

RESULTADOS PRELIMINARES DE INDUCCION DE GENOMAS TRIPLOIDES EN TRUCHA ARCOIRIS, *ONCORHYNCHUS MYKISS* (WALBAUM) (OSTEICHTHYES, SALMONIDAE)

PRELIMINARY RESULTS ON THE TRIPLOID GENOME INDUCTION IN RAINBOW TROUT, *ONCORHYNCHUS MYKISS* (WALBAUM) (OSTEICHTHYES, SALMONIDAE)

*Patricia Iturra**, *Alberto Veloso***, *Nelson Díaz***, *Nelson Colihueque*** y *Francisco Estay***.

RESUMEN

En este trabajo se establecen las condiciones experimentales que permiten la obtención de ejemplares triploides en trucha arcoiris y los métodos citogenéticos para su diagnóstico. La aplicación de un choque térmico de 26.5°C. 20 min. después de la fecundación dio como resultado un 79.09% de ejemplares triploides con una sobrevida de un 95% al "estado de ojos". La obtención de placas metafásicas en embriones en el estado de pre-ojos se sugiere como método más adecuado para el diagnóstico citogenético.

Palabras claves: Triploidía, citogenética, trucha arcoiris.

ABSTRACT

In this paper we establish the experimental procedures to obtain triploidy in rainbow trout, together with the cytogenetics methods to demonstrate success in triploidy genome induction. The best results were obtained by thermal shock at 26.5°C. 20 min. from fertilization. The best success was estimated as 79.09% of triploid embryos which show a 95% of survival at "eyes stage". Metaphase plates from embryos at pre "eyes stage" can be considered the best method to ascertain ploidy diagnosis.

Key words: Triploidy, cytogenetics, rainbow trout.

INTRODUCCION

La piscicultura de *Oncorhynchus mykiss* se desarrolla en Chile a partir de huevos que se importan en su mayor parte desde el hemisferio Norte. La producción de huevos en los plantales piscícolas nacionales corresponde a alrededor de un 20% de las importaciones sin que se realice manejo genético de los reproductores utilizados.

Durante los últimos años, junto al manejo genético tradicional en peces salmonídeos se han incorporado otros métodos que incluyen la manipulación del proceso reproductivo y del genoma, como por ejemplo, la inducción de triploidía. El

interés principal de aplicar estos métodos es controlar la maduración sexual, produciendo hembras estériles y machos, que si bien presentan desarrollo de la gónada, producen gametos infértiles, (Chourrou, 1988). De esta manera, se evita o disminuye el efecto negativo que la maduración sexual tiene para la producción piscícola, lo cual se traduce en la reducción del crecimiento del pez, una menor sobrevida y alteración en la calidad comercial de la carne. La siembra de peces triploides estériles, en lagos y ríos con fines deportivos, permitiría además regular el tamaño de estas poblaciones, lo cual es importante para la conservación de ecosistemas naturales.

* Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Casilla 70061, Santiago, Chile.

** Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Casilla 567, Santiago, Chile.

Los ejemplares triploides se producen por el bloqueo de la segunda división meiótica o del proceso de expulsión del II polocito del huevo, una vez producida la fecundación. Diversos métodos químicos y físicos han sido ensayados, con distinto grado de éxito (Thorgaard *et al.*, 1981; Purdom, 1983).

En el presente trabajo damos a conocer los primeros resultados de la obtención en Chile de ejemplares triploides en cepas cultivadas de *Oncorhynchus mykiss* mediante el método físico de choque térmico. Así mismo, se describe la aplicación de distintos métodos citogenéticos en la evaluación y diagnóstico de las características cromosómicas de los embriones obtenidos.

MATERIALES Y METODOS

Los ejemplares reproductores de *Oncorhynchus mykiss* utilizados en los experimentos fueron obtenidos de la Piscicultura de la Sociedad Agrícola Macul Ltda. de la Región Metropolitana durante la época reproductiva de 1989.

Estos ejemplares fueron obtenidos a partir de huevos importados desde Estados Unidos de Norteamérica, y cultivados durante su primer año de vida en la Piscicultura de la Sociedad Agrícola Aguas Claras Ltda. en Malloco y luego trasladados a la Piscicultura de Macul.

