

UCH-FC  
B. Ambiental

M 117  
C 1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE  
PREGRADO



**“Aportes al conocimiento de la reproducción y  
primeros estadios del ciclo de vida de *Orestias  
ascotanensis* Parenti (Teleostei: Cyprinodontidae)”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento  
parcial de los requisitos para optar al Título de Bióloga con mención en Medio  
ambiente

**Consuelo Rafaela Macaya Solís**

Director del Seminario de  
Título: Irma Vila Pinto

Co-Director:  
Natalia Lam Pasten

Octubre de 2015  
Santiago-Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

**CONSUELO RAFAELA MACAYA SOLÍS**

**“Aportes al conocimiento de la reproducción y primeros estadios del ciclo de vida de *Orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae)”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Bióloga con Mención en Medio Ambiente.

Prof. Irma Vila Pinto  
**Directora Seminario de Título**

Prof. Natalia Lam Pasten  
**Co-Directora del Seminario de Título**

### **Comisión Revisora y Evaluadora**

Prof. David Veliz Baeza  
**Presidente Comisión**

Prof. Carezza Botto Mahan  
**Evaluadora**



## Biografía



Nací en Santiago en septiembre de 1989, llegando a ser la menor en una familia de 5 hermanos. Gran parte de mi vida se desarrolló en la comuna de San Miguel, lugar en el cual comencé mis estudios en el Instituto Miguel León Prado, establecimiento el cual me albergó hasta cuarto medio. El año 2009 decidí ingresar a la Universidad de Chile a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular impartida por la Facultad de Ciencias. Durante dos años me dediqué a estudiar y hacer grandes amigos, periodo el cual recuerdo como unos de los mejores de mi vida. Durante este período mi fascinación por la ciencia incrementó pero al mismo tiempo mis intereses comenzaron a apuntar hacia otra dirección, razón por la cual me cambié a la carrera de Biología con mención en Medio Ambiente impartida por la misma Facultad. Luego de una entretenida vida estudiantil, el año 2013 egresé y al año próximo comencé mi proyecto de seminario de título en el laboratorio de Limnología de la Facultad de Ciencias bajo la dirección de la Profesora Irma Vila Pinto. Durante mi estadía en el laboratorio, lo cual significó alta dedicación y arduo trabajo, aprendí bastante sobre los peces de aguas continentales de Chile, en especial sobre el grupo de las *Orestias*. Además, conocí y compartí con grandes personas, quienes en parte inspiraron mis deseos de seguir estudiando. Actualmente me encuentro explorando nuevas oportunidades en el extranjero con el objetivo de continuar mis estudios en otras partes del mundo, con el fin último de aportar con el estudio y conservación de los sistemas acuáticos de mi país.

## **Dedicatoria**

**A las hermosas y únicas *Orestias*.**

## Agradecimientos

Quiero agradecer a mi profesora Irma Vila por su gran apoyo, tanto en el ámbito personal como académico, indispensable para el desarrollo de este seminario. A Natalia Lam por la ayuda en laboratorio y José Luis Carvajal por sus ideas y ánimo. A los profesores Carezza Botto y David Veliz por sus correcciones y siempre buena onda. A mis compañeros del laboratorio Camila, Faviola, Ingrid, Karina, Franco, Jimena, Noemí, Gabriela, Daniel, Claudio y todo el resto del equipo por su grandísima e imprescindible ayuda. De la misma forma agradezco a proyecto Fondecyt 1140543 y minera El Abra por el financiamiento. También agradezco a toda mi familia, en especial a mis hermanas Carina, Carla y Camila por su apoyo incondicional, y a mis sobrinos que me llenan de energía y felicidad. A Nicolás Fuentes por su amor, alegría, paciencia y multifacética ayuda; y también a su familia, en particular a sus padres por su cariño. A mis amigos Silvia, Kritsye, Camila y Benjamín por las risas y momentos de distracción otorgados. Y por último, a quienes merecen todo el mérito, toda mi gratitud y eterno recuerdo, a todas las *Orestias* que me acompañaron durante este último tiempo, a Chicolita, Nemo y larvitas, gracias!!!

## Índice de Contenidos

<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>XI</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>9</b>
Objetivo general .....	9
Objetivos específicos .....	9
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>10</b>
Obtención de individuos .....	10
Incubación .....	11
Cortejo y gónadas .....	12
Inducción al desove y fecundación artificial .....	12
Huevos y larvas .....	13
Videos e imágenes .....	13
<b>Resultados</b> .....	<b>14</b>
Cortejo .....	14
Ovarios .....	15
Desove inducido .....	16
Primeros estadios del ciclo de vida .....	18
1    Huevo .....	18
1.1    Periodo de cigoto .....	21
1.2    Periodo de clivaje .....	22
1.3    Periodo de blastulación .....	26
1.4    Periodo de gastrulación .....	28
1.5    Periodo de diferenciación y morfogénesis .....	31
2    Larva .....	47
2.1    Larva en flexión con saco vitelino .....	48
2.2    Larva en flexión .....	52
2.3    Larva post flexión .....	55

<b>Discusión .....</b>	<b>59</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>65</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>66</b>

### Índice de Tablas

Tabla I: Terapia hormonal utilizada para la inducción al desove .....	17
Tabla II: Tabla de desarrollo embrionario de <i>Orestias ascotanensis</i> a 20°C ( $\pm 1$ °C) ...	19
Tabla III: Resumen estadios larvales de <i>Orestias ascotanensis</i> .....	48

### Índice de figuras

Figura 1: A: Vertientes del Salar de Ascotán donde se agrupan las distintas subpoblaciones de <i>O. ascotanensis</i> ; B: Dimorfismo sexual de <i>Orestias ascotanensis</i> ; C: Vertiente 6 del salar de Ascotán.....	11
Figura 2: Macho cortejando a una hembra de <i>Orestias ascotanensis</i> donde se observa la diferencia de tamaño entre ambos sexos.....	14
Figura 3: A: Esquema del ovario con lotes de ovocitos de distintas tallas de <i>Orestias ascotanensis</i> ; B: Fotografía del aspecto externo de ovario de <i>O. ascotanensis</i> .....	15
Figura 4: Ovario con ovocitos de distintas tallas .....	16
Figura 5: Ovas y semen de <i>Orestias ascotanensis</i> durante la fecundación artificial.....	17
Figura 6: Cigoto con blastodisco de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 1).....	21
Figura 7: Estado de dos blastómeros de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 2) .....	22
Figura 8: Estado de cuatro blastómeros de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 3).....	23

Figura 9: Estado de ocho blastómeros de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 4).....	24
Figura 10: Estado de 16 blastómeros de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 5).....	25
Figura 11: Estado de 32 a 64 células de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 6).....	26
Figura 12: Blástula de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 7) . .....	27
Figura 13: Epibolia al 30% de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 8).....	28
Figura 14: Epibolia al 50% de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 9).....	29
Figura 15: Escudo embrionario de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 10) .....	30
Figura 16: Epibolia 60-70% de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 11) .....	31
Figura 17: Vista dorsal de vesículas cerebrales de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 12)....	32
Figura 18: Primeros cromatóforos y somitos de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 13). .....	33
Figura 19: Establecimiento de copas ópticas, primeros latidos del corazón y contracciones musculares de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 14).....	34
Figura 20: Vista lateral de embrión de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 16).....	35
Figura 21: Vista dorsal de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 16) .....	37
Figura 22: Vista frontal de embrión de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 16) .....	37
Figura 23: Vista frontal de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 17) .....	38
Figura 24: Vista dorso posterior de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 17).....	39
Figura 25: Vista frontal de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 18) .....	40
Figura 26: Vista dorsal de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 18). .....	40
Figura 27: Vista lateral de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 19) .....	41
Figura 28: Vista lateral de embrión de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 19).....	42
Figura 29: Vista dorsal de embrión de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 19) .....	42
Figura 30: Vista dorsal <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 20). .....	43
Figura 31: Vista dorsolateral izquierda de embrión de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 20) .....	44

Figura 32: Vista frontal embrión de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 20) .....	44
Figura 33: Vista lateral de embrión de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 21) .....	45
Figura 34: Vista frontal embrión de <i>Orestias ascotanensis</i> (estado 21) .....	46
Figura 35: Embrión de <i>Orestias ascotanensis</i> en el momento de la eclosión, aun con parte del corion sin desprender .....	47
Figura 36: Larva en flexión con saco vitelino recién eclosionada de <i>Orestias ascotanensis</i> . .....	49
Figura 37: Detalle del extremo caudal de larva en flexión con saco vitelino de <i>Orestias ascotanensis</i> .....	50
Figura 38: Vista dorsal de larva flexión con saco vitelino de <i>Orestias ascotanensis</i> .....	51
Figura 39: Detalle de la cabeza de larva en flexión con saco vitelino recién eclosionada de <i>Orestias ascotanensis</i> .....	52
Figura 40: Vista lateral de larva en flexión de <i>Orestias ascotanensis</i> con el saco vitelino absorbido .....	53
Figura 41: Vista lateral de la zona caudal de larva flexión de <i>Orestias ascotanensis</i> .....	54
Figura 42: Vista dorsal de <i>Orestias ascotanensis</i> hacia el final del periodo de larva en flexión donde se observa la pigmentación del dorso en forma de corazón invertido .....	54
Figura 43: Detalle del patrón de pigmentación, al contacto de la luz directa en larva en postflexión de 40 días de <i>Orestias ascotanensis</i> .....	56
Figura 44: A: Detalle de rayos caudales; B: rayos anales de larva en postflexión de 40 días de <i>Orestias ascotanensis</i> . .....	57
Figura 45: Larva post flexión de 61 días de <i>Orestias ascotanensis</i> .....	58
Figura 46: Escama de la línea lateral de larva de 17 mm de longitud estándar de <i>Orestias ascotanensis</i> .....	58

## Resumen

El género *Orestias* es endémico del Altiplano andino siendo conocidas hasta hoy 7 especies en Chile, entre estas, *Orestias ascotanensis* se describe sólo en las vertientes del Salar de Ascotán y se encuentra en peligro de extinción. Dada la importancia de la reproducción y primeros estadios del ciclo de vida de los peces para la persistencia de las poblaciones, su conocimiento es muy importante en el desarrollo de futuras medidas de conservación de esta especie. En este estudio se describen conductas asociadas a la reproducción natural y el desarrollo embrionario y larval de *Orestias ascotanensis* a temperatura y fotoperíodo controlados. Entre 2014 y 2015 se capturaron 50 individuos de *O. ascotanensis* y fueron mantenidos en acuarios bajo condiciones ambientales y alimentación controladas, además individuos menores a 30 mm de longitud estándar fueron capturados y fijados en formalina al 2-5%. Parte de las hembras fueron sometidas a terapia hormonal con *Ovaprim*® para inducir el desove y luego se realizó fecundación artificial en seco. La temperatura del agua se mantuvo a 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), la conductividad osciló entre 2800 a 3600  $\mu\text{S}/\text{cm}^3$  y se fijó un fotoperíodo de 16:8 (horas luz: horas oscuridad). Los machos presentaron cambios de coloración y conductas de cortejo, mientras que las hembras abultamiento en el vientre. Las gónadas femeninas de *O. ascotanensis* presentaron ovocitos de distintos tamaños (< 0,1 mm a 2,1 mm) distribuidos aleatoriamente. Los huevos demersales de 1,55 a 1,85 mm de diámetro presentaron abundante vitelo y desarrollaron decenas de filamentos adherentes. El desarrollo embrionario de *O. ascotanensis* a 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) tuvo una duración de 14 a 18 días, dividido en 5 periodos y 21 estados, señalando los tiempos de desarrollo desde la

fecundación hasta la eclosión. El estadio larval se dividió en los periodos de: (i) larva en flexión con saco vitelino, (ii) larva en flexión y (iii) larva en post flexión. La larva de *O. ascotanensis* nace altamente preparada para la vida libre y absorbe el saco vitelino en 5 a 7 días post eclosión. *Orestias ascotanensis* desarrolla huevos relativamente grandes en comparación a su longitud estándar, baja fecundidad parcial y ovarios con ovocitos en distintos estadios de desarrollo, lo que concuerda con especies de desove parcial. La alta pigmentación desde temprano desarrollo, alta ramificación de vasos vitelinos y el alto grado de desarrollo de las larvas a la eclosión podrían ser adaptaciones a condiciones extremas como la alta radiación, baja presión de oxígeno y cambios diarios significativos de temperatura. Se recomienda para mejores resultados en la inducción al desove, utilizar instalaciones que se asemejen a su hábitat natural.

## Abstract

The genus *Orestias* is endemic of the Andean high plains (Altiplano) and it has been described 7 species for Chile, among these, *Orestias ascotanensis* inhabits only the springs of the Ascotán salt pan and it is critically endangered. Considering the importance of reproduction and early life history stages for population persistence in fishes, these are essential for making effective conservation actions and protecting them. In this survey I studied the behaviour of natural reproduction as well as the embryonic and larval development for *Orestias ascotanensis* under controlled temperature and photoperiod. Between 2014 and 2015 I captured 50 individuals of *O. ascotanensis* and they were kept in the laboratory under controlled conditions and feeding. Individuals under 30 mm to standard length were captured and fixed with 2-5% formalin. In order to induce spawn for dry artificial fertilization, females were subjected to hormone therapy with Ovaprim®. Water temperature was maintained at 20° C ( $\pm 1$  ° C), conductivity ranged from 2800-3600 mS/cm<sup>3</sup> and the photoperiod was 16:8 (light hours: dark hours). Males showed changes on colour and courtship behaviors, and females slightly bulging belly. Females' ovaries showed oocytes with different sizes. Demersal eggs with size from 1.55 to 1.85 mm showed abundant yolk and they developed tens of filaments for adhesion and protection. The embryonic development lasted between 14 and 18 days, and it was divided into 5 periods and 21 states from fertilization to hatching. The larval stage was divided into three periods: (i) flexion larva with yolk sac, (ii) flexion larva and (iii) postflexion larva. After hatching larvae were highly prepared for the free life stage and they absorbed the yolk sac in 5-7 days. *Orestias ascotanensis* presented characteristic of

a partial spawning species, such as: oocytes at different stages of development, eggs relatively large compared to its standard length, and low batch fecundity. The high pigmentation of eggs and larvae, and the high degree of development of larvae at hatching could be adaptations to extreme conditions such as high radiation and significant daily changes in temperature. Finally, for future surveys I recommend to replicate its habitat, in order to increase the understanding of reproduction and development of this species.

## **Introducción**

La reproducción es el proceso por el cual las especies se perpetúan, transmitiendo su genoma a sus descendientes. Cada una de ellas presenta una estrategia reproductiva o conjunto de características que una especie deberá manifestar para que ocurra la reproducción, siendo única para cada especie, presentando adaptaciones anatómicas, fisiológicas, de comportamiento y energéticas específicas (Vazzoler, 1996; Wootom, 1999; Miller y Nummela, 2009).

En el caso de los Teleósteos o peces óseos, estos presentan una estrategia reproductiva que maximiza la producción de descendientes durante la vida, y más aún, maximiza la sobrevivencia de los descendientes hasta el estado adulto (Murua y Saborido-Rey, 2003). Esta se sincroniza estrechamente con las variaciones del medio ambiente, interviniendo en la regulación de los mecanismos hormonales asociados, la cual está dada por la interacción Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (Valdebenito, 2008).

Las señales ambientales pueden ser consideradas como factores próximos, que controlan los ciclos reproductivos anuales como el fotoperiodo; y factores últimos a aquellas variables ambientales que durante la evolución han ejercido una presión de selección para restringir la actividad reproductiva a un tiempo determinado del año, como la presión de depredación, la disponibilidad de alimento y temperaturas ambientales más favorables (Carrillo, 2008).

Existe una gran diversidad de estrategias reproductivas, con especies que solo se reproducen una vez en la vida y luego mueren, como lo hacen las especies semélparas, y

otras, en cambio, que constituyen la mayor parte de las especies y presentan múltiples periodos reproductivos, o iteróparas (Wootton, 1999). En relación al desove, se pueden presentar dos modalidades, el desove total y el desove parcial o fraccionado (Tyler y Sumpter, 1996). En el primer caso, estas especies desovan una sola vez en cada periodo reproductivo, presentando un desarrollo ovocitario sincrónico, es decir, los ovocitos comienzan su desarrollo y maduran simultáneamente existiendo una sola moda de tamaño en la gónada femenina (Hunter y col., 1983; Murua y Saborido-Rey, 2003). Los desovadores parciales, por su parte, liberan sus huevos en lotes en un periodo que pueden ser días o meses, presentando así un desarrollo ovocitario asincrónico o sincrónico parcial (en 2 o más grupos). Estas especies presentan ovocitos en distintos estados de desarrollo los cuales pueden ser agrupados en 2 o más lotes de tamaño, quienes a medida que experimenten un proceso de maduración serán liberados al exterior de manera parcializada. Las especies de desove parcial muchas veces extienden su actividad reproductiva durante todo el año (Balbotin, 1989; Comte y Vila 1992).

Luego del desove, los huevos son fecundados externamente, evento que ocurre en la mayoría de los peces (Miller y Nummela, 2009). La primera etapa de la historia de vida incluye los estados de huevo, larva y juvenil, pudiendo presentar múltiples estados intermedios o de transición (Kendall y col., 1984). El estado de huevo incluye desde el desove hasta la eclosión. Los huevos pueden ser demersales o pelágicos, pero la mayoría de los peces de aguas continentales ponen huevos demersales los cuales tienden a depositarse en el fondo, por lo general adhiriéndose al sustrato o quedando libres en

contacto con el bentos o adheridos a diferentes sustratos (Kendall y col., 1984; Leis y Carson-Ewart, 2000; Miller y Nummela, 2009).

