

Research Article

Crecimiento, supervivencia e incidencia de malformaciones óseas en distintos biotipos de *Rhamdia quelen* durante la larvicultura

David R. Hernández¹, Juan J. Santinón¹, Sebastián Sánchez¹ & Hugo A. Domitrovic¹

¹Instituto de Ictiología del Nordeste, Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Nordeste, Sargento Cabral 2139, 3400 Corrientes, Argentina

RESUMEN. Se evaluó el efecto de dos dietas (alimento vivo y dieta seca) y dos poblaciones diferentes de *Rhamdia quelen* de Argentina (área pampeana y nordeste) sobre parámetros de crecimiento, supervivencia e incidencia de malformaciones óseas en sus larvas según un diseño factorial 2x2. Al final de la experiencia (20 días pos-eclosión), las deformaciones esqueléticas fueron diversas y afectaron todas las regiones del eje vertebral. En ningún caso estas anomalías incidieron sobre el peso final de las larvas. No obstante, el biotipo nordeste presentó el mayor porcentaje de ejemplares con anomalías esqueléticas (72,3%) y menor supervivencia. Las alteraciones más comunes fueron compresiones y fusiones vertebrales, afectando el 22,2 y 19,4% de las larvas, respectivamente. El análisis estadístico mostró que la frecuencia de fusiones no fue afectada por el biotipo o por el tratamiento alimentario. Sin embargo, en el caso de las compresiones vertebrales se observó interacción entre biotipo y dieta. Para este tipo de lesión, con alimento vivo, no se detectaron diferencias entre biotipos, al tiempo que las larvas alimentadas con dieta seca presentaron mayor frecuencia de compresiones en el biotipo nordeste. Estos resultados indican que la incidencia de malformaciones en larvas de *R. quelen* se encuentra relacionada con ambos factores (biotipo y dieta). La coloración diferencial de cartílagos y huesos en larvas puede convertirse en una herramienta útil para evaluar, precozmente, la incidencia de malformaciones durante el desarrollo temprano de *R. quelen*.

Palabras clave: *Rhamdia quelen*, malformaciones esqueléticas, larvicultura, dietas, biotipos, Argentina.

Growth, survival and incidence of skeletal malformations in different biotypes of *Rhamdia quelen* during larviculture

ABSTRACT. The effect of two diets (live food and dry diet) and two different populations of *Rhamdia quelen* from Argentina (pampean and northeastern area) on performance and skeletal deformities in fish larvae, according to a 2x2 factorial design, was evaluated. At the end of the trial (20 days post-hatching), skeletal deformities were diverse and affected all regions of the vertebral axis. In neither case, these anomalies had an impact on final weight of larvae. The northeastern biotype presented the highest percentage of skeletal abnormalities (72.3%) and lower survival. A high incidence of fused and compressed vertebrae (affecting 22.2 and 19.4% of the larvae, respectively) was observed. Statistical analysis showed that fusions were not affected by the biotype or feeding treatment. However, in the case of compressions, interaction between diet and biotype was found. For this kind of malformations, live food treatment shows no difference between biotypes, while larvae fed dry diet had the highest frequency in the northeastern biotype. These results indicate that to prevent the incidence of bone malformations in *R. quelen* larvae both factors must be considered (biotype and diet). The differential bone and cartilage staining could be a useful tool for precociously detection of skeletal malformations during early developmental stage in *R. quelen* larvae.

Keywords: *Rhamdia quelen*, skeletal malformations, larviculture, diets, biotypes, Argentina.

Corresponding author: David R. Hernández (dherandez@vet.unne.edu.ar)

INTRODUCCIÓN

En embriones de peces con ontogenia indirecta ocurren cambios morfológicos y fisiológicos, durante los primeros días de vida, que les permiten adquirir las

características de adulto. En los establecimientos piscícolas, un gran número de peces puede presentar alteraciones en el normal desarrollo esquelético durante el período larval manifestando diferentes tipos de malformaciones (Izquierdo *et al.*, 2010), a menudo

asociadas a los sistemas de cría intensivos o tipo de alimentación (Boglione *et al.*, 2001; Villeneuve *et al.*, 2005; Sfakianakis *et al.*, 2006; Sikorska *et al.*, 2012).

