

**Sinergia de cambios térmicos y de pH sobre la ontogenia inicial de
P. lineatus.**

**Synergy of thermal and pH changes on the initial ontogeny of *P.*
lineatus.**

Ever E. Hernández-Cuadrado^{1,2,3}, PhD, Luis DS. Murgas², PhD, Pierre
M. Badot³, PhD, François DeGiorgi³, PhD.

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, Altos de Santa Helena, Ibagué, Tolima, Colombia. everedrey@gmail.com

²Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037 - CEP 37200-000 – Lavras, Minas Gerais, Brasil.

³Laboratoire de Chrono-Environnement, CNRS - Université de Franche-Comté – INRA, Place Leclerc F-25030 Besançon cedex, France.

Resumen

La disminución del pH y el aumento de la temperatura del agua son dos de las principales amenazas para los peces. En el presente estudio se usaron 1700 ovocitos fertilizados de curimba, Prochilodus lineatus, para evaluar el efecto de diferentes condiciones de pH (4, 5, 6, 7) y temperatura (26, 28, 30, 32°C) sobre su desarrollo embrionario y larval. Fueron calculadas las tasas de fertilización, eclosión, reabsorción del vitelo y sobrevivencia. También se determinó el rango de temperatura óptimo (RTO), la temperatura crítica máxima (CTMax) y el coeficiente de

sensibilidad térmica ($Q_{10}=(R_2/R_1)^{10/(T_2-T_1)}$) para intervalos térmicos diferentes de 10°C. Las mayores tasas de fertilización, eclosión, reabsorción del vitelo y sobrevivencia ($p<0,05$) fueron observadas en las temperaturas de 26 y 28°C y pH de 6 y 7. Curimba presenta un estrecho RTO de 26 a 28°C en las fases de embrión y larva; la CTMax en dichas fases es de 29,5°C a pH 7. Se encontraron valores diferenciales de Q_{10} , siendo mayor en las larvas sometidas a temperaturas altas y menor en embriones a temperaturas menores. Los resultados indican que el efecto sinérgico de condiciones de bajo pH y elevadas temperaturas aumenta la mortalidad en las primeras fases del desarrollo ontogénico en *P. lineatus*. Por tanto, estos datos ofrecen una herramienta útil para la evaluación y el manejo óptimo de los embriones y las larvas de curimba en los programas de producción, repoblamiento y conservación ante fenómenos ambientales globales como el efecto invernadero y la lluvia ácida.

Palabras-clave: curimba, temperatura, pH, embriones, larvas.

Abstract

The decrease in pH and increased water temperature are two major threats to fish. In the present study were used 1700 fertilized oocytes of curimba, Prochilodus lineatus, to evaluate the effect of various conditions of pH (4, 5, 6, 7) and temperature (26, 28, 30, 32 ° C) on its embryonic development. were calculated fertilization, hatching and survival yolk

resorption rates. Also determined the optimal temperature range (RTO), critical thermal maxima (CTMax) and coefficient of thermal sensitivity ($Q_{10}=(R_2/R_1) [10/(T_2-T_1)]$) to different thermal intervals of 10°C. The highest rates of fertilization, hatching and survival yolk resorption ($p<0.05$) were observed at temperatures of 26 and 28°C and pH 6 and 7. Curimba RTO has a narrow 26 to 28°C in stages of embryo and larva; the CTMax in these phases is 29.5°C at pH 7. Differentials Q_{10} values were found, being higher in the larvae exposed to high temperatures and lower in embryos at lower temperatures. Results indicate that the synergistic effect of low pH conditions and high temperatures increases mortality in the early phases of ontogeny in *P. lineatus*. Therefore, these data provide a useful tool for evaluation and optimal management of the embryos and larvae of curimba in production programs, restocking and conservation to global environmental phenomena such as the greenhouse effect and acid rain.

Keywords: curimba, temperatura, pH, embryos, larvae.