El modelo general de desarrollo de los peces comienza con la formación del cigoto el cual se divide rápidamente. La segmentación es meroblástica donde las divisiones solo ocurren en una porción del citoplasma. Estos huevos también son llamados telolecíticos donde la división es discoidal, es decir, que solo se da en el área libre de vitelo formando una estructura en forma de disco (Blastodisco) ubicada en el polo animal del huevo (Gilbert, 2005). Este comienza a experimentar sucesivas divisiones celulares con extrema rapidez dando origen a células hijas o blastómeros, quienes disminuyen progresivamente de tamaño hasta el momento de formar una estructura en forma de cúpula con cientos de células, la Blástula (Muller, 1997).

Con una cantidad considerable de células estas comienzan a desplazarse a través de movimientos epibólicos, de involución y de convergencia permitiendo la formación de las capas germinales, ectodermo, mesodermo y endodermo; las cuales darán origen a los distintos órganos y tejidos durante el periodo de diferenciación y morfogénesis (Kimmel y col., 1995; Iwatmatzu, 2004). Finalmente el desarrollo embrionario culmina con la eclosión dando origen a una larva cuyo nivel de desarrollo puede variar entre especies (Leis y Carson-Ewart, 2000), esto considerando que el tiempo de desarrollo embrionario es dependiente de la temperatura y también altamente específico para cada especie (Kendall y col., 1984).

Los estadios larvales específicos difieren de los adultos tanto en caracteres anatómicos y fisiológicos como en comportamiento y ecología, por lo que su estudio es esencial para

una mejor comprensión de cada especie en particular. Las larvas recién eclosionadas por lo general presentan un periodo en el cual aún dependen del saco vitelino para su nutrición, lo cual es de gran importancia considerando que muchas especies presentan larvas que nacen sin completar el desarrollo de los ojos y boca siendo incapaces de alimentarse (Kendall y col., 1984).

Además, huevos y larvas con saco vitelino tienen escasa o nula capacidad de evadir depredadores o sobrellevar factores abióticos desfavorables, y en la mayoría de los casos carecen de cuidado parental (Wootton, 1999). De esta manera la mortalidad de los primeros estadios de vida puede ser extremadamente alta constituyendo una fase crítica en el éxito del reclutamiento y persistencia de las poblaciones (García de Jalón, 1993).

Eventos como el desarrollo del número total de rayos de las aletas y las primeras escamas marcan el paso del estado larval a juvenil (Ahlstrom y Ball, 1954; Kendall y col., 1984; Nakatani y col., 2001), pudiendo existir entre ambos estados una fase de transición o de transformación, el cual puede estar acompañado de cambios en los hábitos bentónicos a planctónicos o viceversa. El estado juvenil se extiende hasta alcanzar la madurez sexual, momento en el cual se convierte en un individuo adulto (Leis y Carson-Ewart, 2000).

En Chile, los peces de aguas continentales constituyen los vertebrados menos estudiados a nivel nacional (Vila y Pardo, 2008) donde uno de los principales vacíos de conocimiento lo constituyen aspectos de la biología y ecología, siendo escasa o nula la información sobre épocas de reproducción, fecundidad, estrategias reproductivas, crecimiento y primeros estadios de desarrollo (Habit y col., 2006).

La región altoandina sustenta una ictiofauna de baja diversidad taxonómica compuesta sólo por dos géneros de peces, de la familia de los Siluriformes *Astroblepus* y *Trichomycterus*; y de la familia Cyprinodontidae, el género *Orestias* (Parenti, 1984).

*Orestias* se caracteriza por la ausencia de aletas pélvicas y el soporte de las aletas, la ausencia de vómer y del primer proscleitrum (Parenti, 1981), además de la presencia de una sola gónada y patrones diferenciados de escamación (Parenti, 1984; Dejoux y Iltis, 1991). Este también se caracteriza por ser altamente especioso presentando hasta el momento cerca de 45 especies. De estas, 23 habitan únicamente en la cuenca del Titicaca, el resto en su mayoría vive hacia el sur del altiplano (Parenti 1984; Dejoux y Iltis, 1991; Vila y col., 2013).

Rasgos de historia de vida como fecundidad y reproducción de *Orestias* tanto en Chile como Perú y Bolivia, son poco conocidos, al igual que el desarrollo embrionario y estadios larvales. Especies de *Orestias* del lago Titicaca han sido caracterizadas como especies con desove entre 50 y 400 huevos, cuyo tamaño varía entre 1,3 y 2,3 mm de diámetro. Los huevos son demersales, adhesivos, translúcidos, viscosos y a menudo amarillentos, los cuales son depositados durante las noches en plantas de la orilla por especies como *O. luteus* y *O. olivaceus* (Dejoux y Iltis, 1991). En el caso de *O. agassii* en cuencas bolivianas, esta desova parcialmente pequeños lotes durante todo el año intensificándose en los meses más lluviosos (De la Barra, 2012).

Respecto a los primeros estadios del ciclo de vida, estudios en la cuenca del Lago Titicaca han caracterizado los tiempos de desarrollo embrionario y tiempos de absorción del saco

vitelino de larvas de *Orestias agassii*, *O. luteus* y *O. ispi* entre 16 a 28 días con temperaturas entre 13 y 22° C (Castañon, 1994; Centro de investigación y desarrollo acuícola boliviano (CIDAB), 2002; Loayza, 2009).

En Chile, *Orestias* presenta siete especies del complejo *agassii*; *O. agassii* Valenciennes 1846, *O. laucaensis* Arratia 1982, *O. parinacotensis* Arratia 1982, *O. ascotanensis* Parenti 1984, *O. chungarensis* Vila y Pinto 1986, *O. piacotensis* Vila 2006 y *O. gloriae* Vila 2011, siendo las seis últimas endémicas y restringidas a pequeñas áreas geográficas. Actualmente cinco de ellas (cinco primeras) están catalogadas como *en peligro* según el Reglamento de clasificación de especies del Ministerio del Medio Ambiente y las dos últimas aún no han sido evaluadas (Ministerio de Medio Ambiente (MMA), 2015).

Las especies *O. chungarensis*, *O. laucaensis* y *O. parinacotensis* han sido descritas como especies de desove parcial, con las mayores abundancias de ovocitos entre octubre y noviembre, durante su máximo periodo reproductivo el cual disminuye en marzo. Estas especies colocan sus huevos adheridos a macrófitas mediante finos filamentos siendo el fotoperiodo el principal factor ambiental gatillante de la maduración sexual y con ello la reproducción (Pinto y col., 1991).

Entre los representantes de *Orestias* en Chile, *Orestias ascotanensis*, habita en las vertientes que alimentan el Salar de Ascotán. Este es sustentado por 12 vertientes ubicadas en el lado este y extremos norte y sur de este, cuya agua proviene subsuperficialmente desde la Caldera de Pastos grandes, en Bolivia (Keller y Soto, 1998).

Las vertientes constituyen ecosistemas acuáticos someros y de corta extensión, donde persiste un gradiente de salinidad desde el origen de los afloramientos de agua, cuya conductividad oscila entre 3.000 y 4.000  $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ , hasta el salar donde se registran valores mayores a 10.000  $\mu\text{S}/\text{cm}^3$  (Keller y Soto, 1998). *O. ascotanensis* se distribuye en las zonas de menor salinidad de las vertientes, las cuales varían en nivel de conexión superficial. Los especímenes se agrupan en cardúmenes asociados a macrófitas las cuales les proporcionan refugio y a su vez lugar de alimentación. Esta la integran principalmente coleópteros del género *Austrelmis*, crustáceos del género *Hyaella*, ostrácodos, ácaros, gastrópodos de los géneros *Heleobia* y *Biomphalaria*, y algunas larvas de dípteros de las familias *Chironomidae* y *Ephydriidae* (Sobarzo, 2014).

En la reproducción y el ciclo de vida de *O. ascotanensis*, se ha estimado que los adultos alcanzarían entre 3 a 4 años, logrando la madurez sexual al año de vida. Las hembras son significativamente más grandes que los machos, y estas liberan al agua pequeñas puestas de huevos cuyos largos filamentos adherentes les permiten sujetarse a macrófitas (Vila y col., 2007). El tamaño estimado de los huevos es de 2,5 mm de diámetro en promedio y el desarrollo embrionario a 23°C (+1°C) de 12 a 14 días, donde los embriones y vitelo poseen gran cantidad de pigmentos en respuesta a la alta radiación (Bugueño y Vila, 1997). Las larvas, por su parte, se alimentan de microcrustáceos y permanecen entre las macrófitas (Vila y col., 2007).

La mantención en cautiverio de *Orestias ascotanensis* se ha logrado con éxito en acuarios simulando su hábitat natural mediante el manejo de variables ambientales como

temperatura, salinidad y fotoperiodo, incluso logrando el desove espontáneo (Jara y col., 1995).

Esta especie hoy es considerada en peligro de extinción (MMA, 2015) debido a su pequeño tamaño poblacional, reducido a sólo cientos de individuos, y además de la fragmentación y fluctuaciones en el tamaño de su hábitat. Esta situación, se debe principalmente por el balance hídrico negativo, proceso geológico natural que afecta a los sistemas altiplánicos (Keller y Soto, 1998; Vila y col., 2007; Morales, 2009; Morales y col., 2011), y la alta demanda de agua por parte de la actividad minera (Contreras, 2002).

Dado el carácter único y altamente vulnerable de esta especie es de suma importancia efectuar acciones de conservación para el resguardo de sus subpoblaciones, que estén centradas tanto en la protección y restauración del ecosistema particular en el cual habita, como también en la evaluación de medidas directas sobre sus subpoblaciones. Como medidas de conservación se ha propuesto la restauración de la hidrología y vegetación de la zona, junto con planes de reproducción artificial para restablecer las subpoblaciones más afectadas (Vila y col., 2007).

El conocimiento sobre la reproducción y los primeros estadios del ciclo de vida de *O. ascotanensis* constituyen una herramienta bastante útil e importante para el desarrollo de futuras acciones de conservación hacia esta especie y también para otras del género *Orestias*, así como también representa un aporte hacia el conocimiento de la ictiofauna endémica de Chile.

## Objetivos

### Objetivo general

Estudiar conductas asociadas a la reproducción, el tipo de desove y describir el desarrollo embrionario y larval de *Orestias ascotanensis* bajo variables ambientales controladas.

### Objetivos específicos

- Mantener machos y hembras adultos de *O. ascotanensis* en cautiverio bajo condiciones ambientales y alimentación controladas.
- Describir conductas asociadas a la reproducción y examinar gónadas femeninas.
- Inducir el desove y realizar fecundación artificial en condiciones de laboratorio.
- Caracterizar el desarrollo embrionario de *O. ascotanensis*.
- Caracterizar estadios larvales de *O. ascotanensis*.

## Materiales y métodos

### Obtención de individuos

En los meses de abril y mayo de 2014, 50 individuos adultos de distintas tallas de *Orestias ascotanensis* fueron capturados en las vertientes 5 y 6 que alimentan el Salar de Ascotán ubicado en los Andes de la II región de Antofagasta (576966-7623591 UTM MGS 84, a 3716 m.s.n.m., Fig. 1). La pesca se realizó mediante redes manuales y pesca eléctrica, y los individuos fueron trasladados el mismo día por vía aérea al Laboratorio de Limnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Adicionalmente, individuos de *O. ascotanensis* (longitud estándar < 30 mm.) fueron capturados en los meses de diciembre de 2014 y marzo de 2015, de las vertientes 5 y 6 mediante redes manuales. Los ejemplares fueron eutanasiados con aceite de clavo de olor y fijados en formalina al 2-5%.

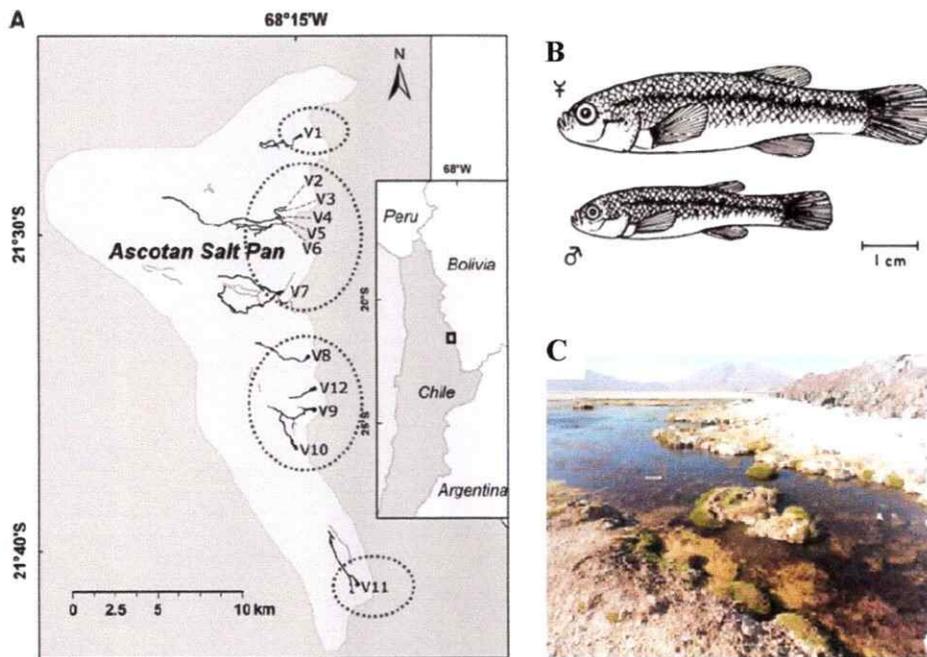


Figura 1: A: Vertientes del Salar de Ascotán donde se agrupan las distintas subpoblaciones de *O. ascotanensis* (Morales y col., 2011); B: Dimorfismo sexual de *Orestias ascotanensis* (Vila y col., 2007b); C: Vertiente 6 del salar de Ascotán.

## Incubación

Los individuos adultos fueron ubicados en cuatro acuarios de 20 a 50 litros de capacidad en grupos mixtos de 10 a 30 individuos bajo condiciones ambientales y alimentación controladas. La temperatura del agua se mantuvo a 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), la conductividad osciló entre 2800 a 3600  $\mu\text{S}/\text{cm}^3$  y se fijó un fotoperiodo de 16:8 (horas luz: horas oscuridad). Los peces fueron alimentados dos veces al día con alimento comercial especialmente diseñado para peces carnívoros (*Sera vipan*, *Sera FD Tubifex*, *Sera larvas rojas de mosquito*) suplementado con alimento vivo (*Eisenia foetida* (lombriz de tierra) y *Artemia salina*).

### **Cortejo y gónadas**

Para registrar conductas asociadas a la reproducción, los individuos adultos fueron fotografiados y grabados utilizando una cámara digital compacta sumergible modelo COOLPIX AW100 Nikon. Las gónadas de las hembras que no lograron sobrevivir al cautiverio durante el periodo de estudio fueron examinadas y fotografiadas utilizando una lupa Nikon SMZ445 acoplada a una cámara digital BMS.

### **Inducción al desove y fecundación artificial**

Luego de un periodo de aclimatación de 1 a 3 meses las hembras con señales de comportamiento y/o físicas de madurez sexual, como conductas de cortejo y abultamiento del vientre, fueron seleccionadas para ser sometidas a una terapia hormonal con *Ovaprim*® (SGnRHa + Domperidona) mediante inyección intramuscular. Las inyecciones se aplicaron en el dorso, anterior a la aleta dorsal, utilizando jeringas de tuberculina de 1 ml; y con la previa aplicación de anestesia vía inmersión con aceite esencial de clavo de olor *Katmandú*® a una concentración de 2,25 µl/ml (1 gota/100 ml). Se utilizaron dosis y tiempos a probar de *Ovaprim*®, monitoreando cada 24 horas luego del suministro de la hormona, aplicando masaje abdominal hasta obtener el desove. Se realizó fecundación artificial en seco, cuyo procedimiento se ejecutó mediante masaje abdominal en hembras y machos en una proporción de 2 a 3 machos por hembra. Las ovas y semen fueron depositadas suavemente en una capsula Petri totalmente seca, a la

cual solo terminado el procedimiento anterior se les agregó agua de clorada para activar la fecundación.

### **Huevos y larvas**

Los huevos fecundados fueron mantenidos en una cámara de incubación termoregulada a 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) en cápsulas de cultivo de 6 pozos en parejas, sumergidos en agua de clorada. El agua fue removida y oxigenada diariamente, mientras que los embriones muertos fueron separados y fijados en formalina al 2%. Las larvas eclosionadas fueron mantenidas las primeras 2 semanas en cápsulas de cultivo de 6 pozos, luego trasladadas a vasos precipitados y pequeños acuarios. Se les alimentó 1 a 2 veces al día con una mezcla de zooplancton y luego del primer mes con nauplius de *Artemia salina*. Ovas, embriones y larvas (vivas y fijadas) fueron observados y fotografiados mediante una lupa Nikon SMZ445 acoplada a una cámara digital BMS, una lupa Leica EZ4HD (con cámara digital incorporada) y un microscopio Leica DM500 acoplado a una cámara digital Leica ICC50HD.



### **Videos e imágenes**

El procesamiento de las imágenes y mediciones morfológicas se realizaron mediante los softwares ImageJ y LAS EZ de Leica. Todos los videos e imágenes fueron editados mediante el software Adobe Photoshop CS5.