Fecundación y choque térmico

Para la obtención de los gametos, los machos y las hembras fueron previamente anestesiados con MS222 (tricaine metanosulfonato) en concentración de 50 mg/l durante 3 min. aproximadamente.

Cada progenitor fue medido, pesado e identificado. Los huevos y el semen se obtuvieron mediante presión abdominal, recogiendo en recipientes plásticos diferentes. El diámetro y número de los huevos se determinó mediante el método de Von Bayer (Leitritz y Lewis, 1980). En cada experimento se utilizó un promedio de 3.000 huevos. La fecundación se realizó según el método seco, utilizando siempre machos cuyo semen presentaba una activa motilidad espermática al examen microscópico.

Los desoves de cada hembra fueron inseminados por machos individuales o con semen de

un conjunto de 3 ó 6 machos. Después de 5 min. los huevos fueron enjuagados y mantenidos en agua detenida para su activación e hidratación. El tiempo de hidratación varió entre 10 y 20 min. Posteriormente, los huevos depositados en canastillos plásticos por separado, fueron sumergidos en un baño termoregulado con recirculación de agua para recibir el choque térmico. Las temperaturas de choque aplicadas fueron $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ durante 1 a 2 min. (Thorgaard *et al.*, 1981) y $26.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (Velooso *et al.*, 1988) en tiempos que oscilan entre 10 y 20 min. En los huevos sometidos a un choque térmico de 37°C se determinó un alto porcentaje de embriones triploides, sin embargo, hubo una alta mortalidad en etapas tempranas del desarrollo, por lo cual en los experimentos posteriores sólo se utilizó 26.5°C . Posteriormente, los huevos se llevaron a un acuario termoregulado a 10°C en el laboratorio o a bateas de incubación en la piscicultura con temperaturas entre 7° y 11°C , dependiendo de la época del ensayo.

En cada caso se realizaron controles en los cuales no se aplicó el choque térmico.

En los primeros experimentos se determinó también el posible efecto del diluyente de semen de Billard (Na. Cl 5.52 g/l, glicina 3.74 g/l, TRIS 2.42 g/l). Posteriormente, en todos los experimentos se utilizó este activador de la motilidad espermática.

Una vez alcanzado el "estado de ojos" (pigmentación del ojo en los embriones) se procedió a someter a los embriones a un chorro de agua o "shocking". Se evaluó el porcentaje de sobrevivencia al "estado de ojos".

Diagnóstico citogenético de ploidías

a) obtención de placas metafásicas en embriones: el mejor rendimiento en número de placas metafásicas se obtuvo de embriones en la etapa de inicio de la organogénesis (pre "estado de ojos") incubados en colchicina 0.2% a 10°C durante 2 horas. El embrión se disecta y la hipotonía se realiza en agua destilada durante 30 min. y posteriormente se fija en ácido acético al 50%. Las preparaciones cromosómicas se tiñeron en forma directa con orceina acética al 1% o con Giemsa 4% pH 7.2 previo desprendimiento del cubreobjetos. Las placas metafásicas se fotografiaron en microscopio Optiphot Nikon con contraste de fases u óptica plana.

b) determinación de ADN nuclear (ADN/N) por citofluorometría: se utilizaron frotis de sangre obtenidos de alevines que recién han reabsorbido el saco vitelino. Los frotis se tiñeron con el método de Feulgen fluorescente (Northland *et al.*, 1990). Las mediciones del contenido de ADN/N en unidades arbitrarias se realizaron en un citofluorómetro Zeiss con la combinación de filtros BP546, FT580 y LP590. Las estimaciones de ADN/N (pg) en embriones controles y experimentales se hicieron en referencia a frotis de eritrocitos de *Xenopus laevis* cuya cantidad de ADN/N es de 6.18 pg/n (Olmo, 1973).

c) identificación del nucléolo: en células obtenidas por aplastado de tejidos de embriones se determinó el número máximo de nucléolos presentes en los núcleos interfásicos mediante técnicas de Ag (Quack y Noel, 1978; Rufas *et al.*, 1981).

RESULTADOS

El número cromosómico diploide de *O. mykiss* de Aguas Claras varía entre $2n = 58$ y $2n = 61$ (Velooso *et al.*, 1988). Las placas metafásicas con

alrededor de 90 cromosomas fueron consideradas triploides (Fig. 1).