Las malformaciones inciden negativamente sobre la productividad de los establecimientos de piscicultura (Fernández *et al.*, 2008), observándose crecimiento reducido, aumento de la susceptibilidad a enfermedades y altos porcentajes de mortandad (Boglione *et al.*, 2001; Koumoundouros *et al.*, 2002; Lewis & Lall, 2006). A pesar de ello, muchos peces con alteraciones morfológicas llegan a la etapa de comercialización desmejorando el valor económico del producto (Boglione *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2008). Así, Lewis & Lall (2006) proponen el examen temprano de las características merísticas involucradas con el número de vértebras o elementos esqueléticos como una herramienta para detectar precozmente las condiciones de cría inadecuadas.

Los disturbios en el normal desarrollo esquelético se encuentran complejamente asociados a factores ambientales (luz, temperatura, diferentes sistemas de cría, polución, otras) (Roo *et al.*, 2010; Sassi *et al.*, 2010), nutricionales (alimentación inadecuada de reproductores o larvas) (Cahu *et al.*, 2003), genéticos (Castro *et al.*, 2008), así como infecciosos o xenobióticos (Lall & Lewis-McCrea, 2007). De todos estos factores, los nutricionales juegan un rol esencial en la aparición de alteraciones esqueléticas durante los primeros estadios de vida (Cahu *et al.*, 2003), viéndose incrementada su incidencia con el uso de microdietas (Kanazawa, 1981; Villeneuve *et al.*, 2005; Sikorska *et al.*, 2012).

Uno de los problemas referido al uso de microdietas se encuentra relacionado con la escasa información de los requerimientos nutricionales para una especie determinada y fase de crecimiento (Fernández *et al.*, 2008), resultando en la utilización de raciones desequilibradas, deficientes o inapropiadas (Cahu *et al.*, 2003; Roo *et al.*, 2009, 2010). En los últimos años, el uso de microdietas ha permitido evaluar el rol de los distintos factores alimentarios que determinan alteraciones esqueléticas (Engrola *et al.*, 2009), ya que con presas vivas es muy difícil realizar experiencias precisas con determinados nutrientes (Villeneuve *et al.*, 2005). En este sentido, Cahu *et al.* (2003) y Lall & Lewis-McCrea (2007) revisaron el rol de diferentes nutrientes (minerales, vitaminas, lípidos, proteínas y sus interacciones) en la patogénesis de las deformidades esqueléticas.

El bagre sudamericano (*Rhamdia quelen*) es un Silúrido de agua dulce de gran importancia para la piscicultura de América Latina. Numerosos trabajos muestran que esta especie puede alimentarse exitosamente con microdietas desde los primeros días de vida

bajo sistemas intensivos de cría (Uliana *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2009), aunque ninguno de ellos menciona la ocurrencia de deformaciones de la columna vertebral asociadas al sistema de larvicultura o al tipo de alimentación. En este estudio, se propuso evaluar el crecimiento, supervivencia e incidencia de malformaciones en la columna vertebral y el esqueleto caudal en larvas de *R. quelen* alimentadas con alimento vivo o dieta seca. Además, se consideraron ejemplares de diferentes biotipos (área pampeana y nordeste de Argentina), ya que si bien en la actualidad sólo se reconoce una especie válida para Argentina (*R. quelen*; Silfvergrip, 1996), los biotipos mencionados presentarían particularidades morfológicas y productivas que los diferencian claramente (Wicki *et al.*, 2006), indicando que podría haber más de una especie bajo el nombre de *R. quelen*. Tal hipótesis fue planteada recientemente por Malabarba (2010), en un simposio internacional dedicado a la divulgación de los avances en el cultivo de la especie, quien considera necesaria la revisión completa del género *Rhamdia*, que incluía más de 100 especies diferentes, y en la actualidad se reúnen en tan solo 11 grupos taxonómicamente válidos (Silfvergrip, 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

El ensayo fue realizado en la Estación de Piscicultura del Instituto de Ictiología del Nordeste, Facultad de Ciencias Veterinarias (Corrientes, Argentina), donde se analizaron cuatro tratamientos experimentales con un diseño factorial 2x2. El primer factor fue el biotipo genético de los reproductores: área pampeana y nordeste de Argentina (AP y NE, respectivamente). El segundo factor fue el tipo de alimento ofrecido: alimento vivo consistente en nauplios de *Artemia* (AV) o dieta seca (DS).