## Resultados

### Cortejo

Luego de un periodo de aclimatación al cautiverio los machos comenzaron a presentar comportamientos de cortejo sobre todo hacia las hembras de mayor talla, acompañado de cambios de coloración. El cortejo se caracterizó por persecuciones cortas de hasta cinco machos por hembra, nadando por debajo de ellas frotando boca y dorso en la zona ventral, cercana al poro urogenital de las hembras. Adicionalmente se notó un cambio de coloración de los machos hacia un amarillo anaranjado intenso en la zona ventral posterior, al poro urogenital. Este cambio de coloración se intensificó y aceleró al estar a solas o entre pocos machos con una hembra. Algunas hembras, por su parte, presentaron abultamiento del abdomen, sin embargo no presentaron cambios de coloración asociadas al cortejo (Fig.2).



Figura 2: Macho cortejando a una hembra de *Orestias ascotanensis* donde se observa la diferencia de tamaño entre ambos sexos: (H) hembra y (M) macho.

## Ovarios

Se observó las gónadas de seis hembras. El ovario de *O. ascotanensis* es un órgano en forma de pera a oblonga, de color blanco con porciones altamente melanizadas. Estos presentaron ovocitos de distintas tallas u estadios de desarrollo (Fig. 3 A, 3B, y 4), distribuidos aleatoriamente dentro del ovario. Las tallas de ovocitos variaron desde  $<0,3$  mm hasta 2,0 mm.

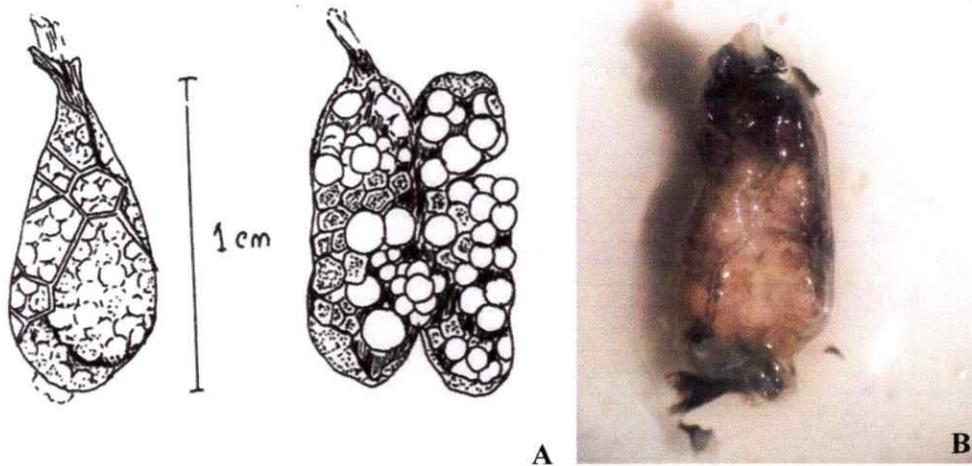


Figura 3: A: Esquema del ovario con lotes de ovocitos de distintas tallas de *Orestias ascotanensis*; B: Fotografía del aspecto externo de ovario de *O. ascotanensis*.

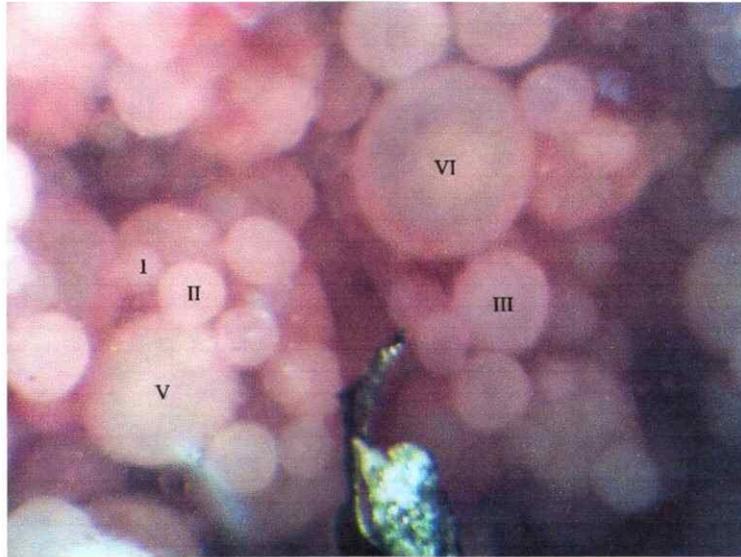


Figura 4: Ovario con ovocitos de distintas tallas (Aumento 40X): (I) 150  $\mu\text{m}$ , (II) 250  $\mu\text{m}$ , (III) 350  $\mu\text{m}$ , (IV) 450  $\mu\text{m}$ , (V) 550  $\mu\text{m}$  y (VI) 650  $\mu\text{m}$ .

### **Desove inducido**

Se aplicó terapia hormonal a un total de 22 hembras, logrando inducir el desove en tres de ellas. Los tiempos y dosis variaron bastante entre individuos. En los dos primeros casos (hembra 1 y 2) se indujo el desove mediante masaje abdominal y la tercera hembra experimentó desove espontáneo en el acuario (Fig. 5). En la Tabla I se muestran las dosis hormonales y tiempos entre dosis que resultaron con éxito.

Tabla I: Terapia hormonal utilizada para la inducción al desove

Individuo	Terapia hormonal	Número de ovas
Hembra 1	Dos dosis de <i>Ovaprim</i> ® de 50 µL/g con un intervalo de 3 días entre ellas, obteniendo el desove 2 días después.	17
Hembra 2	Dos dosis de <i>Ovaprim</i> ® de 1,5 µL/g con un intervalo de 5 días entre ellas, obteniendo el desove entre 10 a 12 días después.	15
Hembra 3	Desove espontáneo	12



Figura 5: Ovas y semen de *Orestias ascotanensis* durante la fecundación artificial.

## **Primeros estadios del ciclo de vida**

Se describieron los primeros estadios del ciclo de vida de *O. ascotanensis* en base a lo obtenido en laboratorio y colectado en terreno:

### **1. Huevo**

#### **1.0 Pre-fecundación**

#### **1.1 Cigoto**

#### **1.2 Clivaje**

#### **1.3 Blastulación**

#### **1.4 Gastrulación**

#### **1.5 Diferenciación y morfogénesis**

### **2. Larva**

#### **2.1 Larva en flexión con saco vitelino**

#### **2.2 Larva en flexión**

#### **2.3 Larva en post flexión**

## **1 Huevo**

### **1.0 Pre-fecundación**

#### **ESTADO 0: Huevo sin fecundar**

Los huevos son demersales de forma ovalada irregular de un color blanco amarillento suave, translucido, de 1,55 a 1,85 mm de diámetro, altamente adherentes, con una gota

oleosa de 400 a 430  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estos desarrollaron rápidamente decenas de filamentos los cuales le otorgaron mayor adherencia a superficies.

### Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario de *O. ascotanensis* se describió desde el momento de la fecundación hasta la eclosión, tomando como modelo las descripciones realizadas por Kimmel y col. (1995). Este se dividió en cinco periodos: cigoto, clivaje, blastulación, gastrulación y por último, diferenciación y morfogénesis; los cuales a su vez fueron subdivididos en 21 estados. Si bien el desarrollo constituye un proceso continuo en el cual el embrión no deja de crecer y cambiar, pudiendo existir múltiples estados intermedios, se estableció el tiempo estimado de ocurrencia de cada estado como el momento en el cual los caracteres diagnósticos se completaron según lo descrito en cada estado (Tabla II).

Tabla II: Tabla de desarrollo embrionario de *Orestias ascotanensis* a 20°C ( $\pm 1$  °C)

Periodo	Estado	Descripción	Horas post fecundación (HPF)
Cigoto	1	Huevo indiviso	1 2/3
Clivaje	2	2 células	2 a 2 ½
	3	4 células	3 ½ a 4
	4	8 células	4 ½ a 5 ½

	5	16 células	5 ½ a 6
	6	32 a 64 células	6 ½
<b>Blastulación</b>	7	Blástula	7 ½ a 8
	8	Epibolia al 30%	20
<b>Gastrulación</b>	9	Epibolia al 50%	25
	10	Escudo embrionario	28
	11	Epibolia al 70%	31
<b>Diferenciación y morfogénesis</b>	12	Establecimiento vesículas cerebrales	50
	13	Aparición de cromatóforos	70
	14	Establecimiento copas ópticas, latidos del corazón y primeras contracciones musculares	92
	15	Desarrollo de vesículas óticas y circulación en vasos vitelinos	96
	16	Desarrollo del corazón	140
	17	Aparición de aletas pectorales	166
	18	Delimitación de cavidad corporal	190
	19	Formación del tubo digestivo y cristalino	216
	20	Formación de la esclera, córnea e hígado	288
21	Formación de arcos branquiales y desarrollo de la aleta caudal	308	
		<b>Eclosión</b>	336 a 432

## 1.1 Periodo de cigoto

### ESTADO 1: Huevo indiviso

El cigoto se forma una vez ocurrida la fecundación, seguido por la formación del espacio perivitelino cuya profundidad alcanza alrededor de 125 a 180  $\mu\text{m}$ . Luego de aproximadamente 1 hora y 40 minutos es posible observar el disco embrionario, célula grande y opaca de 650  $\mu\text{m}$  de diámetro ubicada en la cúspide de uno de los polos. La gota oleosa mide cerca de 415  $\mu\text{m}$  de diámetro, y por lo general permanece íntegra. En este momento se establece el polo animal y vegetal del cigoto, definiendo el eje anteroposterior del embrión, cuya región cefálica se formará en el polo animal (PA) y la zona caudal hacia el polo vegetal (PV) (Fig. 6).

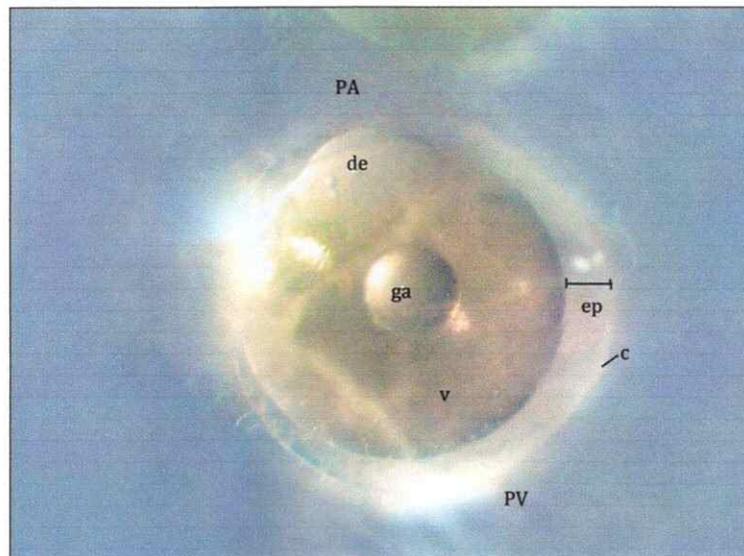


Figura 6: Cigoto con blastodisco de *Orestias ascotanensis* (estado 1) (Aumento 30x): (c) corion, (de) disco embrionario, (ep) espacio perivitelino, (ga) gota oleosa, (PA) polo animal, (PV) polo vegetal y (v) vitelo.

## 1.2 Periodo de clivaje

### ESTADO 2: Dos células

La primera división del blastodisco ocurre luego de 2 a 2,5 horas post fecundación. El clivaje es meroblástico y el surco de clivaje es vertical, generando dos blastómeros simétricos y de gran tamaño (alrededor de 420  $\mu\text{m}$  de diámetro). La gota oleosa se divide parcialmente en algunos de los embriones (Fig. 7).

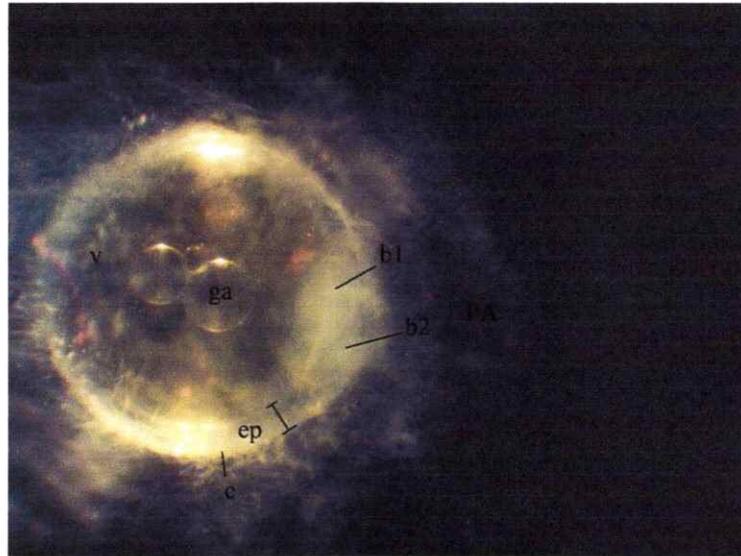


Figura 7: Estado de dos blastómeros de *Orestias ascotanensis* (estado 2) (Aumento 30x): (b1) y (b2) blástomeros, (c) corion, (ep) espacio perivitelino, (ga) gota oleosa, (PA) polo animal y (v) vitelo.

### ESTADO 3: Cuatro células

El segundo surco de clivaje se traza perpendicular al primero dando origen a cuatro células, observándose compactas y altas sobre el gran vitelo. Las células miden cerca de 200  $\mu\text{m}$ . (Fig. 8)

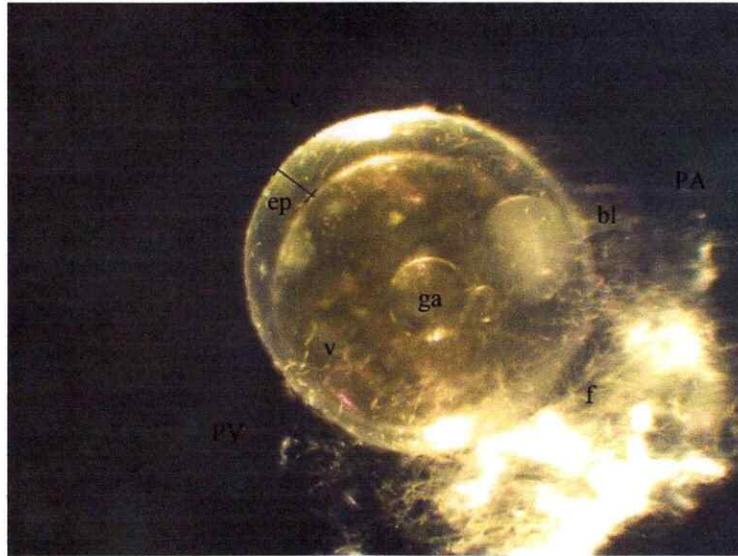


Figura 8: Estado de cuatro blastómeros de *Orestias ascotanensis* (estado 3) (Aumento 30x): (bl) blastómeros, (c) corion, (ep) espacio perivitelino, (f) filamentos, (ga) gotas oleosas, (PA) polo animal, (PV) polo vegetal y (v) vitelo.

### ESTADO 4: Ocho células

El tercer ciclo de clivaje ocurre pasadas las 4,5 horas post fecundación. El surco de clivaje se traza paralelo al primero, generando ocho células de alrededor 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, dispuestas como una sola capa de células. Las gotas oleosas no se dividen o lo hacen ligeramente (Fig. 9).

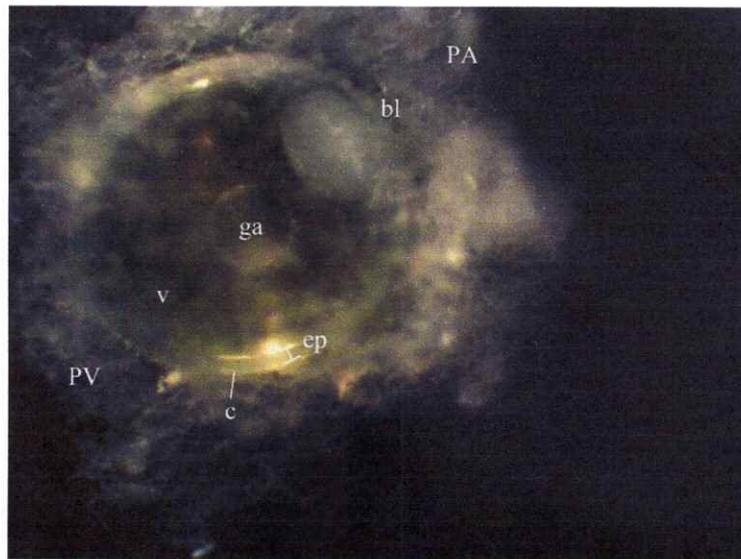


Figura 9: Estado de ocho blastómeros de *Orestias ascotanensis* (estado 4) (Aumento 30x): (b) blastómeros de 8, (c) corion, (ep) espacio perivitelino, (ga) gota oleosa, (PA) polo animal, (PV) polo vegetal y (v) vitelo.

#### **ESTADO 5: 16 células**

El cuarto ciclo de clivaje ocurre entre las 5,5 y 6 horas post fecundación, dando origen a 16 células de alrededor 90  $\mu\text{m}$  de diámetro que se ubican compactas en una capa de células. La gota de aceite se divide parcialmente en algunos casos mientras que en otros sigue intacta (Fig. 10).