Los resultados de los experimentos realizados se resumen en la Tabla 1.

En los grupos controles todos los embriones examinados fueron diploides.

En general se observa que en todos los experimentos se logró inducir la producción de embriones triploides mediante choque térmico después de la fecundación. Al observar los distintos tiempos de hidratación y duración del choque térmico se puede determinar que el mejor rendimiento en la obtención de embriones triploides fue con 20 min. y 15 min. respectivamente. Con estos tiempos se obtuvo un promedio de 79.09% de embriones triploides en 22 cruzamientos realizados. Con tiempos más cortos el porcentaje de éxito es menor (Tabla 1).

En los resultados obtenidos se observa una variación en la respuesta a la triploidia de las distintas hembras progenitoras, en cruzamientos realizados en condiciones similares (cruzamientos 6 al 22).

En algunos de los experimentos se observaron ejemplares haploides con alrededor de 30 cromosomas. Estos embriones presentan una gran

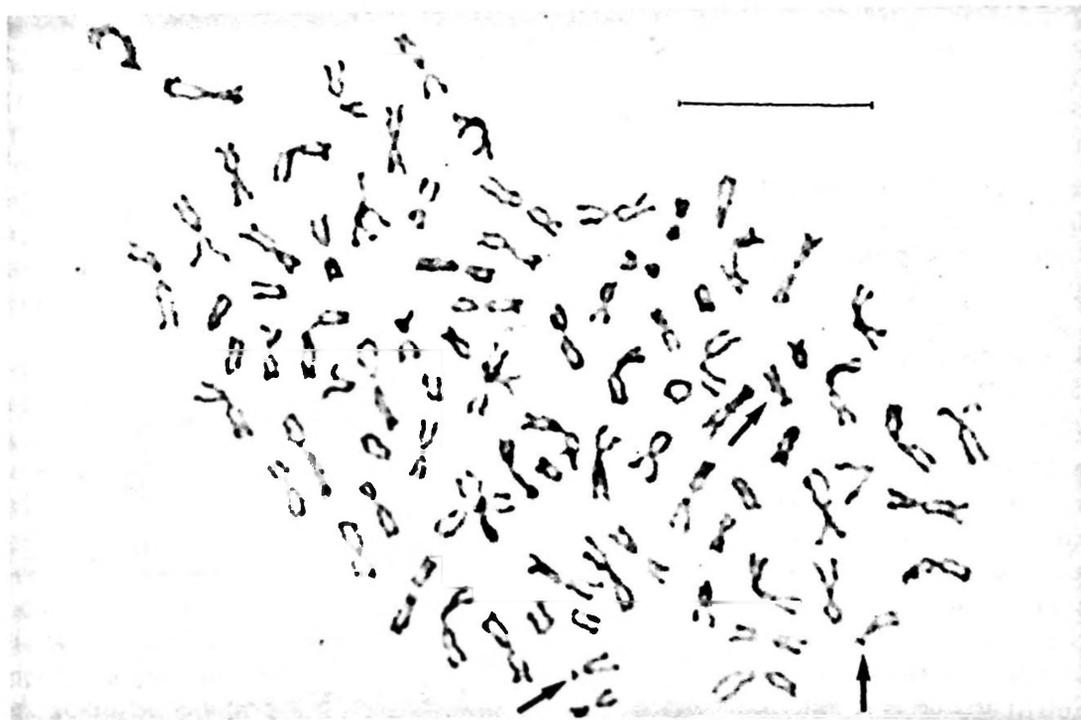


Figura 1. Placa metafásica de un embrión triploide de trucha arcoiris. Las flechas indican los cromosomas X. La barra corresponde a 10 μ m.