Introducción

Por su valor económico y ecológico *P. lineatus*, o curimba, es un pez de gran importancia en América del Sur dentro de las especies nativas migradoras de mediano y grande porte (Botta *et al.*, 2010). Se distribuye en las cuencas de los ríos Paraná, Paraguay, Paraíba y San Francisco (FAO, 1993), incluyendo los sistemas lénticos asociados. Se reproduce una vez por año, de octubre a

marzo, y puede recorrer entre 400 y 600 kilómetros en su ruta migratoria, la cual es altamente compleja (Bertoletti, 1985; Godoy, 1975; Barradas *et al.*, 2009; Godinho y Pompeu, 2003; Hernández-Cuadrado *et al.*, 2013). Uno de los factores que determinan su comportamiento migratorio en su área de distribución geográfica es la temperatura, especialmente a finales del verano y comienzo del otoño (FAO, 1993). Conocer este hecho es importante porque la adaptabilidad térmica de una especie, individuo o población, depende de los ajustes a nivel bioquímico, celular o del organismo como un todo (Hochachka y Somero, 2002).

Las poblaciones naturales de curimba se han visto disminuidas debido a la sobrepesca, modificación de su hábitat y la reducción o alteración de la calidad del agua (Carolsfeld y Harvey, 1998). Su reproducción en cautiverio es difícil, especialmente por la alta mortalidad en las primeras fases de desarrollo, por lo que debe ser inducida artificialmente con hormonas naturales o sintéticas (Hernández-Cuadrado *et al.*, 2013). Dos de las principales amenazas para los embriones y larvas de esta y otras especies de peces dulceacuícolas son la lluvia ácida y el aumento de la temperatura del agua. En el caso de *P. lineatus*, los efectos de estos factores serían mayores debido a que desova en espacios abiertos (Coutant, 1972; Balon, 1981).

Es de indicar que los estudios de laboratorio ayudan a comprender algunas interacciones complejas en los sistemas naturales (Jordaan y Kling, 2003; Hernández-Cuadrado *et al.*, 2011). Así, es conocido que las variaciones en la temperatura ambiental y los componentes de la lluvia ácida (HNO₃ y H₂SO₄) afectan el desarrollo, crecimiento, eclosión y sobrevivencia de los embriones y

larvas de peces y otros organismos terrestres y acuáticos, aún en exposiciones transitorias (Kita *et al.*, 2004; Zaniboni-Filho, 2000; Oba *et al.*, 2009; Rocha, 2006).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto conjunto de la temperatura y pH variables sobre el desarrollo embrionario y larval de *P. lineatus*. Para esto, se analizó la sensibilidad térmica (Q_{10}), la temperatura crítica máxima (CTMax), el rango de temperatura óptimo (RTO), las tasas de fertilización, eclosión reabsorción del vitelo y sobrevivencia, buscando predecir una posible afectación ante fenómenos globales y regionales como el calentamiento global y la lluvia ácida.

Materiales y Métodos

Fueron usados 1700 embriones de curimba obtenidos en la Estación de Piscicultura de la Hidroeléctrica de Itutinga, CEMIG, Minas Gerais, Brasil. Los embriones fueron llevados al Bioterio de Animales de la Universidade Federal de Lavras y repartidos en acuarios con tratamientos conjuntos de pH (4, 5, 6 y 7) y temperaturas (26, 28, 30 y 32°C) en fotoperiodo de 12:12. Se usaron 100 embriones en dos incubadoras de plástico en cada acuario.

Las concentraciones de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y ácido nítrico (HNO_3) fueron de 162,2 mg/L y 4,2 mg/L, respectivamente, según lo indicado por Alves *et al.* (1990) para simular el efecto de la lluvia ácida en Brasil. El efecto de cada valor de pH se probó simultáneamente con cada una de las temperaturas (tabla 1); durante todo el experimento fue monitoreado el oxígeno disuelto (OD) que fluctuó entre $7,9 \pm 1,0$ mg/L y $8,1 \pm 1,2$ mg/L).