El esquema experimental fue el siguiente:

AP-AV: larvas obtenidas a partir de reproductores AP y alimentados con AV,

AP-DS: larvas obtenidas a partir de reproductores AP y alimentados con DS,

NE-AV: larvas obtenidas a partir de reproductores NE y alimentados con AV,

NE-DS: larvas obtenidas a partir de reproductores NE y alimentados con DS.

Para la obtención de las larvas, tres parejas de reproductores de cada biotipo fueron inducidas artificialmente con extracto de hipófisis de *Prochilodus lineatus*. Después de la eclosión, las larvas fueron

mantenidas en incubadora hasta la absorción casi completa del saco vitelino y la apertura bucal (dos días pos-eclosión). En ese momento, 1.800 larvas (peso inicial = 0,7 mg) fueron distribuidas en 12 lotes y colocadas en acuarios de 5 L de capacidad, abastecidos con agua filtrada y aireación suplementaria, a una densidad de 30 larvas L⁻¹. Las unidades experimentales fueron asignadas de acuerdo con un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones para cada tratamiento.

El reemplazo de agua se efectuó a una velocidad de 0,4 L min⁻¹ durante 12 h día⁻¹ para la eliminación de residuos. La experiencia tuvo una duración de 21 días, durante los cuales la temperatura del agua, conductividad, pH (equipo HANNA®) y oxígeno disuelto (equipo YSI®) se registraron diariamente. Los valores medios obtenidos y el desvío estándar para las variables de calidad de agua fueron 18,8 ± 3,20°C; 114,8 ± 4,9 µS cm⁻¹; 7,09 ± 0,14 y 7,32 ± 0,42 mg L⁻¹, para la temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto, respectivamente. No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) con respecto a los parámetros de calidad de agua entre los diferentes tratamientos durante el período experimental.

La dieta seca contenía 530 g kg⁻¹ de proteína bruta y fue elaborada con los siguientes ingredientes: levadura de pan 570 g kg⁻¹, harina de pescado 350 g kg⁻¹, lecitina de soja 20 g kg⁻¹ y premix vitamínico-mineral 60 g kg⁻¹ (Vitafac Super Acqua-Roche®) (Hernández *et al.*, 2009). Para la elaboración de la dieta, los ingredientes se mezclaron y se adicionó suficiente agua hasta formar una masa suave (400 g kg⁻¹). La masa resultante se pasó a través de una picadora con molde de 2 mm de diámetro y se deshidrató en estufa (38-40°C) durante 48 h, posteriormente, se almacenó a -18°C durante el período experimental. La dieta fue molida y tamizada de acuerdo con la apertura bucal de larvas. Los tamaños de partículas fueron entre 100-200, 250-450 y 600-800 µm, para la primera, segunda, y tercera semana, respectivamente. Todos los grupos fueron alimentados diariamente en exceso a las 08:00, 11:00, 14:00, 17:00 y 20:00 h durante todo el período experimental.

Cálculo de datos y análisis estadístico

Al final de la experiencia, se estimaron los parámetros de peso medio (obtenido del pesaje de 30 larvas por réplica), porcentaje de supervivencia (%S) y biomasa final (BF). La tasa de crecimiento específico (Hopkins, 1992) se calculó como $TCE = 100 [(\ln P_f - \ln P_i) (T)^{-1}]$, donde \ln es el logaritmo natural de P_f (peso final) y P_i (peso inicial) expresado en mg durante un período determinado (T).