Tabla 1

Experimento Fecha	Cruzamientos			T ^h (min)	T ^c (min)	N	Nivel de Ploidia			% Triploidia
	♀	x	♂				n	2n	3n	
22/04	1-	5 x	65	10	10	47	—	37	10	21.1
11/05	2-	8 x	68	10	10	9	—	8	1	11.1
				10	15	10	—	8	2	20.2
	3-	42 x	68	10	15	31	11	19	1	3.2
08/06	4-	A x	Z	10	15	50	5	21	24	48.0
	5-	B x	Z	20	15	56	12	3	41	73.2
11/07	6-	D x pool 4		20	15	20	—	5	15	75.0
	7-	E x id		20	15	23	—	3	20	86.9
	8-	F x id		20	15	21	—	2	19	90.4
	9-	G x id		20	15	26	—	—	26	100.0
13/07	10-	H x pool 4		20	15	10	—	5	5	50.0
	11-	I x id		20	15	10	—	6	4	40.0
	12-	J x id		20	15	23	1	4	18	78.2
	13-	K x id		20	15	10	—	7	3	30.0
03/08	14-	L x pool 3		20	15	11	1	2	8	72.7
	15-	M x id		20	15	10	—	—	10	100.0
	16-	N x id		20	15	10	—	—	10	100.0
14/08	17-	O x pool 3		20	15	11	1	—	10	90.0
	18-	P x id		20	15	12	1	—	11	91.6
	19-	R x id		20	15	11	1	—	10	90.9
	20-	S x pool 3		20	15	10	—	1	9	90.0
	21-	T x id		20	15	10	—	2	8	80.0
	22-	U x id		20	15	10	—	1	9	90.0
22/08	23-	V x pool 6		20	15	11	—	—	11	100.0
	24-	W x id		20	15	11	—	—	11	100.0
	25-	X x id		20	15	10	—	—	10	100.0
	26-	Z x id		20	15	10	—	—	10	100.0

T^h = tiempo de hidratación

T^c = tiempo de choque térmico

N = n° de ovas diagnosticadas

Controles: En todos los controles se obtuvo 100% de ovas diploides

Tiempo de fecundación: 5 minutos

Temperatura de choque: 26.5°C

mortalidad y no alcanzaron etapas avanzadas del desarrollo. Del total de embriones examinados 3 de ellos presentaban características de mosaico haplo-diploide.

En los experimentos más exitosos se determinó el porcentaje de sobrevida al "estado de ojos". Esta es muy similar a los grupos controles y alcanza al 95%. (Fig. 2).

Las determinaciones de ADN/N realizadas muestran que en los ejemplares diploides el contenido es de 5.63 pg/N, en tanto que en los triploides es de 8.4 pg/N. De acuerdo a lo esperado, este último valor representa un 49.1% más de ADN/N.

El número máximo de nucléolos en el núcleo interfásico de embriones diploides es 2. En los triploides se observan hasta 3 nucléolos (Fig. 3). El número máximo de nucléolos está en

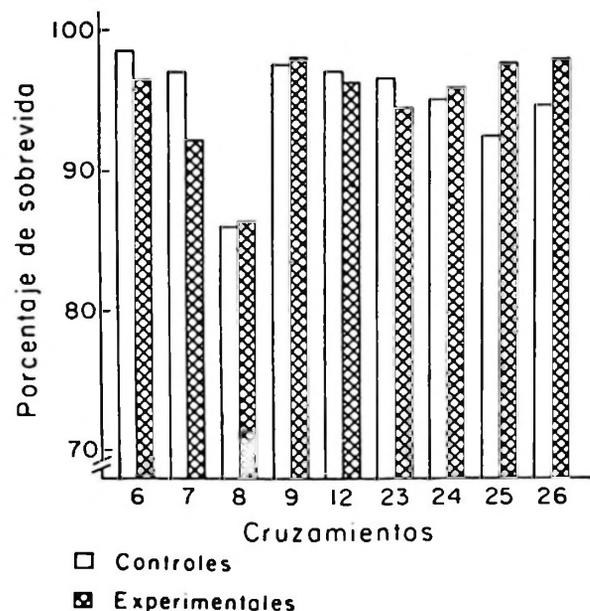


Figura 2. Porcentaje de sobrevida al "estado de ojos" de huevos sometidos a choque térmico y huevos controles de trucha arcoiris.