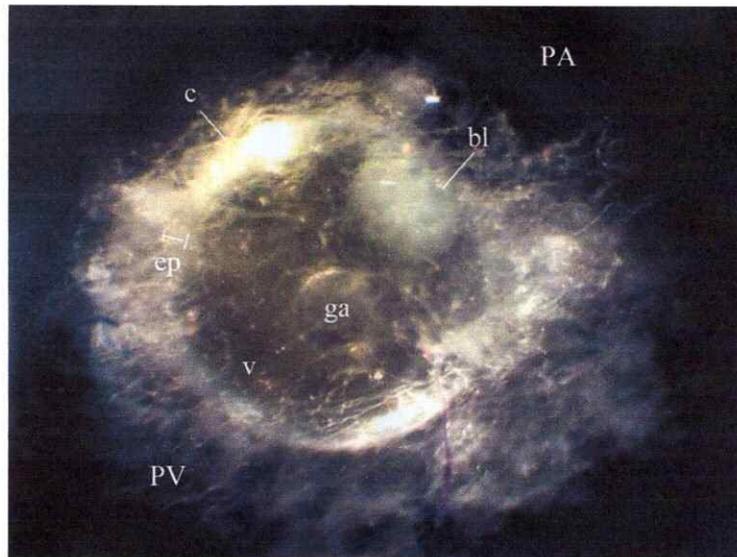


Figura 10: Estado de 16 blastómeros de *Orestias ascotanensis* (estado 5) (Aumento: 30x): (b) 16 blastómeros, (c) corion, (ep) espacio perivitelino, (ga) gota oleosa, (PA) polo animal, (PV) polo vegetal y (v) vitelo.

#### **ESTADO 6: 32 a 64 células**

El quinto y sexto ciclo de clivaje da origen a un embrión de 32 y 64 células, respectivamente. Los clivajes ocurren a menor sincronía que los ciclos anteriores, de manera que las células varían en tamaño, disminuyendo progresivamente su volumen a medida que ocurren las divisiones, con células desde 70 a 40  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Estas se ubican compactas en más de una capa de células, todas posadas sobre el vitelo (Fig.11).

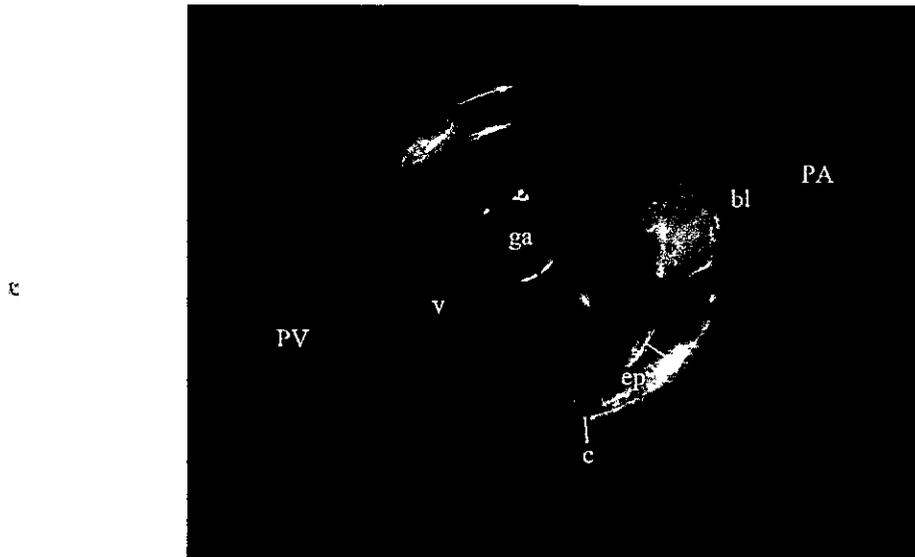


Figura 11; Estado de 32 a 64 células de *Orestias ascotanensis* (estado 6) (Aumento: 30x): (bl) blastómeros, (c) corion, (ep) espacio perivitelino, (ga) gota oleosa, (PA) polo animal, (PV) polo vegetal y (v) vitelo.

### 1.3 Periodo de blastulación

#### ESTADO 7: Blástula

Luego de otro ciclo de divisiones celulares se han generado cientos de células, las cuales se observan compactas conformando una estructura alta y redondeada en forma de cúpula. Pasadas las 7 horas y media post fecundación, las células miden cerca de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 12).

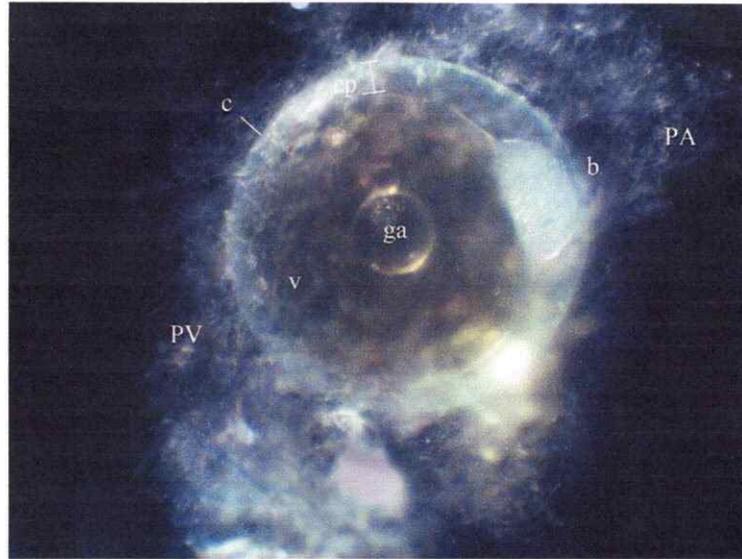


Figura 12: Blástula de *Orestias ascotanensis* (estado 7) (Aumento 30x): (b) Blástula, (c) corion, (ep) espacio perivitelino, (ga) gota oleosa, (PA) polo animal, (PV) polo vegetal y (v) vitelo.

#### **ESTADO 8: Epibolia al 30%**

Luego de reiterados ciclos de clivaje las células ya no son distinguibles unas de otras bajo el lente del microscopio óptico. Por efecto de movimientos epibólicos, la blástula comienza a bajar y extenderse superficialmente por el vitelo en dirección al ecuador de la célula vitelínica. En este estado ya ha bajado un tercio de la superficie total (Fig. 13).

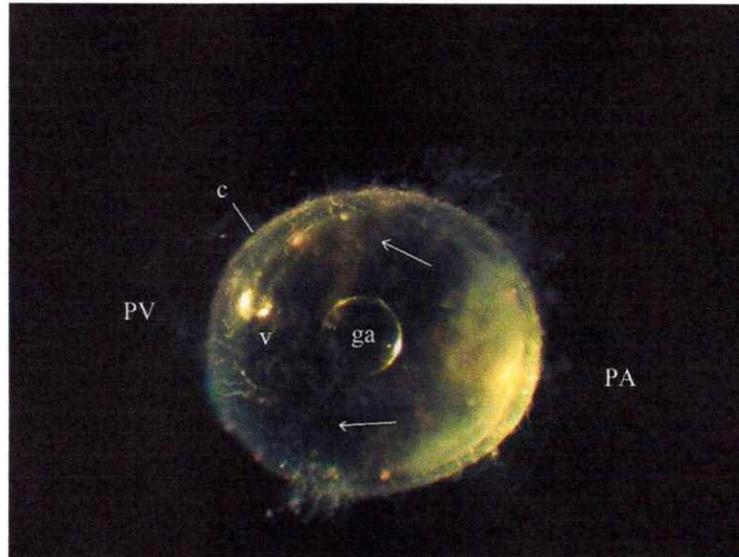


Figura 13: Epibolia al 30% de *Orestias ascotanensis* (estado 8) (Aumento: 30x): (c) corion, (ga) gota oleosa, (PA) polo animal, (PV) polo vegetal, (v) vitelo y flechas indican la dirección de los movimientos epibolicos.

#### 1.4 Periodo de gastrulación

##### ESTADO 9: Epibolia al 50%

Los movimientos epibolicos desplazan las células hacia el polo vegetal, hasta el ecuador de la célula vitelínica formando un engrosamiento del blastodermo en el ecuador de esta, llamado anillo germinal (Fig.14).

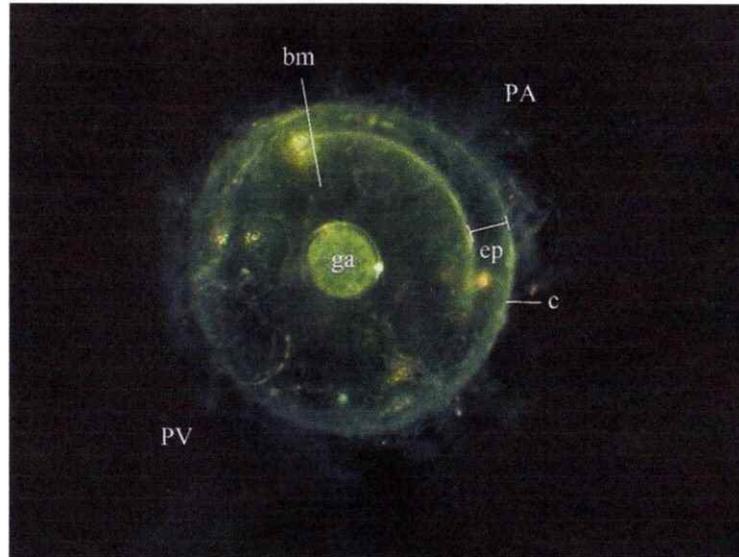


Figura 14: Epibolia al 50% de *Orestias ascotanensis* (estado 9) (Aumento 30x): (bm) blastodermo, (c) corion, (ep) espacio perivitelino, (ga) gota oleosa, (PA) polo animal y (PV) polo vegetal.

#### **ESTADO 10: Escudo embrionario**

Por movimientos de epibolia, involución y convergencia, las células se desplazan convergiendo en una estructura densa triangular llamada escudo embrionario. En este momento se define el eje dorso-ventral del individuo (Fig. 15).

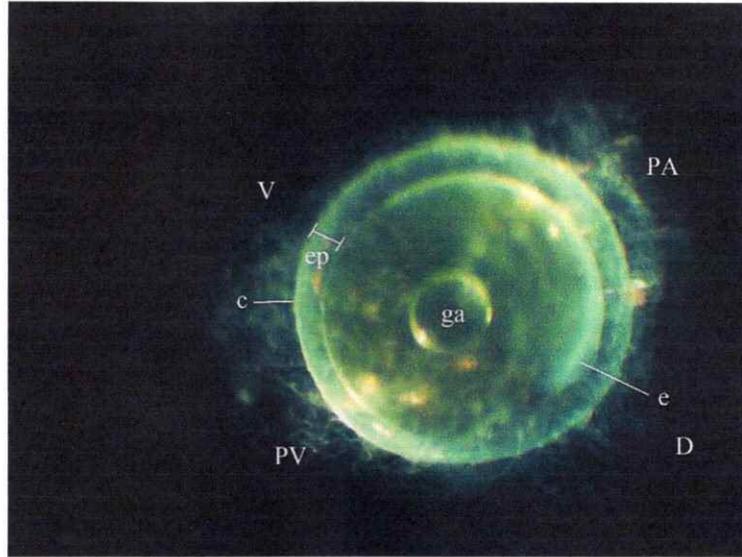


Figura 15: Escudo embrionario de *Orestias ascotanensis* (estado 10) (Aumento: 30x): (c) corion, (D) y (V) eje dorsoventral, (e) escudo embrionario, (ep) espacio perivitelino, (ga) gota oleosa, (PA) polo animal y (PV) polo vegetal.

#### **ESTADO 11: Epibolia 70%**

Los movimientos epibólicos desplazan las células hacia el vitelo, cubriendo un 70% de su área total. El escudo embrionario, por su parte, se ha extendido y alargado a lo largo del eje anteroposterior por migración de sus células. La gota oleosa por lo general coalesce (Fig. 16).

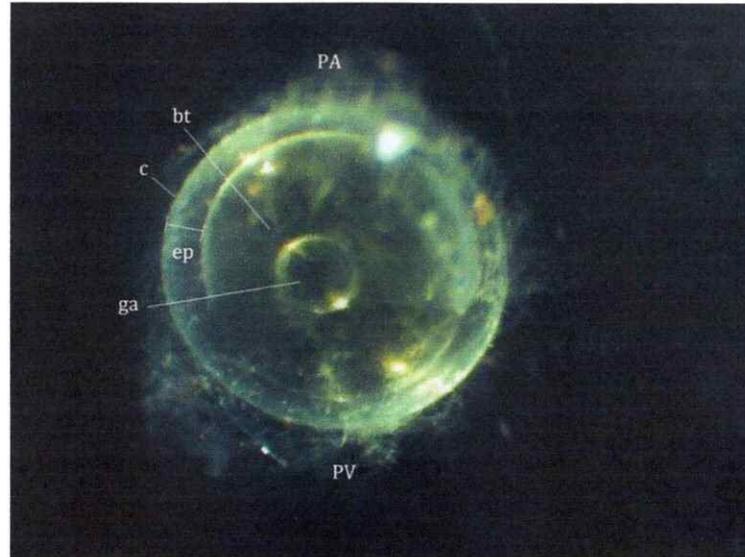


Figura 16: Epibolia 60-70% de *Orestias ascotanensis* (estado 11) (Aumento: 30x): (bt) blastodermo, (c) corion, (ep) espacio perivitelino, (ga) gota oleosa, (PA) polo animal y (PV) polo vegetal.

### 1.5 Periodo de diferenciación y morfogénesis

#### ESTADO 12: Establecimiento vesículas cerebrales

Hacia el final del segundo día luego de la fecundación, se establece la cresta neural y pasadas las 50 horas, esta se ha expandido formando estructuras más definidas. Se establecen vesículas cerebrales rudimentarias las cuales darán origen al Prosencéfalo en la zona anterior, Mesencéfalo en la región media y el Romboncéfalo hacia la región posterior. Primordios de las vesículas ópticas se desarrollan lateralmente en la zona anterior de las vesículas cerebrales, estas son estructuras cilíndricas a ovaladas de 215  $\mu\text{m}$  de largo. El embrión se dispone rodeando  $\frac{1}{2}$  del vitelo (Fig. 17).

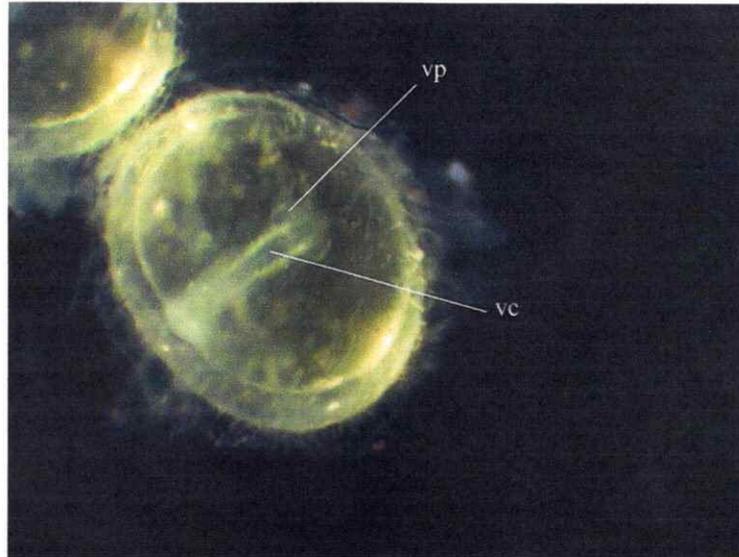


Figura 17: Vista dorsal de vesículas cerebrales de *Orestias ascotanensis* (estado 12) (Aumento: 30x): (vp) vesículas ópticas y (vc) vesículas cerebrales rudimentarias.

### **ESTADO 13: Aparición de cromatóforos**

El embrión ya rodea 3/5 del vitelo y ha desarrollado los primeros somitos. Vesículas cerebrales y ópticas se han engrosado y la zona media presenta una coloración interna amarilla intensa. Adicionalmente, aparecen los primeros cromatóforos estrellados de 30 a 40  $\mu\text{m}$ , algunos de color marrón oscuro (melanóforos) y otros blancos los cuales adquieren un color anaranjado intenso durante la exposición directa de la luz (iridóforos). Estos se disponen dibujando perimetralmente al embrión concentrándose en vesículas cerebrales y somitos, y de forma relativamente uniforme en vitelo, con excepción de la zona próxima al extremo anterior del embrión en la cual se disponen dibujando una circunferencia en torno a la región cefálica. El patrón de pigmentación, además del tamaño y forma de las células pigmentadas puede variar entre los individuos (Fig.18).

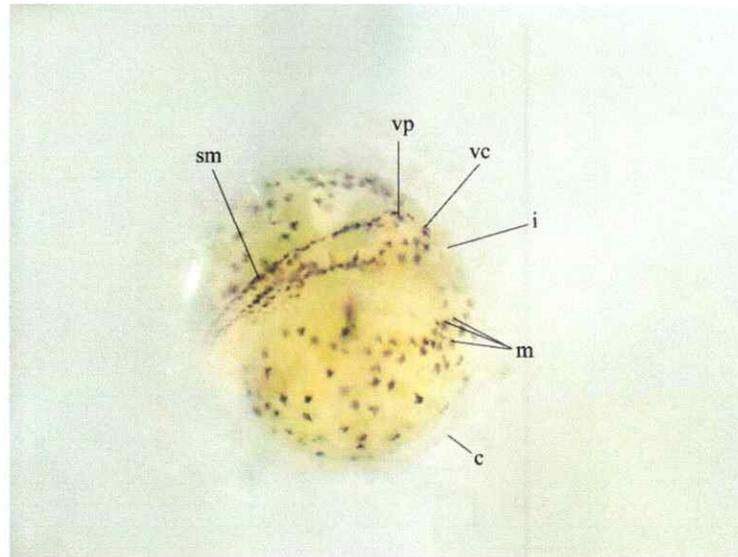


Figura 18: Primeros cromatóforos y somitos de *Orestias ascotanensis* (estado 13) (Aumento: 30x): (c) corion, (i) iridóforos, (m) melanóforos, (sm) somitos, (vc) vesículas cerebrales y (vp) vesículas ópticas.