Para la evaluación de la incidencia de malformaciones óseas, al final de la experiencia, 60 larvas por tratamiento fueron transparentadas y coloreadas siguiendo la técnica de Taylor & Van Dyke (1985). Para las observaciones y registros fotográficos se utilizó una lupa binocular con cámara digital.

El efecto del tipo de alimento y biotipo sobre el crecimiento, supervivencia, biomasa final y parámetros osteológicos se analizó mediante Análisis de la Varianza a dos vías (2x2 con interacción). Las comparaciones de medias de tratamientos *a posteriori* se realizaron mediante el test de Duncan ($P < 0,05$). Todas las pruebas estadísticas se efectuaron utilizando el programa Statistica para Windows, versión 6,0.

RESULTADOS

Crecimiento, supervivencia y alteraciones óseas

Al finalizar la experiencia no se observaron diferencias significativas en los valores de peso ($P > 0,05$) (Fig. 1a). Asimismo, la TCE fue similar en todos los tratamientos ($P > 0,05$), mientras que las larvas del biotipo AP, alimentadas con AV o DS, mostraron el mejor porcentaje de supervivencia (superiores al 90%) diferenciándose estadísticamente del biotipo NE ($P < 0,05$) (Fig. 1b). En cuanto a la BF, el tratamiento NE-DS presentó el menor valor diferenciándose solamente de AP-DS ($P < 0,05$) (Fig. 1c).

El número de vértebras más frecuentemente observado fue de 39 para las larvas del biotipo AP y de 38 para las del biotipo NE (Fig. 2). Las alteraciones esqueléticas se observaron tanto en el eje vertebral como en el complejo caudal (Fig. 3), encontrándose con mayor frecuencia en la columna vertebral que en el esqueleto caudal, afectando al 37,6 y 8,3% del total de peces evaluados, respectivamente. En todos los tratamientos se observaron diferentes tipos de deformaciones en el cuerpo vertebral, siendo la compresión y la fusión de las más frecuentes (Figs. 4, 5). El porcentaje de peces con fusiones vertebrales no fue afectado por el biotipo ni por la alimentación recibida ($P > 0,05$). Sin embargo, el análisis de los peces que presentaron fusiones permitió determinar que el biotipo NE presentó, en promedio, mayor cantidad de vértebras fusionadas por pez respecto de AP (4,75 y 2,92, respectivamente) ($P < 0,05$), incluso con manifestación evidente de alteración corporal.

En el caso de las compresiones vertebrales, el análisis estadístico permitió detectar interacción entre biotipo y dieta. Para este tipo de lesión, no se detectaron diferencias significativas entre biotipos a