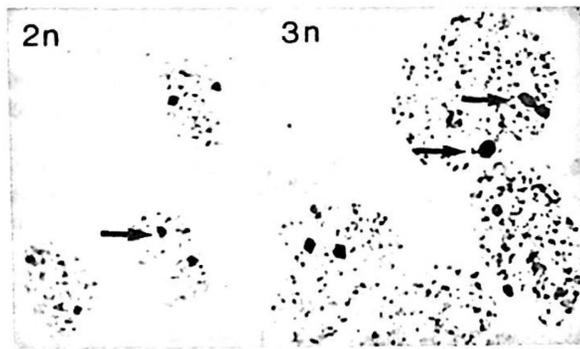


Figura 3. Núcleos interfásicos de embriones de trucha arcoiris teñidos con técnicas de Ag. $2n$ = diploide (control); $3n$ = triploide; Las flechas indican los nucléolos.

correspondencia con el número de cromosomas organizadores del nucléolo presentes en el cariotipo. En *O. mykiss* se ha identificado un solo par (Phillips e Ihssen, 1985). El número de nucléolos varía entre 1 y 2 y entre 1 y 3 en diploides y triploides respectivamente. No se observan 3 nucléolos en los embriones $2n$, lo cual permite realizar un diagnóstico confiable de triploidia.

DISCUSION

La aplicación de un choque térmico a huevos fecundados de ejemplares cultivados de *O. mykiss* produce embriones triploides. La temperatura de 26.5°C parece ser suficiente para interrumpir el proceso de la meiosis del ovocito teniendo estos embriones duplicada la información genética de la hembra progenitora. Esta temperatura tampoco afectaría en forma drástica la sobrevivencia de estos embriones, por lo menos hasta el "estado de ojos".

Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en condiciones experimentales similares (Chourrout, 1980; Chourrout y Quillet, 1982). Solar *et al.* (1984) señalan que, en general, temperaturas entre 26° y 28°C serían las recomendadas para la obtención de triploides en trucha arcoiris. De acuerdo con nuestros resultados, el tiempo que transcurre desde la fecundación hasta la aplicación del choque térmico parece ser importante para un mejor rendimiento en la triploidización. Se supone que el choque térmico afectaría la organización microtubular del huso meiótico y/o el proceso de citodierisis evitando

la expulsión del 2° corpúsculo polar. En este caso, serían también elementos del citoesqueleto los afectados, de una manera similar a lo producido por la aplicación de presión hidrostática (Onozato, 1984). El conocimiento de la temporalidad precisa de estos eventos sería importante para definir el momento y duración de la aplicación del choque térmico.

La variación en la respuesta por parte de las distintas hembras a los tratamientos para producir triploides, mediante temperatura o presión hidrostática dependería de la calidad de sus huevos (Lou y Purdom, 1984; Arai y Wilkins, 1987). En nuestros experimentos, factores como edad de la hembra, asincronía en la maduración de los huevos y/o algún componente de tipo genético no pueden ser descartados. Experimentos tendientes a descartar algunos de estos factores están en curso. La importancia de realizar cruzamientos individuales con fines de comercialización queda en evidencia con estos resultados.

La detección de ejemplares haploides indicaría que el choque térmico sería responsable de la obtención de estos ejemplares ya que éstos no son detectados en los experimentos controles. La activación de huevos no fecundados, o bien, la injuria sobre el genoma materno o paterno por acción de la temperatura han sido sugeridos como causas de la obtención de haploides (Swarup, 1959; Arai y Wilkins, 1987). El efecto de la temperatura sobre procesos metabólicos iniciales como es la primera replicación del ADN podría explicar también la presencia de embriones haploides.

En trucha arcoiris, los valores de sobrevivencia de triploides a la eclosión varían entre 55% y 87% (Solar *et al.*, 1984; Chourrout y Quillet, 1982). Happe *et al.* (1988) obtienen una disminución de la sobrevivencia de 21.3% hasta el comienzo de la alimentación de los alevines, correspondiendo la mayor mortalidad hasta el "estado de ojos". En nuestros resultados, en cambio, la sobrevivencia de los triploides es alta y similar a la de los grupos controles hasta este mismo estado del desarrollo. Queda por determinar si la sobrevivencia de un 95% que hemos obtenido se mantiene en etapas posteriores del desarrollo. La menor sobrevivencia de ejemplares triploides se debería a factores como su condición genética $3n$ particular y/o al efecto directo de la temperatura (Swarup, 1959; Solar *et al.*, 1984).

Todos los métodos citogenéticos de diagnós-

tico del nivel de ploidía utilizados en este trabajo proporcionan información confiable. Sin embargo, nos parece que el conteo directo de los cromosomas en las placas metafásicas de embriones presenta ciertas ventajas como es el diagnóstico precoz de las triploidías y la identificación de haploidías y mosaicismos. La certificación de la condición de triploide del producto que se comercializa se puede avalar adjuntando microfotografías de las placas metafásicas.