**ESTADO 14: Establecimiento de copas ópticas, primeros latidos del corazón y primeras contracciones musculares.**

A las 90 horas post fecundación el embrión ya rodea 3/4 del vitelo y se han establecido las copas ópticas, estructuras transparentes de forma ovalada que alcanzan 260  $\mu\text{m}$  de diámetro. El primordio del corazón ya se ha formado y comienza a latir tempranamente, este posee una forma tubular de aproximadamente 270  $\mu\text{m}$  de largo, transparente, con dos pequeñas válvulas vasculares de color blanco, las cuales se mueven con las contracciones musculares de este corazón rudimentario el cual se ubica en la parte ventral de los lóbulos ópticos. A los latidos del corazón lo acompañan los primeros movimientos zigzagantes del extremo desprendido de la cola (Fig. 19).

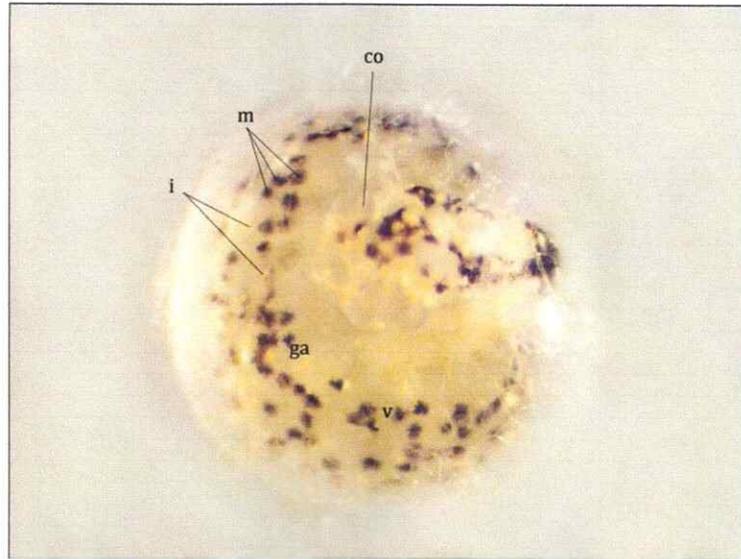


Figura 19: Establecimiento de copas ópticas, primeros latidos del corazón y contracciones musculares de *Orestias ascotanus* (estado 14) (Aumento: 40x): (co) copas ópticas, (ga) gota oleosa, (v) vitelo, (m) melanóforos, (i) iridóforos y (s) somitos.

#### **ESTADO 15: Desarrollo de vesículas óticas y circulación de los vasos vitelinos**

Las tres partes del cerebro (prosencefalo, mesencefalo y rombencefalo) ya son distinguibles entre si y las copas ópticas siguen creciendo. Estas alcanzan cerca de 320  $\mu\text{m}$  antes de comenzar a melanizarse trazando estructuras preliminares de los futuros ojos. Los embriones comienzan a tomar otras tonalidades, con la aparición de nuevos pigmentos de colores amarillo y naranja, producidos por xantóforos y/o eritróforos. El par de vesículas óticas ya se han desarrollado y poseen 2 otolitos cada una, estas constituyen estructuras ovaladas translúcidas de alrededor 80  $\mu\text{m}$  de diámetro que se ubican en ambos costados de la región posterior de la cabeza. Por otra parte, los vasos

vitelinos ya comienzan a conducir el flujo sanguíneo, quienes reciben el flujo desde la aorta y la conducen hacia el corazón (Fig. 20).

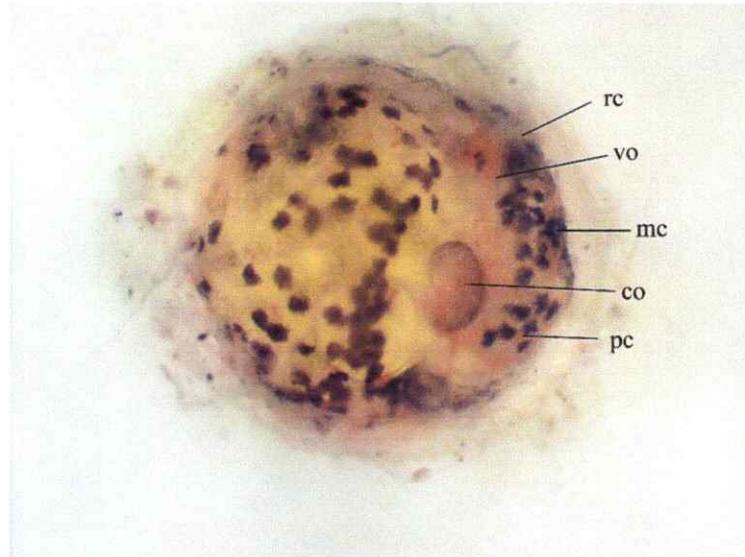


Figura 20: Vista lateral de embrión de *Orestias ascotanensis* (estado 16) (Aumento: 40x): (co) copas ópticas, (mc) mesencéfalo, (pc) prosencéfalo, (rc) romboncéfalo y (vo) vesícula ótica.

#### **ESTADO 16: Desarrollo del corazón**

El embrión rodea 5/6 del vitelo y la parte desprendida de la cola se mueve hacia izquierda y derecha, enroscándose en forma de gancho. La fisura de la boca ya se ha trazado entre las copas ópticas, las cuales ya alcanzan cerca de 380  $\mu\text{m}$  de longitud. Se ha pigmentado la retina y delimitado las estructuras de la cámara posterior del ojo. Luego de las 166 horas post fecundación las copas ópticas comienzan poco a poco a envolverse de una

cubierta tornasolada. El corazón ha crecido, distinguiendo las cámaras del corazón, seno venoso, atrio, ventrículo y bulbo arterioso. Desde una vista frontal de la cabeza, el atrio y ventrículo alcanzan una longitud cercana a 110  $\mu\text{m}$  y 180  $\mu\text{m}$  respectivamente. La producción de eritrocitos ha ocurrido paulatinamente desde alrededor las 123 horas post fecundación y en este estado el corazón se ve rojo por el flujo de sangre que es propulsada en cada doble latido del corazón. La sangre fluye desde los vasos vitelinos hacia el seno venoso conduciéndola hacia el atrio, y este a su vez, hacia el ventrículo, cuyo paso es mediado por las válvulas atrioventriculares. El flujo de salida del corazón continúa desde el ventrículo hacia el bulbo arterioso, y este hasta la aorta ventral (Figs. 21 y 22).

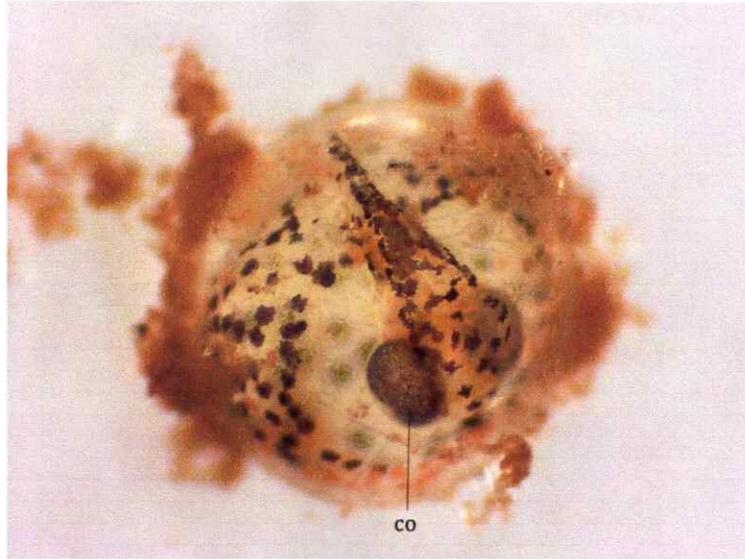


Figura 21: Vista dorsal de *Orestias ascotanensis* (estado 16) (Aumento 35x): (co) copas ópticas.

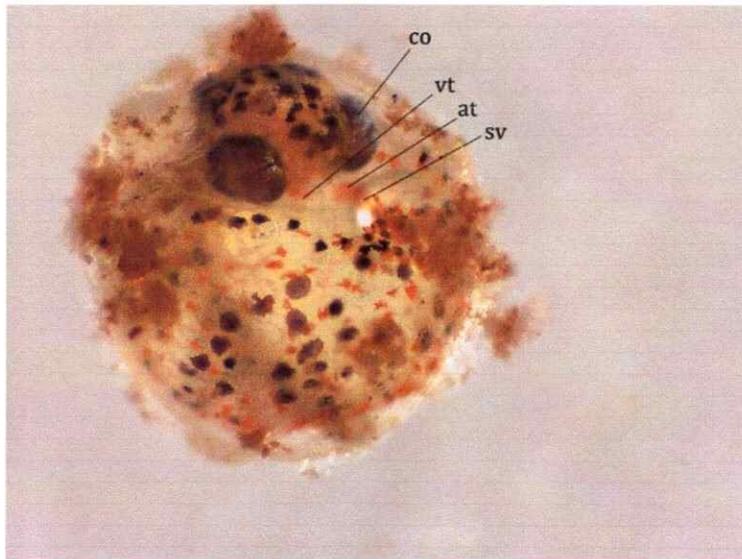


Figura 22: Vista frontal de embrión de *Orestias ascotanensis* (estado 16) (Aumento 35x): (at) atrio, (co) copas ópticas, (sv) seno venoso y (vt) ventrículo.

### ESTADO 17: Desarrollo de aletas pectorales

El embrión ya casi toca su cabeza y ya es posible observar pequeñas aletas pectorales que varían entre 0,33 a 0,38 mm de longitud. Estas son translúcidas de borde redondeado, ubicadas en ambos costados entre el mesencéfalo y el rombocéfalo (Figs. 23 y 24).

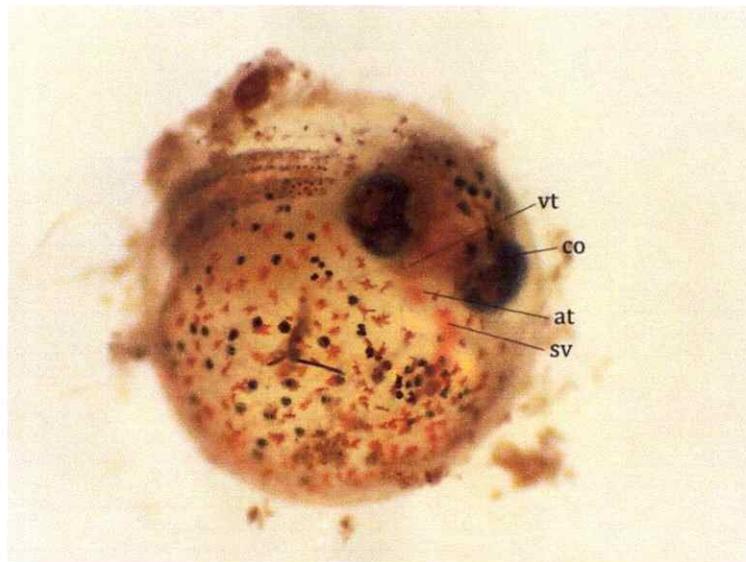


Figura 23: Vista frontal de *Orestias ascotanensis* (estado 17) (Aumento 35x): (at) atrio, (co) copas ópticas, (sv) seno venoso y (vt) ventrículo.

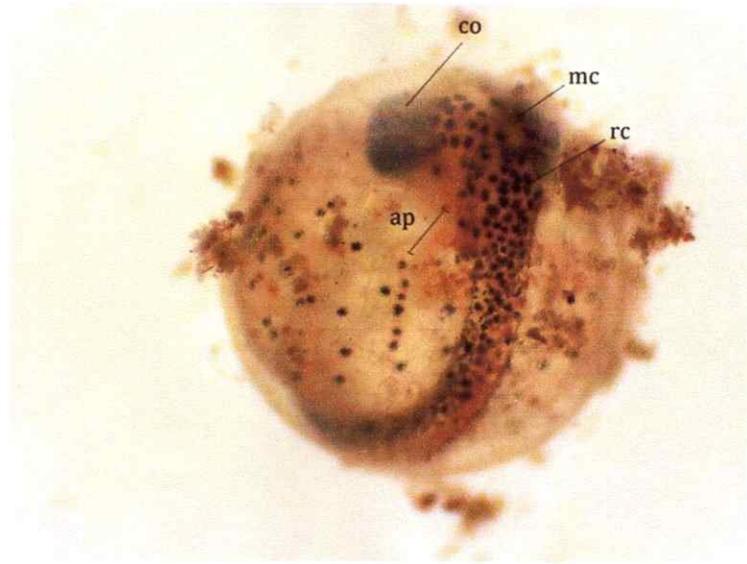


Figura 24: Vista dorso posterior de *Orestias ascotanensis* (estado 17) (Aumento 35x): (ap) aletas pectorales, (co) copas ópticas, (mc) mesencéfalo y (rb) rombocéfalo.

### **ESTADO 18: Delimitación de la cavidad corporal y comienzo de la formación de la aleta caudal**

Cerca de las 192 horas el embrión ya toca su cabeza con la cola y la aleta caudal ya comienza su formación. La retina ha continuado su pigmentación, presentando un color plateado tornasol, además de la diferenciación de las estructuras de la cámara posterior del ojo. A esto lo acompaña el engrosamiento de la zona lateral de la cabeza y delimitación de la cavidad corporal sobre el saco vitelino la cual envuelve un área entre el 8 a 10% del área total (Figs. 25 y 26).

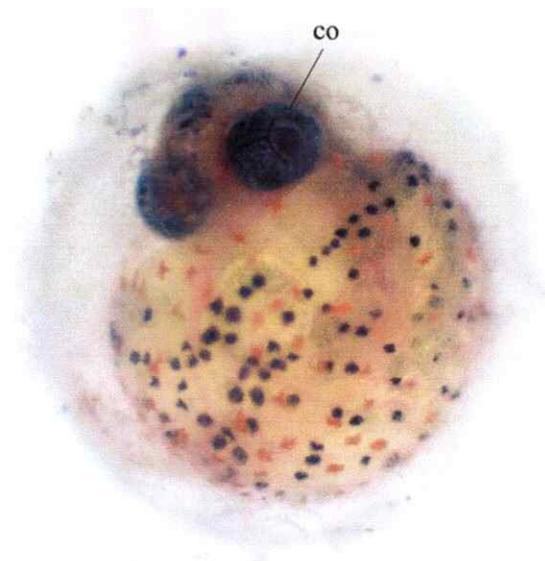


Figura 25: Vista frontal de *Orestias ascotanensis* (estado 18) (Aumento 40x): (co) copas ópticas.

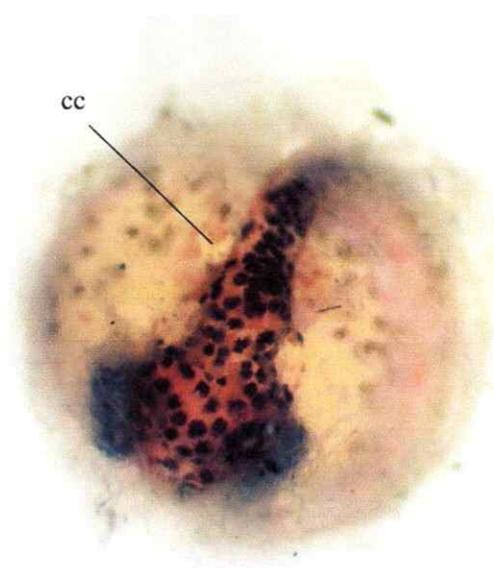


Figura 26: Vista dorsal de *Orestias ascotanensis* (estado 18) (Aumento 40x): (cc) cavidad corporal.

### ESTADO 19: Formación del tubo digestivo y cristalino

La aleta caudal ha crecido y presenta al menos 3 a 4 rayos a las 216 horas post fecundación. La cabeza, cola y cavidad corporal han aumentado su tamaño, cubriendo esta última, un área cercana al 15% del área total del saco vitelino, zona que gradualmente se cubre de pigmentos y recubre de una cubierta plateada. El tubo digestivo se ha desarrollado completamente, formando una estructura tubular de color anaranjado fuerte que se extiende desde el final de la cabeza hasta el poro urogenital, en posición ventral a los somitos. El cristalino, por su parte, se ha desarrollado en el centro del ojo, siendo una estructura esférica transparente sobresaliente de 120  $\mu\text{m}$  de diámetro. En el caso de las vesículas óticas han crecido y formado una estructura de forma circular de un diámetro de 165  $\mu\text{m}$ . (Figs. 27, 28 y 29).

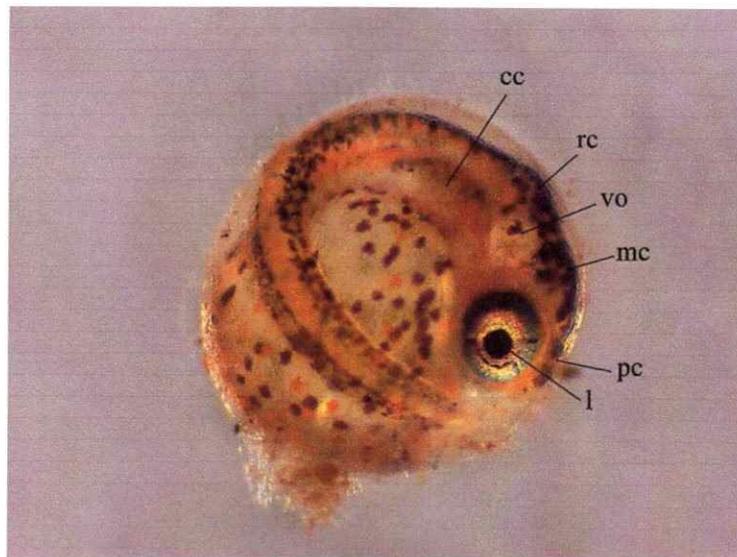


Figura 27: Vista lateral de *Orestias ascotanensis* (estado 19) (Aumento 35x): (cc) cavidad corporal, (co) ojo, (mc) mesencéfalo, (pc) prosencéfalo, (rc) romboncéfalo, (vl) vesícula del lente y (vo) vesícula ótica.