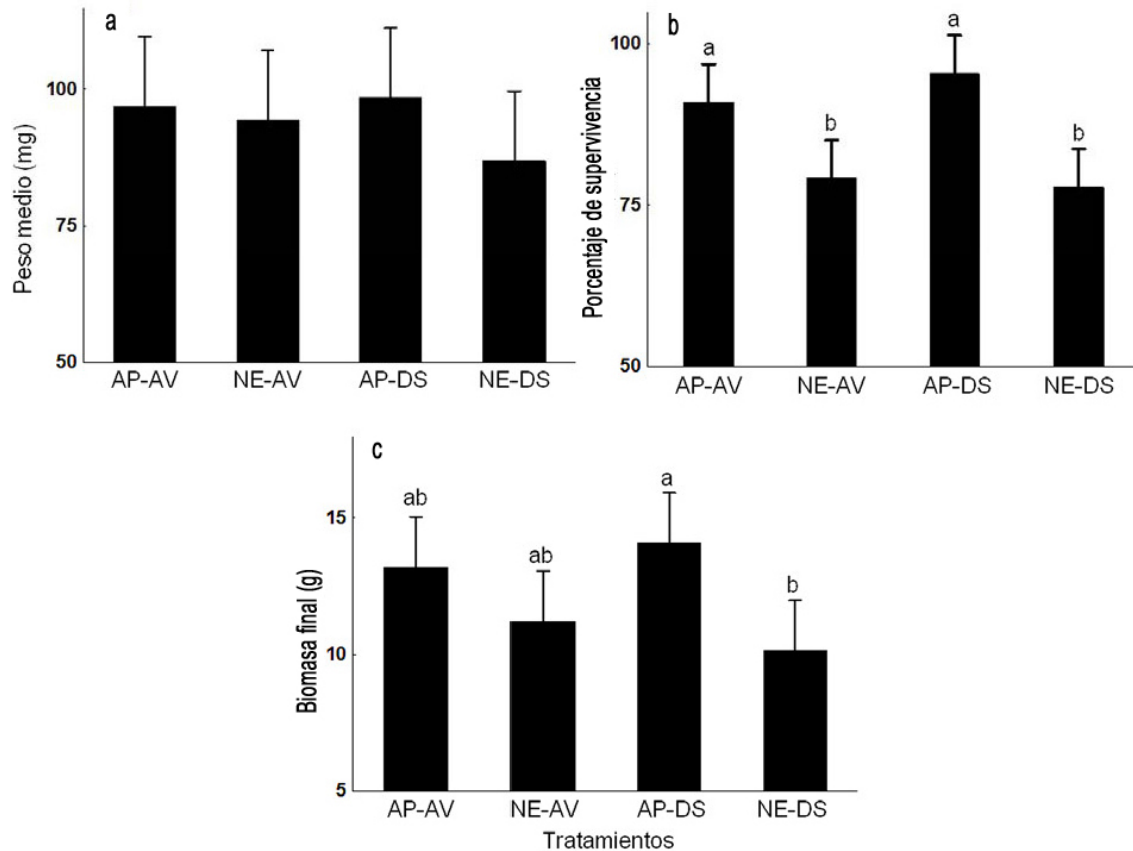


Figura 1. Valores medios de los parámetros productivos en larvas de *R. quelen* de diferentes poblaciones de Argentina (área pampeana, AP y noreste, NE), alimentadas con alimento vivo (AV) o dieta seca (DS). a) peso medio, b) porcentaje de supervivencia, c) biomasa final.

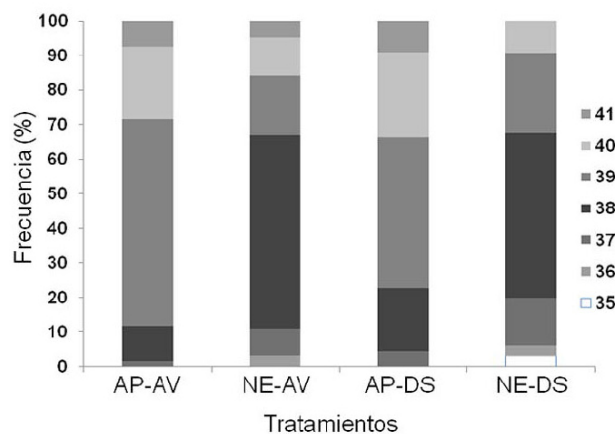


Figura 2. Números de vértebras en larvas de *R. quelen* de diferentes poblaciones de Argentina (área pampeana, AP y noreste, NE), alimentadas con alimento vivo (AV) o dieta seca (DS).

alimentados con AV ($P > 0,05$), al tiempo que se presentaron con mayor frecuencia en NE respecto de AP cuando recibieron DS ($P < 0,05$). Al analizar el

número de compresiones por pez afectado, se observaron resultados semejantes a los mencionados anteriormente, estimándose interacción significativa entre biotipo y alimentación ($P < 0,05$). Así, los biotipos no se diferenciaron cuando los peces se alimentaron con AV ($P > 0,05$), mientras que en los grupos alimentados con DS la frecuencia de compresiones por pez fue superior en NE respecto de AP, con promedios de 5,4 y 3,0, respectivamente ($P < 0,05$), sin manifestación evidente de alteración corporal.

