

ORNAMENTACION DEL CORION EN LOS HUEVOS DE ESPECIES DE *AUSTROLEBIAS* Y *SYMPSONICHTHYS* (RIVULIDAE: CYNOLEBIATINAE)

Marcelo LOUREIRO⁽¹⁾ y Rafael O. de SÁ⁽²⁾

RESUMEN: En el presente trabajo se estudió la ornamentación de la superficie coriónica de los huevos de cuatro especies del género *Austrolebias* (*A. alexandri*, *A. bellottii*, *A. nigripinnis* y *A. viarius*) y dos especies del género *Symptsonichthys* (*S. bokermanni* y *S. notatus*) utilizando Microscopía Electrónica de Barrido. Las mismas presentaron características coriónicas similares excepto *S. bokermanni*, la cual no presentó las prolongaciones piliformes ni la superficie rugosa encontradas en el resto, por el contrario, esta última especie presentó una superficie lisa con estructuras semiesféricas y en menos densidad estructuras anulares. Estas características son similares a las encontradas anteriormente en *Nematolebias myersi*. Las restantes especies presentaron diferencias entre sí, tanto en densidad, grosor y longitud de sus prolongaciones piliformes, así como en la superficie del corion. La ornamentación del corion de los huevos de Cynolebiatinae puede ser usada como carácter diagnóstico específico y en algunos casos podría ser útil en establecer relaciones de ancestralidad.

ABSTRACT: The external characteristics of the chorion of the eggs from four species of *Austrolebias* (*A. alexandri*, *A. bellottii*, *A. nigripinnis* and *A. viarius*) and two species of *Symptsonichthys* (*S. bokermanni* and *S. notatus*) were studied. All species presented similar chorionic characteristics with the exception of *S. bokermanni* which did not present the hair-like projections nor the folded surface found in the rest. *S. bokermanni* presented a smooth surface with rounded structures and less abundant ring structures. These characteristics are similar to those found previously in *Nematolebias myersi*. The remaining species presented differences among each other in density, thickness and length of the hair-like projections as well as in the chorionic surface. The chorionic characteristics of the eggs of Cynolebiatinae can be used as a specific diagnostic character and in some cases could be useful in phylogenetic analyses.

Palabras claves: Cynolebiatinae, corion, ornamentación, caracteres diagnósticos

Key words: Cynolebiatinae, chorion, external characteristics, diagnostic character

INTRODUCCIÓN

Las especies de peces de la subfamilia Cynolebiatinae habitan los cuerpos de agua temporales de la región oriental de Sudamérica. La característica más destacable de estos peces, así como también de otros miembros de la familia Rivulidae, es la de presentar un ciclo de vida anual. El hecho de poseer huevos con resistencia a los períodos de sequía y de embriones con estadios de diapausa (Wourms, 1972), permite a estos peces mantener la viabilidad poblacional a través de las generaciones, a pesar de secarse los charcos que habitan.

Las características del corion en los teleósteos han sido usadas previamente en estudios sistemáticos (Riehl y Kokoscha, 1993), en análisis filogenéticos (Costa, 1990) y en la diferenciación de poblaciones geográficamente cercanas (Morin y Able, 1983).

(1) Sección Vertebrados, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Iguá 4224 Montevideo 11400 Uruguay. E-mail: mapy@fcien.edu.uy

(2) Department of Biology, University of Richmond. Richmond VA 23173, USA.
E-mail: rdesa@richmond.edu

Las características del corion en los teleósteos han sido usadas previamente en estudios sistemáticos (Riehl y Kokoscha, 1993), en análisis filogenéticos (Costa, 1990) y en la diferenciación de poblaciones geográficamente cercanas (Morin y Able, 1983).

De acuerdo a Costa (1990), la mayoría de especies de Rivulidae posee huevos cubiertos de filamentos piliformes. Carvalho (1957), usando microscopía óptica, encontró que en *Nematolebias whitei* la superficie de los huevos está constituida por proyecciones de tamaño alternativamente diferente y distribuidas de forma regular. Müller y Sterba (1963) observaron con microscopía de barrido, que el corion de *Austrolebias bellottii* (Steindachner) posee proyecciones piliformes, como la mayoría de los Rivulidae. También utilizando microscopía electrónica de barrido, Loureiro y de Sá (1996) observaron la superficie del corion de 13 especies de hasta ese momento *Cynolebias* (sensu Costa, 1995), y que en la actualidad corresponden a *Austrolebias*, *Megalebias*, *Nematolebias* y *Symptonichthys* (Costa, 1996, 1998). La mayoría de las 13 especies analizadas presentaron una superficie finamente granulada, con proyecciones piliformes divididas en dos segmentos mas o menos diferenciados, segmento basal y segmento distal (Loureiro y de Sá, 1996).