A pH 7 y en las diferentes temperaturas experimentales, se midió el rango de temperatura óptimo (RTO), la temperatura crítica máxima (CTMax) y la sensibilidad térmica (Q_{10}). El RTO fue tomado como el intervalo térmico en el cual se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia entre 70 y 100%, de acuerdo con la metodología recomendada por Huey y Stevenson (1979), Wilson (2001), Angilleta *et al.* (2002) y Hernández-Cuadrado (2009).

La CTMax fue determinada tomando el punto térmico intermedio entre la temperatura letal (TL_{50}) y el registro térmico en el que hubo la menor sobrevivencia. Este concepto concuerda con lo propuesto por Hutchinson (1961) y Hutchinson y Manes (1979), según el cual las temperaturas críticas son aquellas en las cuales falla la función fisiológica.

Por último, se analizó la sensibilidad térmica usando el coeficiente térmico ($Q_{10}=(R_2/R_1)^{10/(T_2-T_1)}$), donde R_2 es el desarrollo ontogénico en la mayor temperatura de un intervalo térmico; R_1 : es el desarrollo ontogénico en la menor temperatura de un intervalo térmico; T_2 es la mayor temperatura del intervalo térmico; y T_1 la menor temperatura del intervalo.

Fue determinado el tiempo en alcanzar cada estadio de desarrollo (clivaje, blástula, gástrula, segmentación, organogénesis y larva) en horas post-fertilización (hpf). Durante el desarrollo embrionario y larval se evaluaron las tasas de fertilización (TF), eclosión (TE) y sobrevivencia, así como la mortalidad y las deformidades en cada tratamiento. Estas observaciones fueron realizadas mediante el uso de lupa microscópica y microscopio de luz con cámara incorporada.

Las tasas de fertilización y eclosión se calcularon a las 8 y 18 hpf, respectivamente, y según el avance del desarrollo con cada tratamiento, aplicando las siguientes fórmulas:

$TF = [E / (E+I)] \times 100$, donde TF: tasa de fertilización; E: número de embriones viables; I: número de huevos inviables.

$TE = LA / TF \times 100$, en la que TE: tasa de eclosión; LA: número de larvas; TF: tasa de fertilización.

Se comparó el efecto de los distintos pH sobre la tasas de fertilización, eclosión y supervivencia en cada temperatura experimental, mediante ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey cuando hubo diferencias. Los datos son presentados como la media \pm SE con un valor $p=0,05$ y fueron analizados usando el *software* STATISTICA 7.1.

Resultados y Discusión

En la fase embrionaria hubo mayores tasas fertilización, eclosión, reabsorción del vitelo y supervivencia en las temperaturas de 26 y 28°C en pH 7 (figuras 1 a 4). En pH menor a 7 estas tasas disminuyeron y el porcentaje de embriones inviables o muertos aumentó, siendo que en pH 4 no hubo desarrollo. El desarrollo embrionario fue más acelerado en las temperaturas de 28 y 30°C al ser comparado con la temperatura de 26°C, pero en 30°C la supervivencia disminuyó significativamente; en 32°C, a las 11 hpf, la supervivencia embrionaria fue cero en todos los tratamientos de pH y sólo un 10% alcanzó el estadio de 24 somitos en pH 7. En la fase larvaria se encontró una mayor tasa

de desarrollo con el aumento de la temperatura (26°C, 28°C, 30°C); mas en 30°C y 32°C la sobrevivencia fue nula o casi nula, mientras que en 26 y 28°C fue superior al 80% en pH 7 (figura 4).