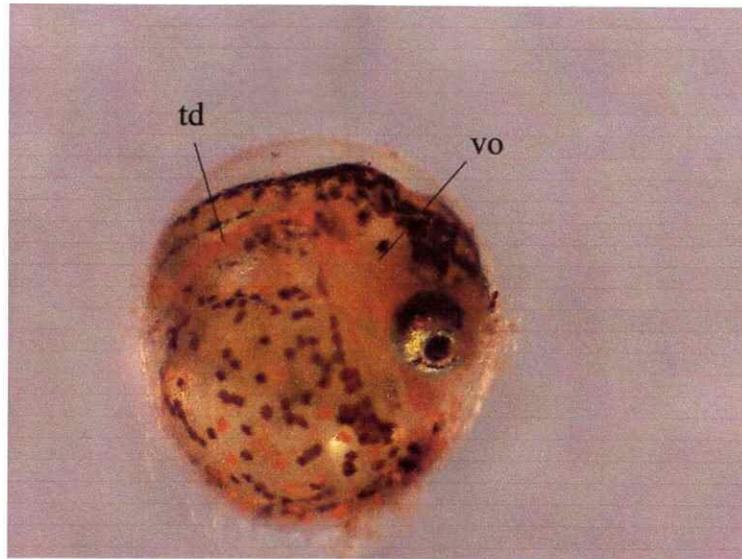


Figura 28: Vista lateral de embrión de *Orestias ascotanensis* (estado 19) (Aumento 35x): (td) tubo digestivo y (vo) vesícula ótica.

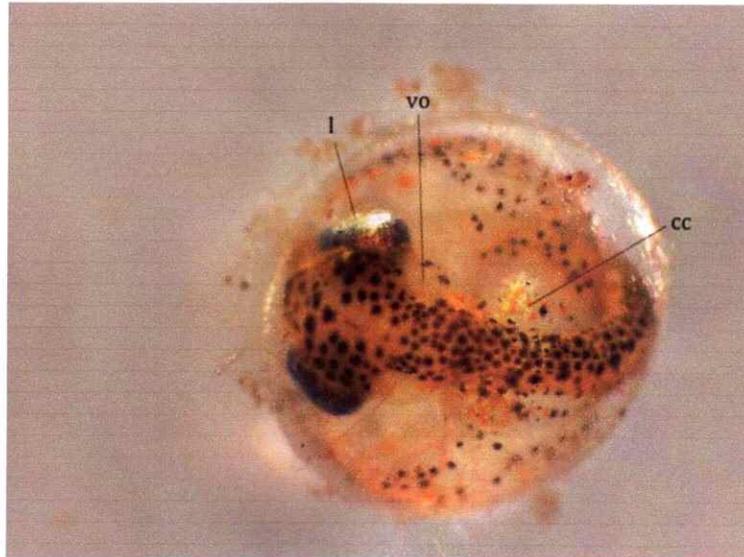


Figura 29: Vista dorsal de embrión de *Orestias ascotanensis* (estado 19) (Aumento 35x): (cc) cavidad corporal, (l) lente o cristalino y (vo) vesícula ótica.

### ESTADO 20: Desarrollo de la esclera, córnea e hígado.

Los ojos de los embriones desarrollan la esclera, cubierta transparente de aspecto gelatinoso que envuelve la zona posterior de los ojos. Luego, en la zona anterior se forma la córnea en forma de cúpula delante del cristalino. En la zona anterior de la cabeza ya se ha formado las mandíbulas superior e inferior, permitiendo a los embriones abrir y cerrar la cavidad bucal. En el lado izquierdo de la cavidad corporal en posición ventral se observa el hígado, órgano ovalado amarillo intenso de 175  $\mu\text{m}$  de largo. De manera gradual, los vasos sanguíneos del saco vitelino se han ramificado a través de este (Fig.31). La pigmentación de la cavidad corporal se intensifica y desarrolla tejido muscular (Figs. 30, 31 y 32).



Figura 30: Vista dorsal *Orestias ascotanensis* (estado 20) (aumento: 35x): (ac) aleta caudal, (bo) boca, (c) corion, (cr) córnea, (es) esclera y (l) lente o cristalino.

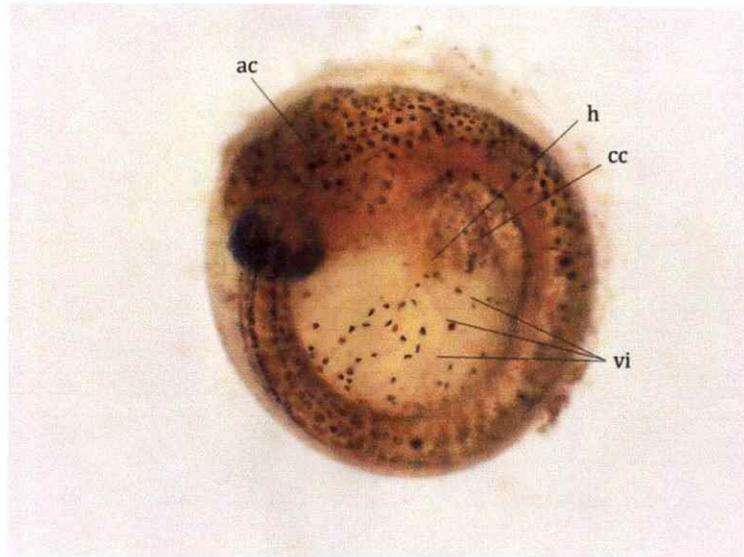


Figura 31: Vista dorsolateral izquierda de embrión de *Orestias ascotanensis* (estado 20) (Aumento 35x): (ac) aleta caudal, (cc) cavidad corporal, (h) hígado y (vi) vasos vitelinos.

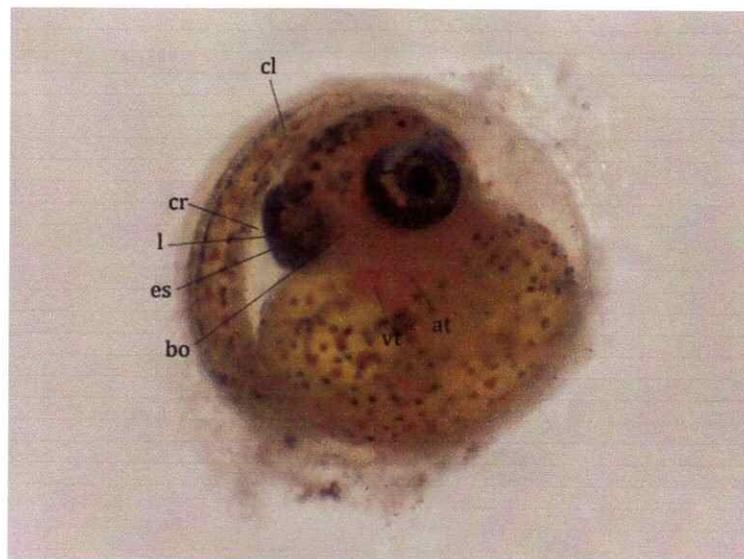


Figura 32: Vista frontal embrión de *Orestias ascotanensis* (estado 20) (Aumento 35x): (at) atrio, (bo) boca abierta, (cl) cola, (cr) córnea, (es) esclera, (l) cristalino y (vt) ventrículo.

### ESTADO 21: Formación de los arcos branquiales

El embrión se mueve bastante girando incluso hasta 360° grados dentro del corion. Los arcos branquiales se han formado en posición ventral a las vesículas óticas, y el opérculo a ratos se mueve ligeramente. La base de los ojos ha desarrollado tejido muscular, lo que les permite moverlos de un lado a otro en un ángulo de alrededor 15°. La aleta caudal ya presenta entre 7 u 8 rayos, la cual se posa sobre el dorso del embrión y alcanza hasta 725 µm de longitud. Además, se puede apreciar un cambio en el patrón de pigmentación, observando una migración de cromatóforos de la zona anteroinferior del saco vitelino hacia la zona del corazón (Figs. 33 y 34).

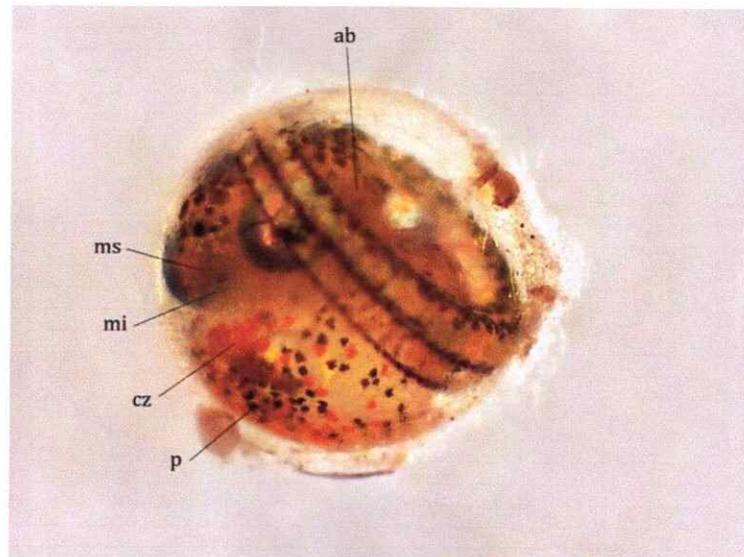


Figura 33: Vista lateral de embrión de *Orestias ascotanensis* (estado 21) (Aumento 35x): (ab) arcos branquiales, (cz) corazón, (mi) mandíbula inferior, (ms) mandíbula superior y (p) pigmentación intensa en zona anteroinferior del saco vitelino.

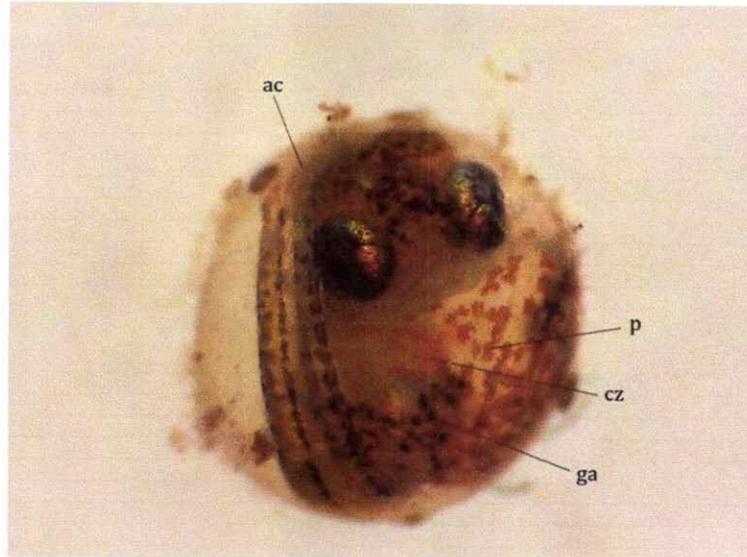


Figura 34: Vista frontal embrión de *Orestias ascotanensis* (estado 21) (aumento: 35x): (ac) aleta caudal, (cz) corazón, (ga) gota oleosa y (p) pigmentación intensa en zona anteroinferior del saco vitelino.

### **Eclosión**

Al cabo de 14 a 18 días ocurre la eclosión. Momento en el cual el embrión gira energéticamente y se desprende del corion (Fig. 35).

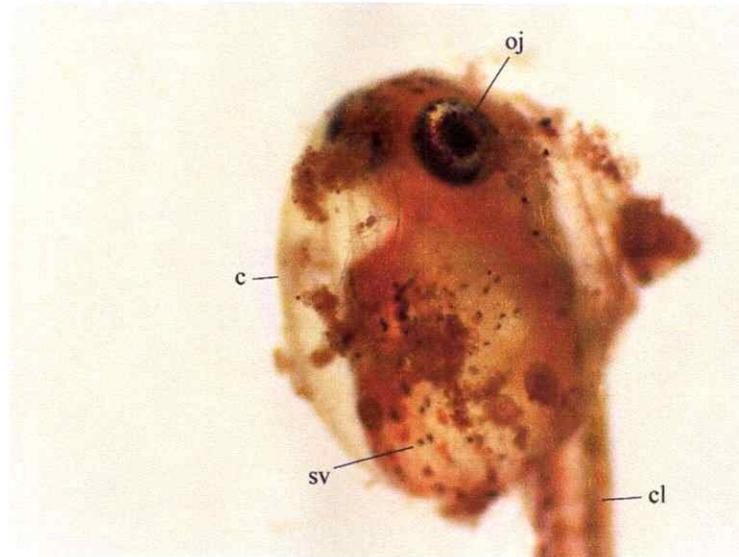


Figura 35: Embrión de *Orestias asoetanensis* en el momento de la eclosión, aun con parte del corion sin desprender (Aumento 35x): (c) corion, (cl) cola, (oj) ojo y (v) saco vitelino

## 2 Larva

Los estadios larvales de *Orestias asoetanensis* fueron clasificados según lo propuesto por Ahlstrom y Ball 1954, Kendall y col. 1984 y Nakatani y col. 2001, adaptado a los resultados obtenidos. En la Tabla III se detallan los caracteres diagnósticos y el tiempo de ocurrencia de cada estado.

Tabla III: Resumen estadios larvales de *Orestias ascotanensis*

Estado Larval	Características	Días post eclosión (DPE)
Larva en flexión con saco vitelino	Desde la eclosión hasta la absorción del saco vitelino. Notocorda ya flexionada.	Desde 0 hasta 5 a 7 días
Larva en flexión	Desde la absorción del saco vitelino hasta la segmentación temprana de los rayos de las aletas dorsal y anal.	Desde 5 a 7 días hasta 17 a 23 días
Larva en postflexión	Desde la orientación temprana de los rayos de las aletas dorsal y anal hasta la absorción de la aleta membranosa y aparición de escamas.	Desde 18 a 24 días hasta 90-105 días (aprox.)

### 2.1 Larva en flexión con saco vitelino

Las larvas recién eclosionadas miden entre 4,4 y 5,2 mm de longitud estándar, presentan una aleta caudal de 11 a 12 rayos, aletas pectorales carentes de estructuras óseas de 0,45 a 0,5 mm y una aleta membranosa que se extiende de forma continua en ambos lados, dorsal y ventral, desde el poro urogenital hasta el extremo caudal. El saco vitelino al momento de la eclosión mide entre 1,2 y 1,4 mm de largo y 0,5 a 0,7 mm de ancho, disminuyendo progresivamente de tamaño hasta su absorción completa al cabo de 5 a 7 días. La gota oleosa inicialmente se ubica detrás del corazón, sin embargo cuando la larva se comienza a movilizar esta se ubica en la zona media del saco vitelino. Los ojos y cavidad bucal se encuentran desarrollados por completo permitiéndoles realizar los primeros intentos de caza. El primer día las larvas son poco activas manteniéndose

recostadas en el fondo, sin embargo desde el segundo las larvas se desplazan y alimentan. Las larvas son altamente pigmentadas exhibiendo tonos marrones oscuros y claros, naranjas y amarillos. Melanóforos se concentran en línea lateral y dorso, en especial en la cabeza en forma de manchas o lunares extendiéndose hacia el extremo caudal. Cada individuo presenta sus propias variaciones en el patrón de pigmentación, permitiendo la identificación a nivel de individuo. En relación a la alimentación, las larvas durante este periodo seleccionan las presas de menor tamaño, del surtido que se les entrega, como rotíferos (*Brachionus spp.*), copépodos y estadios tempranos de *Artemia (nauplius)*, cultivados en laboratorio.

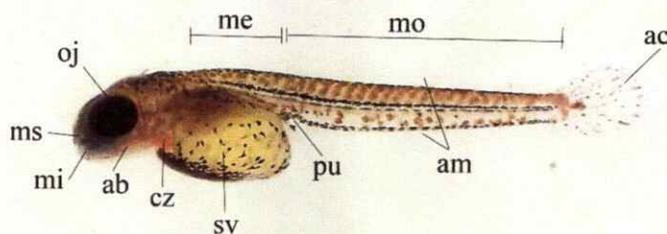


Figura 36: Larva en flexión con saco vitelino recién eclosionada de *Orestias ascotanensis* (Aumento: 8x): (ac) aleta caudal, (am) aleta membranosa, (ap) aletas pectorales, (oj) ojo, (pu) poro urogenital y (sv) saco vitelino.

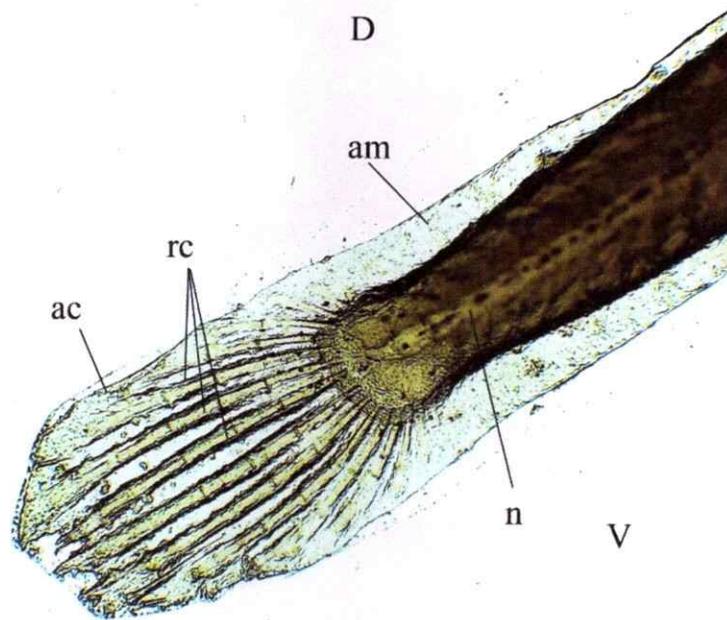


Figura 37: Detalle del extremo caudal de larva en flexión con saco vitelino de *Orestias ascotanensis* (Aumento: 40x): (ac) aleta caudal, (am) aleta membranosa, (D) eje dorsal, (n) notocorda, (rc) rayos caudales y (V) eje ventral.