El objetivo de este trabajo es describir y comparar la ornamentación del corion de los huevos de cuatro especies adicionales de *Austrolebias* y dos especies de *Symptonichthys*, usando microscopía electrónica de barrido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los huevos de las especies utilizadas en este trabajo fueron obtenidos en el mercado de acuaristas. Las especies observadas fueron: *Austrolebias alexandri* (Castello y López), *A. bellottii*, *A. nigripinnis* (Regan), *A. viarius* (Vaz-Ferreira *et al.*), *Symptonichthys bokermanni* y *S. notatus* (Costa *et al.*). Para cada especie se procesó un solo huevo dada la poca disponibilidad de los mismos. Los huevos se prepararon usando técnicas standard para microscopía de barrido. Los huevos fueron limpiados usando ultrasonido durante 15 minutos; luego fueron fijados en una solución de glutaraldeído al 3-4% a temperatura ambiente, seguido de tres lavados de 15 minutos con buffer fosfato 0.1M. Seguidamente, los huevos fueron post-fijados en una solución de tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente y luego lavados nuevamente en tres baños de 15 minutos con buffer fosfato. Los huevos fueron deshidratados en baños de 15 minutos con soluciones de etanol de las siguientes concentraciones: 35%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%. Para la última concentración se realizaron tres baños. Los especímenes fueron secados utilizando el secado de punto crítico en CO₂ líquido y montados en placas de aluminio y cubiertos con una mezcla de oro/paladio, de 22 nanómetros de espesor, utilizando un sistema Hummer VII. Los huevos fueron examinados utilizando un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-2300 a 15 kv. y fotografiados usando película positiva/negativa Polaroid 55. El grosor de las protuberancias piliformes fue medido en la base del segmento distal, la longitud de los mismos fue medida poniéndolos perpendiculares al haz de electrones. Las medidas fueron tomadas en un huevo por especie y en 10 protuberancias por huevo.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se resumen las características del corion para cada especie.

Tabla 1. Resumen de las características de la ornamentación en las especies analizadas. Proyecciones piliformes (N = 10)

Especies	Longitud (x/sd) (μm)	Grosor (x/sd) (μm)	Densidad/50 μm^2	Segmento basal
<i>Austrolebias alexandri</i>	30.0/8.2	1.1/0.3	25	Diferenciado y circular
<i>A. bellottii</i>	15.5/1.13	< 1	50	Indiferenciado
<i>A. nigripinnis</i>	40.1/5-09	1.2/0.22	50	Indiferenciado
<i>A. viarius</i>	?	1.5/0.18	75	Diferenciado y circular
<i>Symptonichthys notatus</i>	7.2/0.26	1.1/0.18	50	Indiferenciado
<i>S. bokermanni</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Austrolebias alexandri (Fig. 1A) presentó un corion con una superficie finamente escamada. En el centro de cada una de estas "escamas" se observó una pequeña estructura vermiforme en forma de pelo pequeño de menos de 1 μm de largo, cubriendo toda la superficie del huevo. Menos densamente distribuidas se encontraron estructuras piliformes ("pelos"), (aprox. 25/50 μm^2) con una longitud y grosor promedio de 30 μm y 1 μm , respectivamente. En esta especie los "pelos" presentaron un segmento basal diferenciado con forma anular. El corion de *A. bellottii* (Fig. 1B) presentó una superficie granulada, y en el centro de cada gránulo se encontró un pequeño poro. También en esta especie se encontraron "pelos", en este caso con una densidad de 50/50 μm^2 . La porción basal de estas estructuras se encontró prácticamente indiferenciada de la porción distal. Los "pelos" presentaron un largo promedio de 15 μm y un grosor menor a 1 μm . En *A. nigripinnis* (Fig. 1C) el corion es granulada, con presencia de poros similares a *A. bellottii*, y "pelos" con una densidad de 50/50 μm^2 . En esta especie la longitud de las prolongaciones piliformes fue como promedio 40 μm y con un grosor promedio de 1 μm . Los segmentos basales están indiferenciados. En *A. viarius* (Fig. 1D) el corion presentó una superficie granulada, con "pelos" a una densidad de 75/50 μm^2 . El grosor promedio fue de 1,5 μm , mientras que la longitud no fue cuantificable debido a que los mismos se encontraron formando una red en la que fue imposible individualizar cada uno de los mismos. El segmento basal está diferenciado y es de forma anular. *Symptonichthys notatus* (Fig. 1F) presentó una superficie coriónica con pequeñas estructuras superpuestas, con forma irregular y con "pelos" cortos (7 μm de largo promedio). El grosor de los mismos fue de 1 μm y su densidad fue de 50/50 μm^2 . En esta especie el segmento basal está indiferenciado. En *S. bokermanni* (Fig. 1G) la superficie del corion se presentó mas o menos lisa y en lugar de estructuras piliformes se encontraron estructuras semi-esféricas con una densidad de 25/50 μm^2 . Estas estructuras presentaron un diámetro promedio de 5 μm . Menos densamente distribuidas y ubicadas entre 4 ó 5 estructuras semiesféricas se encontraron estructuras anulares de diámetro similar a las anteriores.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las especies analizadas en este trabajo presentaron características coriónicas similares excepto *Symponichthys bokermanni*, la cual no presentó las prolongaciones piliformes ni la superficie rugosa encontradas en el resto de las especies. Por el contrario, *S. bokermanni* presentó una superficie lisa con estructuras semiesféricas y en menos densidad estructuras anulares. Las restantes especies, no obstante, presentaron diferencias entre sí, tanto en densidad, grosor y longitud de sus prolongaciones piliformes (Tabla 1), así como en la superficie del corion.