La sensibilidad térmica (Q_{10}) de la especie presentó valores diferenciales en los distintos rangos de temperatura y según el avance del desarrollo. Así, mientras que en la fase de gástrula y segmentación los valores de Q_{10} fueron bajos, en el periodo larval estos valores aumentaron (Tabla 2). Los anteriores hallazgos pueden ser la evidencia de un mayor grado de adaptación fenotípica en el tiempo y demuestra una mayor complejidad en la respuesta larval en comparación con lo observado en los embriones. Estos datos podrían ser de utilidad en el manejo de las formas inmaduras de curimba, tanto en los sistemas de producción como en los programas de conservación, ante las consecuencias adversas del calentamiento global.

Los datos preliminares de la presente investigación sugieren la existencia de un efecto sinérgico de la acidez y de la temperatura del agua en el desarrollo embrionario y larval de *P. lineatus* en laboratorio. Este hallazgo también fue recientemente reportado por Zaniboni-Filho *et al.* (2008) en condiciones de pH y temperatura diferentes a las aquí usadas. Estos autores también encontraron que la sobrevivencia de larvas de curimba es cero en pH menor de 4,6 y de 90% en pH entre 8,7 y 9,2. Pero la sobrevivencia determinada en el presente estudio, en pH 7 y temperaturas de 26°C±1°C y 28°C±1°C, fue similar a la reportada por dichos investigadores a 25±0,4°C. Ello puede estar indicando que el rango de pH óptimo de los embriones y las larvas de la especie está entre 7 y 9, pudiendo tener variaciones según la temperatura del agua. Lo

anterior pone en evidencia la vulnerabilidad de *P. lineatus* en sus fases embrionaria y larval ante el efecto conjunto del calentamiento global y la disminución del pH por incidencia de la lluvia ácida.

Ecológicamente estos datos son relevantes en el estudio del desarrollo ontogénico de *P. lineatus* porque se ha documentado que el principal efecto de la lluvia ácida se presenta en los eventos de acidificación episódica (EPA, 2002); Igualmente, se ha documentado que la temperatura es el factor ambiental de mayor incidencia en el desarrollo de los peces (Kupren *et al.*, 2008a). De este modo, el efecto conjunto de estos dos factores ambientales, por fuera o en los límites de los rangos de tolerancia, aumentaría el riesgo de una afectación de su desarrollo ontogénico inicial de *P. lineatus*.

El efecto del pH sobre el desarrollo embrionario ha sido reportado en otras especies de peces como jundiá (*Rhamdia quelen*) y trucha arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), debido a la reducción de la permeabilidad del corion con el aumento de la acidez (Ferreira *et al.*, 2001; Kügel *et al.*, 2006). Esto se debe a que los huevos y las larvas de peces no tienen un sistema de regulación ácido-básico eficaz.

La ontogenia de curimba en sus primeras fases también es afectada por los cambios de temperatura. El rango óptimo de temperatura para la especie en estas fases está entre 26 y 28°C en pH 7 o superior (hasta 9,2, según Zaniboni-Filho *et al.*, 2002). De este modo, los datos aquí obtenidos confirman lo indicado por Jordaan y Kling (2003), según los cuales los cambios de temperatura influyen fuertemente las fases embrionaria y larval en peces y afectan su desarrollo, eclosión, crecimiento y sobrevivencia. En el ambiente

natural el efecto de la lluvia ácida y los aumentos de temperatura podrían causar un efecto similar. Sin embargo, frente a estas circunstancias se ha señalado que pueden presentarse hechos positivos como un mayor crecimiento y conversión alimentaria, ampliación del rango de distribución geográfica, entre otros aspectos (IPCC, 2007). En este sentido, la IUCN (2001) indica que los estudios de laboratorio son relevantes porque pueden ser extrapolados a las condiciones naturales, lo cual ratifica la importancia del presente trabajo.

Así mismo, los resultados pueden ser útiles para determinar si en la actualidad existe, o no, una adaptación fisiológica sincrónica de *P. lineatus* a los cambios térmicos que están sucediendo en el hemisferio sur, particularmente en las cuencas hidrográficas que conforman su área de distribución. Lo anterior, teniendo en cuenta que en algunos cuerpos de agua dulce de otras zonas geográficas del continente americano la temperatura del agua ha aumentado hasta límites letales (Root *et al.*, 2002, Burkett *et al.*, 2005).