En todos los grupos experimentales se observaron diferentes tipos de malformaciones óseas distribuidas a lo largo del eje vertebral (Fig. 6), que en su conjunto representaron el 22,7; 14,1; 20,6 y 42,5% en AP-AV, NE-AV, AP-DS y NE-DS, respectivamente. También aquí se observó interacción entre biotipo y alimentación ($P < 0,05$), ya que en los peces del biotipo AP no se encontraron diferencias relacionadas al tipo de alimentación recibida ($P > 0,05$) y en los de biotipo NE se observaron mayores valores cuando se alimentaron con DS respecto de AV ($P < 0,05$).

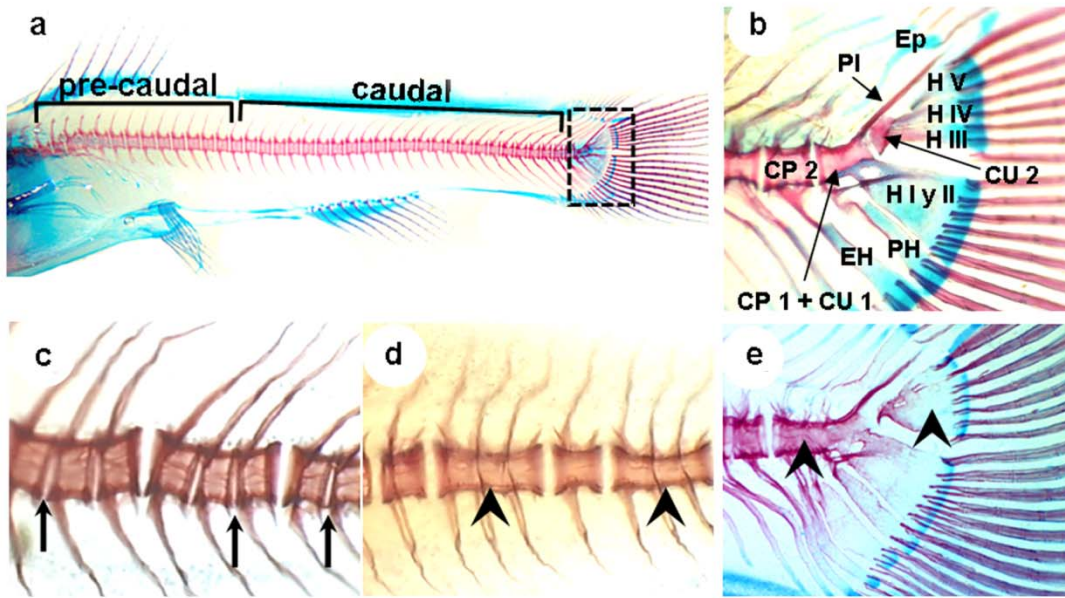


Figura 3. Deformaciones esqueléticas en larvas de *R. quelen*. a) Columna vertebral con desarrollo normal, b) magnificación del recuadro de la figura (a) donde se observa el desarrollo normal de los componentes del esqueleto caudal; c-d), columna vertebral con diferentes tipos de malformaciones, flecha (↑) indica compresiones y cabeza de flecha (▶) fusiones; e) esqueleto caudal con fusiones (▶). CP: centro preural, EH: espina hemal, EP: epural, H: hipural (I-V), PH: parahipural, PL: pleurostilo, CU: centro ural.

