el crecimiento instantáneo del mejillón verde, *Perna viridis* (L. 1758) (Mollusca: Mytilidae), medido por la relación ARN/ADN. *Rev. Biol. Trop.* 48 (Supl. 1): 159-170.
- Wright, D & F. Martín. 1985. The effect of starvation on RNA:DNA ratios and growth of larval striped bass *Morone saxatilis*. *J. Fish Biol.* 27: 479-485.