Finalmente, los resultados sugieren que una variación de la temperatura y del pH del agua afecta tanto el desarrollo como la sobrevivencia de *P. lineatus* en sus fases ontogénicas de embrión y larva. Estos reportes son importantes en los programas de piscicultura y conservación frente a disturbios ambientales globales como el efecto invernadero y la lluvia ácida. Adicionalmente, los datos obtenidos pueden ayudar a un mejor entendimiento de los patrones de distribución geográfica de la especie si se complementan con futuros estudios.

Agradecimientos

Al Bioterio de Animales de la Universidade Federal de Lavras y a la CAPES/CNPq, Brasil; Colfuturo, Colombia, *Laboratoire de Chrono-Environnement* y *Bourse Victor Hugo*, Ville de Besançon y l'Université de Franche-Comté, France. A JC Henao por sus comentarios en la elaboración final del manuscrito.

Bibliografía

Agilletta Jr., M.J., Niewiarowski, P.H., Navas, C.A., 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of thermal biology* 27, 249-268.

Alves, P., Oliva, M., Cambraia, J., Sant'anna, R., 1990. Efeitos da Chuva Ácida Simulada e de um Solo de Cubatão (Sp) Sobre Parâmetros Relacionados com a Fotossíntese e a Transpiração de Plantas de Soja. *Rev. Bras. Fisiol. Vegetal* 2, 7-14.

Balon, E.K. 1981. Additions and ammendments to the clasification of reproductive styles in fishes. *Environ. Biol. Fish.* 6, 377-89.

Bertoletti, J. 1985. Aspectos biológicos da ictiofauna do rio Uruguai. *Veritas* 30, 93-129.

Botta, P., Sciara, A., Arranz, S., Murgas, L.D.S.; Pereira, G.J.M., Oberlender, G., 2010. Study of the embryonic development in sabalo (*Prochilodus lineatus*). Arch. Med. Vet. 42, 109–114.

Burkett, V.R., Wilcox, D.A., Stottlemeyer, R., Barrow, W., Fagre, D., Baron, J., Price, J., Nielsen, J.L., Allen, C.D., Peterson, D.L., Ruggerone, G., Doyle, T., 2005. Nonlinear dynamics in ecosystem response to climate change: case studies and policy implications. Ecological Complexity 2, 357–394.

Carolsfeld, J., Harvey, B., 1999. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. Curso de treinamento Brasileiro (tradução de H.P. Godinho). Vitória, Canadá, World Fisheries Trust (datilografado).

Coutant, C.C. 1972. Thermal effects on fish ecology. Oak reader national laboratory: 891-896.

EPA. 2002. What is Acid Rain and What Causes It? Environmental Protection Agency. http://www.policyalmanac.org/environment/archive/acid_rain.shtml (consultado 10 de julho 2013)

Ferreira, A.A., Nuñez, A.P.O., Esquivel J.R. 2001. Influência do pH sobre ovos e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Osteichthyes, Siluriformes). Acta Scientiarum 23, 477-48.

Godinho, H.L., Pompeu, P.S., A importância dos ribeirões para os peixes de piracema. *In*: Godinho HP, Godinho, AL. (Org.). Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. pp.361-372.

Hernández-Cuadrado, E.E. 2009. Sensibilidad térmica del desempeño locomotor en anuros de un gradiente altitudinal en los andes colombianos (Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Ciencias Biológicas). Universidad del Tolima, Colombia.

Hernández-Cuadrado, E.E., Murgas, L.D.S., Felizardo, V.O., Ferreira, M.R., Andrade, E.S., 2013. Extension of Sperm Motility Leads to Increased Rates of Fertilization and Hatching of curimba, *Prochilodus lineatus*. Journal of Applied Ichthyology. doi: 10.1111/jai.12259.