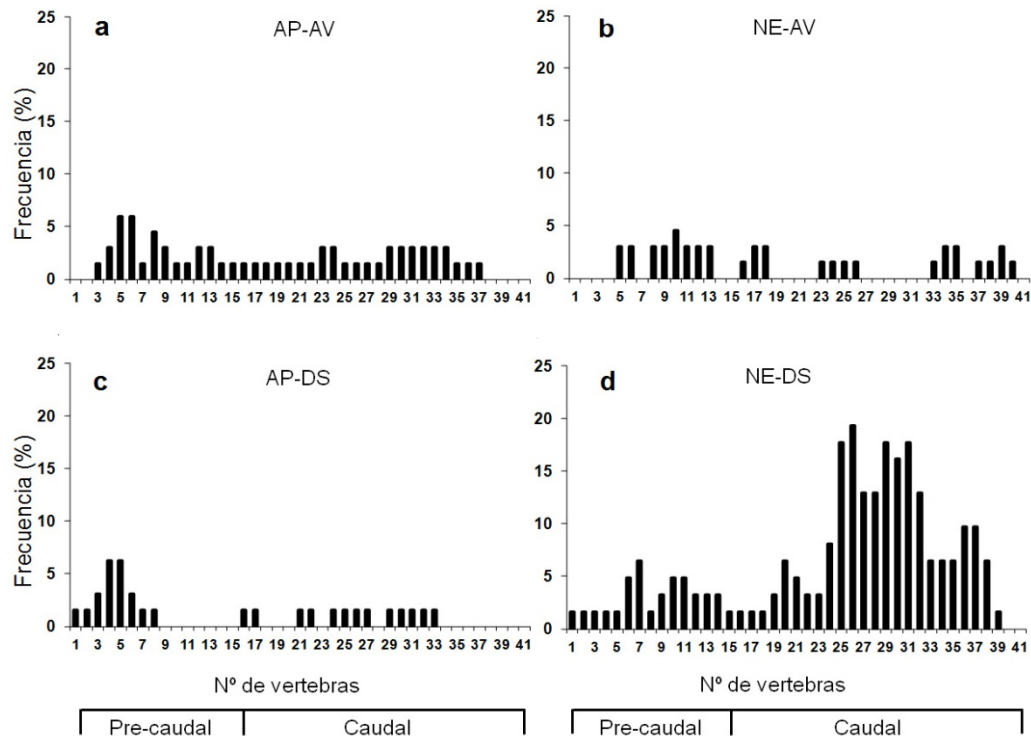


Figura 4. Incidencia de compresiones a lo largo del eje vertebral en larvas de *R. quelen* de diferentes poblaciones de Argentina (área pampeana, AP y noreste, NE), alimentadas con alimento vivo (AV) o dieta seca (DS).