La identificación del número máximo de nucléolos también puede realizarse precozmente y no necesita la obtención de cromosomas, sin embargo, es un método que consume más tiempo. La determinación de las cantidades de ADN/N además de ser un método lento, sólo puede aplicarse, en forma más confiable, en embriones que presentan circulación sanguínea.

En resumen, nuestros resultados muestran que se dispone de métodos que permiten la producción de embriones triploides y su correspondiente certificación citogenética. Los estudios tendientes a determinar la sobrevivencia, las modificaciones de la maduración gonadal y los patrones de crecimiento de embriones triploides están en curso. Junto con la transferencia de estas metodologías a las pisciculturas locales es posible contribuir al conocimiento de la fisiología reproductiva y aspectos de expresión génica en peces salmonídeos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está parcialmente financiado por Proy. 2032/87. FONDECYT al Dr. Nelson Díaz. Agradecemos al Sr. Cristián García, de Sociedad Agrícola Aguas Claras Ltda. y Sociedad Agrícola Macul Ltda.

LITERATURA CITADA

- ARAI, K. y N. P. WILKINS. 1987. Triploidization of brown trout (*Salmo trutta*) by heat shocks. *Aquaculture* 64: 97-103.
- CHOURROUT, D. 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reprod. Nutr. Develop.* 20 (3A): 727-733.
- CHOURROUT, D. 1988. Induction of gynogenesis triploidy and tetraploidy in fish. *ISI Atlas: Anim. and Plant. Sci.* 65-70.
- CHOURROUT, D. y E. QUILLET. 1982. Induced gynogenesis in the rainbow trout: sex and survival of progenies production of all-triploid population. *Theor. Appl. Genet.* 63: 201-205.
- HAPPE, A., E. QUILLET y B. CHEVASSUS. 1988. Early life history of triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture* 71: 107-118.
- LEITRITZ, E. y R. C. LEWIS. 1980. Trout and salmon culture (Hatching methods). *California Fish Bull.* 164: 197 págs.
- LOU, Y. D. y C. E. PURDOM. 1984. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 25: 345-351.
- NORTHLAND, I.; J. CAPETILLO; P. ITURRA y A. VELOSO. 1990. Nuclear DNA content and karyosystematic relationships of species grouped in primitive tribes of Leptodactylidae (Amphibia-Anura). *Bras. J. Genet.* 13: 247-254.
- OLMO, E. 1973. Quantitative variations in the nuclear DNA and phylogenesis of the amphibia. *Caryologia* 26: 43-68.
- ONOZATO, H. 1984. Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure. *Aquaculture* 43: 91-97.
- PHILLIPS, R. B. y P. E. IHSEN. 1985. Chromosome banding in salmonid fishes: nucleolar organizer regions in *Salmo* and *Salvelinus*. *Can. J. Genet. Cytol.* 27: 433-440.
- PURDOM, C. E. 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture* 33: 287-300.
- QUACK, B. y B. NOEL. 1977. The XY chromosome pair in man and human spermatocytes visualized by silver staining. *Nature (Lond)* 267: 431-433.
- RUFAS, J. S.; P. ITURRA; P. de SOUZA y P. ESPONDA. 1982. Simple silver staining procedure for the location of nucleolus and the nucleolar organizer under light and electron microscopy. *Arch. Biol. (Bruxelles)*. 93:267-274.
- SOLAR, I.; E. M. DONALDSON y G. A. HUNTER. 1984. Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigation of early growth. *Aquaculture* 42: 57-67.
- SWARUP, H. 1959. Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus* (L). *J. Genet.* 56: 129-142.
- THORGAARD, G. H.; M. E. JAZWIN y A. R. STIER. 1981. Polyploidy induce by heat shock in rainbow trout *Trans. Am. Fish. Soc.* 110: 546-550.
- VELOSO, A.; P. ITURRA; F. ESTAY; N. DIAZ y N. COLIHUEQUE. 1988. Inducción de genomas triploides de *Salmo gairdneri*. *Arch. Biol. Med., Exp.* 21 (3-4): R-528: (Resumen).