Hernández-Cuadrado, E.E., Vargas-Zapata, C., Rodríguez, A., 2011. Bioquímica Sanguínea e Inferencias Ecofisiológicas en *Typhlonectes natans* (Amphibia: Gymnophiona) de la Región Caribe Colombiana. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 35, 13-22.

Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2002. Biochemical Adaptations: Mechanism and Process in Physiological Evolution. Oxford University Press, NY, US.

Huey, R.B., Stevenson, R.D., 1979. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: A discussion of approaches. *Amer. Zool.* 19, 357-366.

Hutchison, V.H., Maness J.D., 1979. The role of behavior in temperature acclimation and tolerance in ectotherms. *American zoologist*. 19, 367-384.

Hutchison, V.H. 1961. Critical thermal maxima in salamanders. *Physiol. Zool.* 2, 92-125.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 2007. *Climate Change: Synthesis Report*. 2007. An Assessment of the Intergovernmental, Panel on Climate Change, 52 pp.

Jordaan, A., Kling, L.J., 2003. Determining the optimal temperature range for Atlantic cod (*Gadus morhua*) during early life. In: H.I. Browman and A.B. Skiftesvik (Eds.). *The Big Fish Bang. Proceed. of the 26th Annual Larval Fish Conference*: 45-62. Institute of Marine Research, Bergen, Norway. In: http://www.fishlarvae.com/e/Book_Reader.asp?pg=/e/BigBang/Jordaan.pdf&pgid=22 (consultado 12 abril 2013).

Kita, I., Sato, T., Kase, Y., Mitropoulos, P., 2004. Neutral rains at Athens, Greece: a natural safeguard against acidification of rains. *Sci. Total Environ.* 327, 285-294.

Kügel, B., Hoffmann, R.W., Friess, A., 2006. Effects of low pH on the chorion of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and brown trout, *Salmo trutta* f. *fario*. *Journal of Fish Biology* 37, 301-310.

Kupren, K., Mamcarz, A., Kucharczyk, D., Prusińska, M., Krejszeff, S. 2008a: Influence of water temperature on eggs incubation time and embryonic development of fish from *genus Leuciscus*. Polish Journal of Natural Sciences 23, 461-481.

Oba, E.T., Mariano, W.D.S., Dos Santos, L.R.B. 2009. Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. Embrapa Amapá, Macapá. Capítulo 8.

Organizacion de Las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion, FAO. 1993. Sinopsis Sobre la Pesca, N 154 Sast - Sábalo 1,38(01)001,15. Sinopsis de los Datos Biologicos y Pesqueros del Sabalo *Prochilodus Lineatus* (Valenciennes, 1847), Roma, 1993.

Rocha, M. 2006. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Sup. Meio Ambiente, revisão 1, 1-7.

Root, T.L., Schneider, S.H., in Wildlife Responses to Climate Change: North American Case Studies (eds Schneider, S. H. & Root, T. L.) 1–56 (Island Press, Washington DC, 2002).

The World Conservation Union (UICN)/ Species survival Comisión (SSC). Newsletter of the declining amphibian populations task force, 48, 167-167, 2001.

Wilson, R.S. 2001. Geographic variation in thermal sensitivity of jumping performance in the frog *Limnodynastes peronii*. The journal of experimental biology 204, 4227-4236.

Zaniboni-Filho, E., Meurer, S., Golombieski, JI., Silva, L.V.F., Baldisserotto, B. 2002. Survival of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) fingerlings exposed to acute pH changes. Acta Sci. 24, 917–920

Zaniboni-Filho, E. 2000. Aqüicultura Empresarial: pesquisa e planejamento. Informe agropecuário 21, 68-77.

Zaniboni-Filho, E., Nuñez, A.P.O., Reynalte-Tataje, D.A., Serafini, R.L., 2008. Water pH and *Prochilodus lineatus* larvae survival. Fish Physiol Biochem 35,151–155.