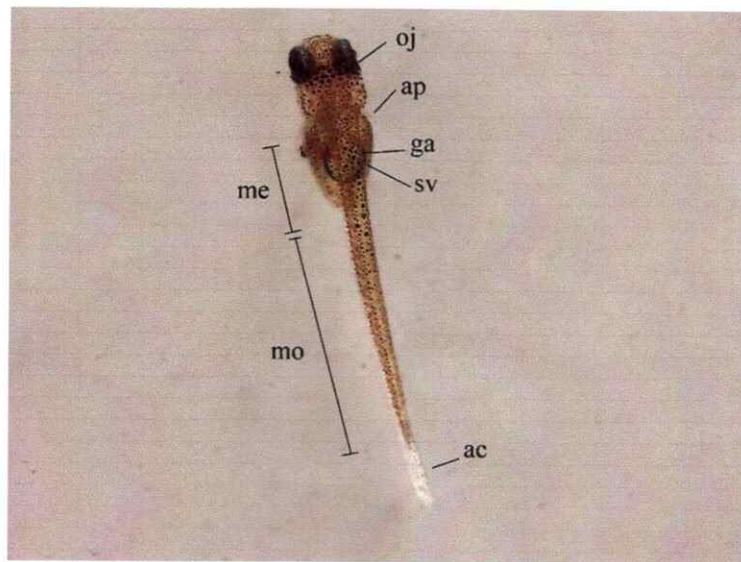


Figura 38: Vista dorsal de larva flexión con saco vitelino de *Orestias ascotanensis* (Aumento: 8x): (ac) aleta caudal, (ap) aleta pectoral, (ga) gota oleosa, (me) miómeros pre anales, (mo) miómeros post anales, (oj) ojo y (sv) saco vitelino.

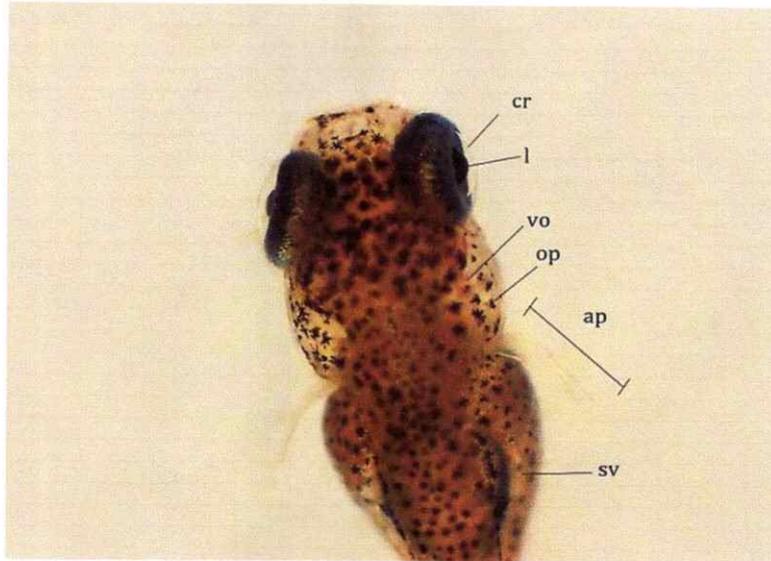


Figura 39: Detalle de la cabeza de larva en flexión con saco vitelino recién eclosionada de *Orestias ascotanensis* (Aumento: 35x): (ap) aletas pectorales, (cr) córnea, (l) cristalino, (op) opérculo, (sv) saco vitelino y (vo) vesícula ótica.

## 2.2 Larva en flexión

Luego de la absorción del saco vitelino, la mortalidad aumenta considerablemente (cerca del 52% de las muertes se dan en este periodo). Entre 17 a 23 días posterior a la eclosión, las larvas miden cerca de 6,1 a 6,5 mm de longitud estándar y la aleta caudal ya posee cerca de 16 a 18 rayos. Los rayos de las aletas dorsal y anal se comienzan a formar, primero la anal y luego la dorsal, ambas ubicadas a la misma distancia, a continuación del poro urogenital. La aleta membranosa va lentamente en retroceso. Hacia el final de este estado la pigmentación se ha intensificado bastante en especial en el dorso de la cabeza donde se observa un corazón invertido de tonos marrones (melanóforos) rodeados

de tonos iridiscentes, los cuales poco a poco se extienden hacia el extremo caudal. Tonos verdes azulados comienzan a aparecer en la zona media del cuerpo (Fig. 42).

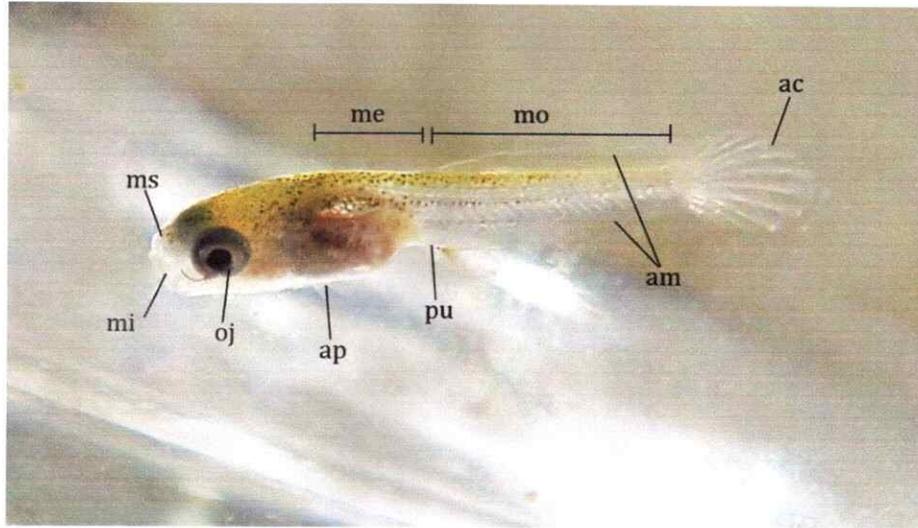


Figura 40: Vista lateral de larva en flexión de *Orestias ascotanensis* con el saco vitelino absorbido (Aumento: 8x): (ac) aleta caudal, (am) aleta membranosa, (ap) aleta pectoral, (me) miómeros preanales, (mi) mandíbula inferior, (mo) miómeros postanales, (ms) mandíbula superior, (oj) ojo y (pu) poro urogenital.

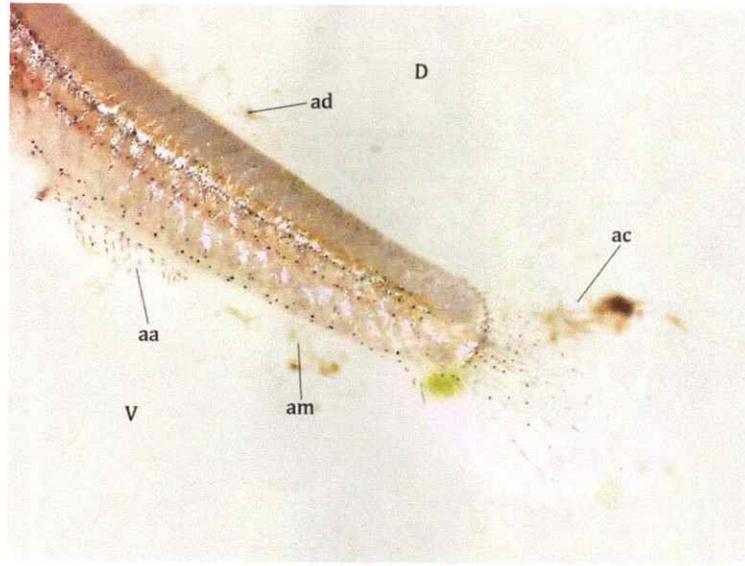


Figura 41: Vista lateral de la zona caudal de larva flexión de *Orestias ascotanensis* (Aumento:40x): (aa) aleta anal, (ac) aleta caudal, (ad) aleta dorsal, (am) aleta membranosa, (D) eje dorsal y (V) eje ventral.



Figura 42: Vista dorsal de *Orestias ascotanensis* hacia el final del periodo de larva en flexión donde se observa la pigmentación del dorso en forma de corazón invertido (Aumento: 20x).

### 2.3 Larva post flexión

Debido a la dificultad asociada a la determinación del número de rayos de las aletas y la presencia de escamas en individuos vivos, el tiempo de ocurrencia del estado de post flexión se estimó en base a individuos recolectados en terreno. Luego de 40 días post eclosión la larva ha crecido hasta alcanzar cerca de 9,8 mm de longitud estándar. Posee entre 20 a 21 rayos caudales, 10 rayos dorsales y 10 anales (Fig. 43 y 44). Los pigmentos iridiscentes se han extendido hacia el extremo caudal trazando líneas longitudinales en dorso y costados, tonos verdes azulados se extienden en la cavidad abdominal y tonos amarillos y anaranjados. Luego de 60 días post eclosión (2 meses) las larvas alcanzan cerca de 1 mm de longitud estándar. Cerca de los dos meses y medio de vida los individuos comienzan paulatinamente a preferir presas más grandes, como artemias en estados de nauplio tardío o juvenil, donde zooplancton de tallas menores parecen no ser vistos con facilidad. Se estima que entre 90 a 105 días (3 a 3,5 meses) luego de la eclosión las larvas miden entre 16 a 17,5 mm de longitud estándar, poseen cerca de 30 rayos caudales, 12 rayos pectorales, 15 rayos dorsales y 15 anales; momento el cual comienzan a desarrollar escamas (Fig. 45 y 46).



Figura 43: Detalle del patrón de pigmentación, al contacto de la luz directa en larva en postflexión de 40 días de *Orestias ascotanensis* (Aumento: 12x).

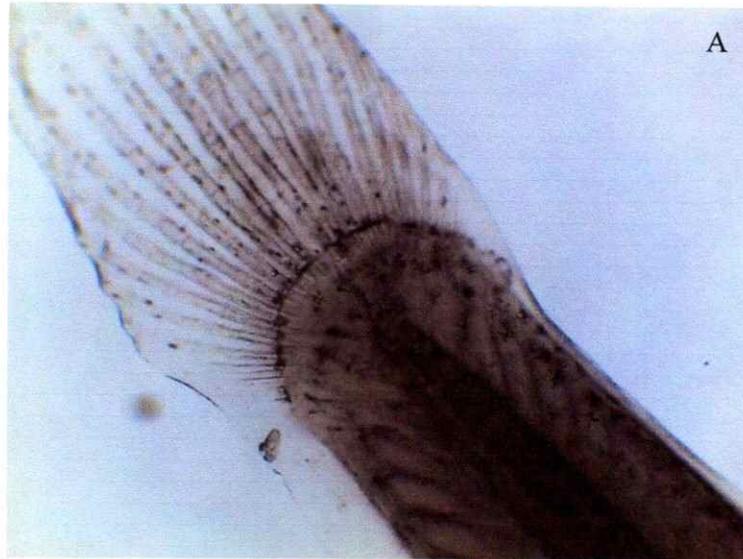


Figura 44: A: Detalle de rayos caudales (Aumento:100x) y B: rayos anales de larva en postflexión (Aumento: 400x) de 40 días de *Orestias ascotanensis*.

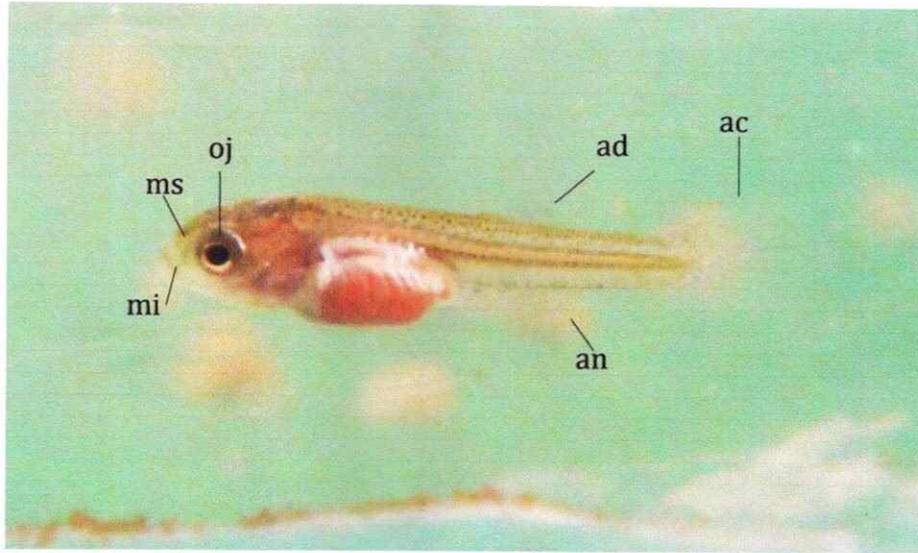


Figura 45: Larva post flexión de 61 días de *Orestias ascotanensis*. Nótese el abdomen hinchado por la reciente ingesta de alimento: (ac) aleta caudal, (ad) aleta dorsal, (an) aleta anal, (mi) mandíbula inferior, (ms) mandíbula superior y (oj) ojo.

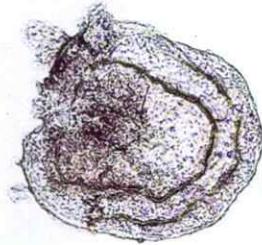


Figura 46: Escama de la línea lateral de larva de 17 mm de longitud estándar de *Orestias ascotanensis* (Aumento: 100x).

## Discusión

La inducción al desove en cautiverio de *O. ascotanensis* presentó dificultades siendo posible sólo conseguir el desove del 13,6% de las hembras sometidas a terapia hormonal con *Ovaprim*®. Esto se pudo deber a la ausencia de señales ambientales reguladoras de los ciclos reproductivos, de sitios apropiados para el desove o al stress del cautiverio, que en conjunto pudieron causar disfunciones reproductivas importantes como ausencia de desarrollo gonadal y ausencia de maduración final de los oocitos y/o del desove (Carrillo y Rodríguez, 2001; Valdebenito, 2008). Pese a lo anterior, este estudio constituye la primera fecundación artificial en laboratorio de *Orestias ascotanensis*, y también del género *Orestias* en Chile, permitiendo la descripción del desarrollo embrionario y estadios larvales.

Los ovarios de *Orestias ascotanensis* presentaron un stock de ovocitos de distintos diámetros, desde menos de 0,1 mm a 2 mm, los cuales se distribuyeron de manera aleatoria en el ovario. Si bien no se realizaron estudios que involucraran cortes histológicos en gónadas ni ovocitos, los resultados sugieren fuertemente un desarrollo ovocitario asincrónico o sincrónico en más de dos grupos. Los ovocitos en estadios más avanzados se desarrollarían hasta experimentar un proceso de hidratación para finalmente ser liberados al exterior durante el desove, y luego de igual forma con los de estadios más tempranos (Balbotin, 1989; Vazzoler, 1996). Además, la inducción al desove dio como resultado pequeñas puestas de 10 a 17 ovas, constituyendo una baja fecundidad parcial. Los huevos midieron entre 1,55 a 1,85 mm de diámetro, tamaño relativamente grande en

proporción al tamaño corporal de *O. ascotanensis*, cuyos adultos alcanzan hasta 90 mm de longitud (Vila y col., 2007).

Se ha descrito que el desove parcial representa un mecanismo por el cual las especies aumentan el número total de ovas producidas por periodo reproductivo a niveles mucho más elevados de los que podrían ser producidos en un solo evento reproductivo, esto considerando su tamaño corporal y la capacidad de contención de las ovas en la cavidad corporal, lo cual se traduce en la relación directa existente entre la fecundidad parcial y la longitud del pez (Vazzoler, 1996). Por otro lado, un mayor diámetro de los huevos se asocia a una mayor sobrevivencia de las larvas ya que genera larvas más grandes las cuales podrían optar a un mayor rango de tamaño de presas, probablemente resistir mejor periodos de escases de alimentos y tener menos depredadores (Blaxter y Hempel, 1963; Ware, 1975; Miller y col., 1988; Pepin, 1991; Wootton, 1999).

Debido al pequeño tamaño corporal de *Orestias ascotanensis*, estas presentan una baja capacidad de contención de los ovocitos lo cual concuerda con la baja fecundidad parcial obtenida. Stock de ovocitos en distintos estadios de desarrollo, baja fecundidad parcial y gran tamaño de los huevos son características que concuerdan con especies de desove parcial, constituyendo una buena estrategia para maximizar la cantidad y sobrevivencia de los descendientes tal como se ha confirmado para *O. chungarensis*, *O. laucaensis*, *O. parinacotensis* (Pinto y col., 1991) y *O. agassii* (De la Barra, 2012), y concordando también con lo propuesto por Bugueño y Vila (1997).