Austrolebias alexandri fue la única en presentar pequeñas estructuras piliformes distribuidas entre los "pelos" presentes en la mayoría de las especies. También esta especie fue la que presentó menos densidad de los mismos. *Austrolebias viarius* fue la especie en que los "pelos" se encontraron en mayor densidad así como también la única especie con diferenciación clara entre los segmentos basales y distales. Las especies más similares fueron *A. bellottii* y *A. nigripinnis*, las cuales sólo se diferenciaron en el largo de sus "pelos". *Symponichthys notatus* fue la especie que presentó "pelos" más cortos y superficie coriónica más irregular.

Las características del corion observadas en *Symponichthys bokermanni* son muy similares a las observadas en *Nematolebias myersi* (Loureiro y de Sá, 1996) y únicas entre todas las demás Cynolebiatinae observadas. Este hecho apoya la hipótesis de relación más cercana entre ambas que la planteada por Costa (1998).

Las especies de *Austrolebias* analizadas en este trabajo presentaron características generales similares a las de *A. affinis* (Amato), *A. cyaenus* (Amato), *A. adloffii* (Ahl) y *A. sp* (Loureiro y de Sá, 1996).

El presente estudio apoya la idea de Wourms (1976) y Loureiro y de Sá (1996) de que las características de la ornamentación del corion de Cynolebiatinae son especie-específicas, y tienen utilidad en la diagnosis de las especies. No obstante, es necesario un análisis más detallado de la variación individual de dichos caracteres así como también de la influencia de factores ambientales sobre los mismos.

La utilidad de las características de la ornamentación de los huevos como caracteres filogenéticos requiere el análisis de más especies de la subfamilia Cynolebiatinae así como también de otros géneros relacionados (aparte del ya estudiado *Cynopoecilus*) para poder establecer relaciones de ancestralidad.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Gary Radice por su colaboración con las fotografías del Microscopio de Barrido. Este estudio fue financiado en parte, por Graduate School, University of Richmond a través de una beca otorgada a Marcelo Loureiro. La participación de Rafael O. de Sá fue apoyada por Faculty Research Committee, UR. El trabajo fue realizado bajo UR Institutional Animal Care y Use Committee permit N° 95-1.

BIBLIOGRAFIA

- CARVALHO, A.L. de, 1957. Notas para o conhecimento da biologia dos peixes anuais. *Rev. Bras. Biol.*, 17 (4): 459-466.
- COSTA, W.J.E.M., 1990. Análise filogenética da família Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei). *Rev. Bras. Biol.*, 50 (1): 65-82.
- COSTA, W.J.E.M., 1995. Pearl Killifishes. The Cynolebiatinae. Systematics and biogeography of a neotropical annual fish subfamily (Cyprinodontiformes: Rivulidae). T.F.H. Publications, Neptune City. 128 p.
- COSTA, W.J.E.M., 1996. Phylogenetic and biogeographic analysis of the neotropical annual fish genus *Simpsonichthys* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *J. Comp. Biol.*, 1: 129-140.
- COSTA, W.J.E.M., 1998. Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: Origin and evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). *J. Comp. Biol.*, 3 (1): 33-94.
- LOUREIRO, M. and R.O. de SÁ, 1996. External morphology of the Chorion of the annual fishes *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia*, 4: 1016-1022.
- MORIN, R.P. and K.W. ABLE, 1983. Patterns of geographic variation in the egg morphology of the fundulid fish, *Fundulus heteroclitus*. *Copeia*, 3: 726-740.
- MÜLLER, H. and G. STERBA, 1963. Elektronenmikroskopische untersuchungen über bildung und struktur der eihüllen bei knochenfischen II. Die eihüllen jungerer und alterer oocyten von *Cynolebias bellottii* Steindachner (Cyprinodontidae). *Zool. Jb., Abt. Anat. u. Ontog.*, 80: 469-488.
- RIEHL, R. and M. KOKOSCHA, 1993. A unique pattern and micropylar apparatus in the eggs of *Luciocephalus* sp. (Perciformes; Luciocephalidae). *Journal of Fish Biology*, 43 (4): 617-620.
- WOURMS, J.P., 1972. The developmental biology of annual fishes. III pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *J. Exp. Zool.*, 182: 389-414.
- WOURMS, J.P. 1976. Annual fish oogenesis. I. Differentiation of the mature oocyte and formation of the primary envelope. *Dev. Biol.*, 50: 338-354.

Recibido/Received/: May-00
Aceptado/Accepted/: Dic-00

Leyenda de figura

Fig. 1: Superficie del corion de las especies estudiadas. **A.** *Austrolebias alexandri*, **B** *Austrolebias bellottii*, **C.** *Austrolebias nigripinnis*, **D.** *Austrolebias viarius*, **E.** *Symponichthys notatus*, **F** *Symponichthys bokermanni*. Símbolos: flecha pequeña, estructura anular de *S. bokermanni*; flecha grande, estructura semiesférica de *S. bokermanni*.