En relación al desarrollo embrionario a 20° C ( $\pm$  1°C) de *Orestias ascotanensis*, este presentó una duración de 14 a 18 días, periodo ligeramente mayor al mencionado

previamente por Bugueño y Vila (1997) donde se estimó un tiempo de 12 a 14 días a 23°-24°C, lo cual podría explicarse por la diferencia de variables ambientales como la temperatura durante la incubación de los huevos.

Teniendo en consideración que la temperatura del agua ha demostrado influir directamente en los tiempos de desarrollo y de sobrevivencia de los embriones, además de la longitud total y tamaño del saco vitelino de las larvas (Arenzon y col., 2002; Kupren y col., 2011); podrían existir diferencias en el tiempo de desarrollo respecto a embriones incubados en condiciones de laboratorio versus los incubados bajo condiciones naturales donde la temperatura puede variar durante el día.

De la misma manera, los tiempos de desarrollo embrionario descritos para *O. agassii*, *O. luteus* y *O. ispi*, cuyas estudios no involucraron un control estricto de variables ambientales, estos varían entre ellos. Los mayores tiempos de desarrollo de estas especies podrían estar relacionados con la menor temperatura del agua y adaptaciones propias de cada especie. En el caso del tiempo de reabsorción del saco vitelino, este se conserva bastante entre estas tres especies y *O. ascotanensis*, pese a las diferencias de hábitats.

El desarrollo embrionario de *O. ascotanensis* se destaca por la temprana aparición de cromatóforos hacia el final del segundo día de desarrollo embrionario y progresiva pigmentación en los periodos posteriores. La aparición de melanóforos durante el desarrollo embrionario para especies como el pez cebra ha sido descrita como una adaptación preventiva contra daños generados por la radiación UV (Mueller y Neuhaus, 2014), de la misma manera estos podrían otorgarle a *O. ascotanensis* alta protección ante la elevada radiación del altiplano desde muy temprano desarrollo. En adición, el

desarrollo presenta una extensa duración de 14 a 18 días, periodo en el cual se origina una larva altamente desarrollada la cual ya ha completado el proceso de flexión de la notocorda y presenta una aleta caudal con al menos 12 rayos. Asimismo, ojos, mandíbulas y tubo digestivo ya han completado su desarrollo, capacitándolas casi de inmediato para cazar, en tanto que el saco vitelino es reabsorbido al cabo de 5 a 7 días post eclosión. Dichas características le confieren a la larva elevada capacidad para la vida libre, lo cual podría significar mayores probabilidades de sobrevivencia en este ambiente de condiciones extremas de alta radiación solar, baja presión de oxígeno y alta variabilidad térmica.

La primera etapa del desarrollo embrionario, entre la fecundación hasta el inicio del periodo de diferenciación y organogénesis representó el periodo con mayor mortalidad del estado de huevo. Se ha descrito que los estados ontogénicos tempranos como el clivaje celular y epibolia son periodos morfogenéticamente sensibles debido a las fuerzas involucradas en los procesos de migración celular (Kupren y col., 2011). En el caso de los estadios larvales, se destaca un nuevo evento de aumento de la mortalidad justo después de ocurrida la reabsorción del saco vitelino. Esto concuerda con lo sostenido por algunos autores que describen este lapso como un periodo crítico en el ciclo de vida de los peces debido a la altísima mortalidad natural observada. Dicha situación sería consecuencia de la ausencia de la primera fuente de nutrición, el saco vitelino, y comienzo de la alimentación por fuentes exógenas (Hjort, 1914; Balbotin, 1989; Wootton, 1999). Así, etapas tempranas en el ciclo de vida de *Orestias ascotanensis* constituyen estados

asociados a eventos de alta mortalidad, y por consiguiente, periodos de alta vulnerabilidad.

La sobrevivencia de embriones y larvas recae directamente en el número de individuos que alcanzan el estado de juvenil, teniendo implicancias directas luego en el reclutamiento de los adultos (Saborido-Rey, 2008). Teniendo en cuenta lo anterior, las etapas tempranas en el ciclo de vida de *Orestias ascotanensis* merecen especial atención a la hora de velar por la protección y persistencia de sus poblaciones. Probables periodos y sitios de reproducción, además de posibles zonas de preferencia de las larvas, deberían ser consideradas tanto en el manejo de los recursos hídricos asociados al salar de Ascotán como para el diseño de medidas de conservación hacia esta especie.

Acciones como la restauración de la hidrología y vegetación, junto con la reproducción artificial han sido propuestas para la restauración de las poblaciones de *O. ascotanensis* (Vila y col., 2007). La restauración y protección del ecosistema asociado al salar de Ascotán parecen ser las acciones más prácticas considerando las particulares condiciones tanto ambientales como ecológicas donde habita *O. ascotanensis*, y también las complicaciones asociadas a la mantención de individuos en cautiverio. Sin embargo, la reproducción artificial, ha sido planteada como una medida que podría permitir el restablecimiento de poblaciones en su ambiente natural, pudiendo extender el periodo reproductivo y por lo tanto aumentar el número de individuos en las siguientes generaciones. Además, podría posibilitar el desarrollo de bancos de genes utilizando técnicas de criopreservación de gametos, contribuyendo de esta manera a la protección de la diversidad genética (Mijkherjee y col., 2002).

Si bien aún falta bastante por definir respecto a una metodología realmente efectiva, el procedimiento planteado en este estudio podría ser replicado con algunas modificaciones. Para mejores resultados, sobre todo para la mantención de los individuos adultos, se recomienda utilizar estanques seminaturales con un flujo constante de agua de una fuente natural que se asemeje a las condiciones de su hábitat natural, como ya se ha realizado en Perú y Bolivia para especies como *Orestias luteus*, *O. agassii*, *O. ispi*, *O. pentlandii*, *O. albus* y *O. olivaceus*, entre otras (Vilca y col., 2002; CIDAB, 2002; Terrazas, 2005; Polo, 2005). La alimentación, por su parte, fue realmente importante tanto para la fecundidad y sobrevivencia por lo que se recomienda proveer de una dieta altamente nutritiva, apegándose lo más posible a su dieta natural.

## Conclusiones

- Los resultados obtenidos para *Orestias ascotanensis* concuerdan con especies de desove parcial.
- El macho de *O. ascotanensis* presenta conductas de cortejo y cambios de coloración asociados a la reproducción.
- El desarrollo embrionario de *O. ascotanensis* a 20°C ( $\pm 1$ ) presenta una duración de 14 a 18 días, dividido en 5 periodos y 21 estados; destacándose por la temprana e intensa pigmentación hacia el final de la Gastrulación.
- El estadio larval presenta los periodos de (i) larva en flexión con saco vitelino, (ii) larva en flexión y (iii) larva en post flexión.
- La larva de *O. ascotanensis* nace altamente preparada para la vida libre y absorbe el saco vitelino en 5 a 7 días post eclosión.
- La elevada pigmentación y vascularización del saco vitelino, junto con el alto grado de desarrollo de las larvas a la eclosión podrían ser adaptaciones a condiciones extremas como la alta radiación, baja presión de oxígeno y cambios diarios significativos de temperatura.
- Los estados de huevo y larva de *O. ascotanensis* presentan eventos de alta mortalidad representando periodos de alta vulnerabilidad en su ciclo de vida.
- Se recomienda para mejores resultados en la inducción al desove, utilizar instalaciones y alimentación que se asemejen a las condiciones naturales.

## Bibliografía

- Ahlstrom, E.H. y Ball, O. P. 1954. Description of eggs and larvae of jack mackerel (*Trachurus symmetricus*) and distribution and abundance of larvae in 1950 and 1951. *Fishery Bulletin* 56: 209-245.
- Arenzon, A. Lemos, C A. y Bohrer, M. 2002. The influence of temperature on the embryonic development of the anual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Brazilian Journal of Biology* 62(4B): 743-747.
- Balbotin, F. 1989. Biología reproductiva y primeros estadios de desarrollo en Teleosteos. *Archivos de biología y medicina experimentales* 22: 47-52.
- Blaxter, J.H.S. y Hempel, G. 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus L.*). *Journal du Conseil / Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* 28: 211-240.
- Bugueño, N. y Vila, I. 1997. Características ambientales, reproducción y embriogenia de *Orestias ascotanensis* Parenti (Pisces: Cyprinodontidae). XVII Congreso de Ciencias del mar, Chile.
- Carrillo, M. 2008. La reproducción en peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Publicaciones científicas y tecnológicas de la fundación observatorio español de acuicultura, España.
- Carrillo, M. y Rodríguez, J. 2001. Bases fisiológicas de la Reproducción de peces tropicales. En: Rodríguez, H. Victoria, P. y Carrillo M. (eds). *Fundamentos de acuicultura continental*. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, Colombia: 189-218.
- Castañón, V. 1994. Evaluación de técnicas de desove e incubación artificial para *Orestias agassi* y *Orestias luteus*. Tesis Licenciatura en ingeniería agronómica, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.
- Centro de investigación y desarrollo acuícola boliviano (CIDAB). 2002. Manual de cría y manejo de especies ícticas nativas. Reproducción artificial de *Orestias agassii*, *Orestias luteus* y *Orestias ispi*. Conservación de la biodiversidad en la cuenca del lago Titicaca – Desaguadero- Poopo- Salar de Coipasa (TDPS), Bolivia.
- Comte, S. y I. Vila. 1992. "Spawning of *Basilichthys microlepidotus* (Jenyns)". *Journal of Fish Biology* 41: 971-981.
- Contreras, J. 2002. Norte de Chile: Conservación de humedales altoandinos para un desarrollo productivo sustentable. *Revista Ambiente y Desarrollo* 18 (4): 125-131.

De la Barra, E. 2012. Estrategias reproductivas de *Orestias agassii* (Teleostei: Cyprinodontidae) en ambientes altoandinos de Bolivia. Tesis de Magister en Ciencias Ambientales, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.

Dejoux, C. y Iltis, A. (eds). 1991. El Lago Titicaca: Síntesis del conocimiento limnológico actual. Editorial ORSTOM. Bolivia.

Donaldson, E.M. y Hunter, G.A. 1983. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes. En: Hoar, W. Randall, D. y Donaldson, E. (eds). Fish Physiology. Academic Press: 351-403.

García de Jalón, D. (ed). 1993. Principios y técnicas de gestión de la pesca en aguas continentales. Mundi Prensa, España.

Gilbert, S. (ed). 2005. Biología del Desarrollo. Séptima edición. Editorial medica panamericana. Argentina.

Gisbert, E. 1999. Early development and allometric growth patterns in Siberian sturgeon and their ecological significance. Journal of Fish Biology 54: 852-862.

Habit, E. Dyer, B. y Vila, I. 2006. Estado de conocimiento de los peces dulceacuícolas de Chile. Gayana 70(1): 100-113.

Hjort, J. 1914. Fluctuations in the great fisheries of northern Europe viewed in the light of biological research. Rapports et procès-verbaux des réunions / Conseil permanent international pour l'exploration de la mer 20: 1-228.

Hunter, J.R. Lo, N.C.H. y Leong, R.J.H. 1983. Batch Fecundity in Multiple Spawning Fishes. En: Lasker, R. (ed). An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: Application to the northern anchovy, *Engraulis mordax*. National oceanic and atmospheric administration (NOAA) Technical report, National marine fisheries services (NMFS) 36: 67-78.

Icardo, J. 2012. The Teleost heart: A morphological approach. En: Sedmera, D. y Wang, T. (eds). Ontogeny and Phylogeny of the Vertebrate Heart. Springer-Verlag, New York: 35-53.

Iwatmatzu, T. 2004. Stages of normal development in the Medaka *Oryzias latipes*. Mechanisms of Development 121: 605-618.

Jara, F. Soto, D. y Palma, R. 1995. Reproduction in captivity of the endangered killifish *Orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae). Copeia 1995: 226-228.

- Keller, B. y Soto, D. 1998. Hydrogeologic influences on the preservation of *Orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae), in Salar de Ascotán, northern Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 71: 147-156.
- Kendall, A.W. Ahlstrom, E.H. y Moser, H.G. 1984. Early life History Stages of Fishes and their Characters. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists* 1: 11-22.
- Kimmel, C. Ballard, W. Kimmel, S. Ullmann, B. y Shilling, T. 1995. Stages of embryonic development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253-310.
- Kupren, K. Mamcarz, A. y Kucharczyk, D. 2011. Effect of variable and constant thermal conditions on embryonic and early larval development of fish from the genus *Leuciscus* (Cyprinidae, Teleostei). *Czech Journal of Animal Science* 56 (2): 70-80.
- Leis, J. y Carson-Ewart, B. (eds). 2000. The larvae of Indo-Pacific coastal fishes: An Identification guide to marine fish larvae. *Fauna Malesiana handbook* 2, Australia.
- Loayza, A. 2009. Comparación de la incubación de ovas de Punku (*Orestias luteus*) en condiciones de laboratorio e IN SITU. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Facultad de agronomía, Universidad de San Andrés, Bolivia.
- Miller, B. y Nummela, S. 2009. Fish Reproduction. En: Miller, B. (ed). *Early Life History of Marine Fishes*. University of California Press, USA.
- Miller, T.J. Crowder, L.B. Rice, J.A. y Marschall, E.A. 1988. Larval size and recruitment mechanisms in fishes: towards a conceptual framework. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52: 1083-1093.
- Ministerio del Medio Ambiente (MMA). 2015. Inventario Nacional de especies. URL: <http://especies.mma.gob.cl>. (visitado el 8 de Marzo de 2015).
- Morales, P. 2009. Diferenciación genética y conectividad en ambientes fragmentados: el caso de *Orestias* (Teleostei; Cyprinodontidae) de los salares de Ascotán y Carcote en el altiplano chileno. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Morales, P. Vila, I. y Poulin, E. 2011. Genetic structure in remnant populations of an endangered cyprinodontid fish, *Orestias ascotanensis*, endemic to the Ascotán salt pan of the Altiplano. *Conservation Genetics* 12: 1639-1643.
- Mueller, K. y Neuhauss, S. 2014. Sunscreen for fish: Co-Option of UV light protection for camouflage. *PLoS ONE* 9 (1): e87372.
- Muller, W. A. (ed). 1997. *Developmental Biology*. Springer-Verlag, New York.

- Murua, H. y Saborido-Rey, F. 2003. Female Reproductive Strategies of Marine fish species of North Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 33: 23-31.
- Nakatani, K. Agostinho, A. Baumgartner, G. Bialezki, A. Vanderlei, P. Cavicchioli, M. y Pavanelli, C. 2001. Ovos e larvas de peixes de agua doce: desenvolvimento e manual de identificacao. Conselho editorial, Brasil.
- Parenti, L. 1981. A phylogenetic and biogeographic analysis of Cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinimorpha). *American Museum of Natural History* 168: 335-557.
- Parenti, L. 1984. A taxonomic revision of the Andean killifish genus *Orestias* (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). *American Museum of Natural History* 178: 107-214.
- Pepin, P. 1991. Effect of temperature and size on development, mortality, and survival rates of the pelagic early life-history of marine fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48: 503-518.
- Pinto, M. Montalvo, M.T. Vilaxa, A. Lobalto, I. y Ortega, A. 1991. Ecología reproductiva de *Orestias Valenciannae* (Pisces) del sistema hidrográfico Lauca. Dirección de investigación y desarrollo científico, Facultad de Ciencias, Universidad de Tarapacá, Chile.
- Polo, M. 2005. Reproducción artificial e incubación artesanal in situ del Qañu (*Orestias albus*) para fines de recuperación. Tesis para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia.
- Saborido-Rey, F. 2008. Ecología de la reproducción y potencial reproductivo en las poblaciones de peces marinos. Instituto de Investigaciones marinas (CSIC), Universidad de Vigo, España.
- Sobarzo, G. 2014. Dieta de *Orestias ascotanensis* Parenti en tres vertientes del salar de Ascotán. Tesis para optar al grado de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Chile.
- Terrazas, E. 2005. Evaluación de artesas para la incubación artesanal in situ del Carachi enano (*Orestias olivaceus*) en la isla de Suriki Lago menor del Titicaca. Tesis para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia.
- Tyler, C.R. y Sumpter, J.P. 1996. Oocyte growth and development in Teleost. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6: 287-318.
- Valdebenito, I. 2008. Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. *Archivos de Medicina Veterinaria* 40: 115-123.

- Vazzoler, A. E. 1996. *Biologia da reprodução de peixes Teleósteos: Teoria e prática*. Editora da Universidade estadual de Maringá, Brasil.
- Vila, I. y Pardo, R. 2008. Peces límnicos. En: Comisión nacional del medio ambiente (CONAMA). *Biodiversidad de Chile, Patrimonio y desafíos*. Ocho Libros editores, Chile.
- Vila, I. Mendez, M. Scott, S. Morales, P. y Poulin, E. 2007. Threatened fishes of the world: *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984 (Cyprinodontidae). *Environmental Biology of Fishes* 80: 491–492.
- Vila, I. Morales, P. Scott, S. Poulin, E. Veliz, D. Harrod, C. y Méndez, M. A. 2013. Phylogenetic and phylogeographic analysis of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) in the southern Chilean Altiplano: the relevance of ancient and recent divergence processes in speciation. *Journal of Fish Biology* 82: 927–943.
- Vilca, J. Castillo, Y. Jara, L. y Coila, Y. 2002. Informe Final: Desarrollar la capacidad de programas de pesca artesanal en el ámbito peruano del sistema TDPS. Instituto de investigación, producción, servicios y Capacitación Qollasuyo & Centro de Investigación y Producción pesquera Chucuito UNA-PUNO, Perú.
- Ware, D.M. 1975. Relation between egg size, growth, and natural mortality of larval fish. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 32: 2503-2512.
- Wootton, R.J. (ed). 1999. *Ecology of Teleost fishes*. Chapman and Hall, Londres.