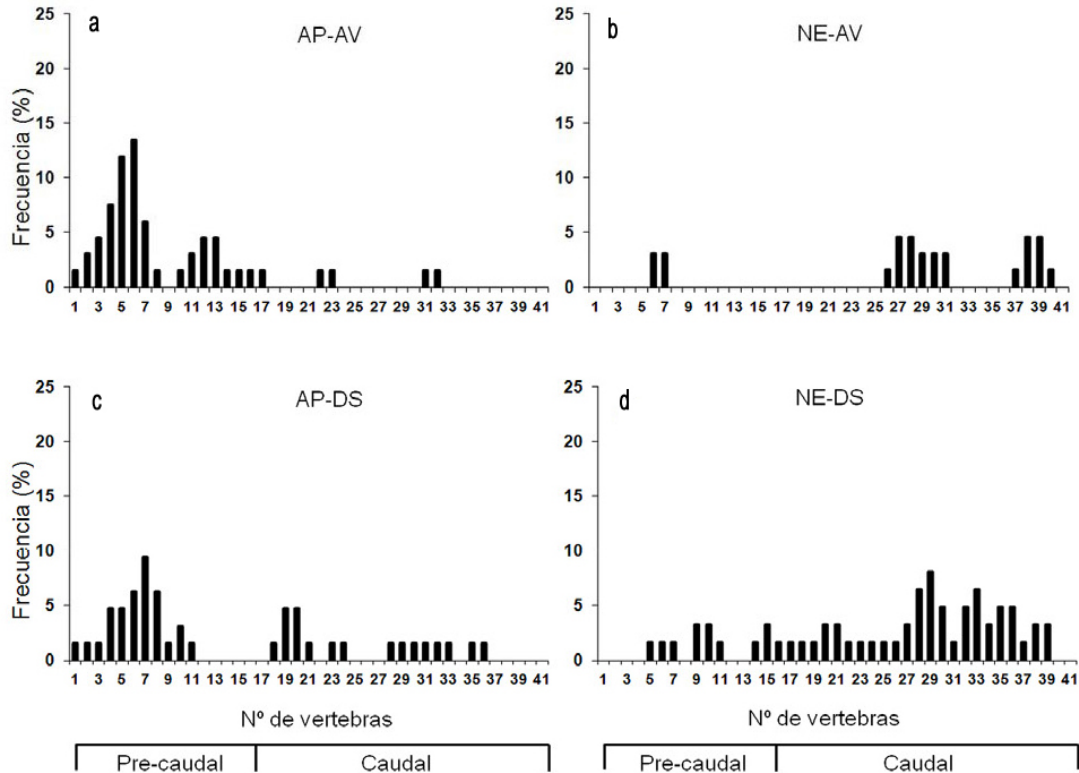


Figura 5. Incidencia de fusiones a lo largo del eje vertebral en larvas de *R. quelen* de diferentes poblaciones de Argentina (área pampeana, AP y noreste, NE), alimentadas con alimento vivo (AV) o dietas secas (DS).

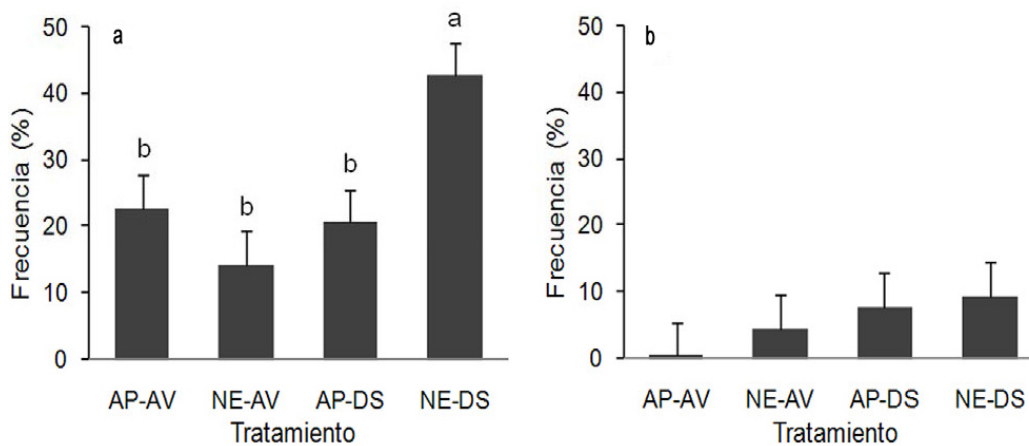


Figura 6. Anomalías en larvas de *R. quelen* de diferentes poblaciones de Argentina (área pampeana, AP y noreste, NE), alimentadas con alimento vivo (AV) o dietas secas (DS). a) Incidencia de peces con alguna deformación en el eje vertebral, b) incidencia de peces con alguna deformación en el complejo caudal. Los datos se refieren al total de individuos de cada grupo. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

Independientemente del alimento recibido, los ejemplares del biotipo AP presentaron mayor incidencia de anomalías esqueléticas en la región pre-caudal respecto de la caudal (especialmente compresiones y fusiones entre las vértebras 4 y 7),

mientras que en el biotipo NE, las anomalías se presentaron con mayor incidencia en la región caudal, principalmente desde las vértebras 28 a la 33, sin mayores alteraciones en el primer segmento de la columna vertebral (Figs. 4, 5).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, los parámetros biométricos de crecimiento y supervivencia obtenidos en larvas de *R. quelen*, alimentadas con alimento vivo o dieta seca, fueron similares a los observados en trabajos previos (Carneiro *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2009, 2012a). Además, aquí se describe por primera vez la incidencia de diferentes tipos de anomalías esqueléticas observadas en la columna vertebral y complejo caudal de esta especie bajo condiciones controladas de larvicultura.

Recientemente, Hernández *et al.* (2012b) describieron el número de vértebras durante los primeros días de vida en *R. quelen* bajo sistema de larvicultura intensiva. El número total de vértebras en el biotipo NE del presente estudio fue comparable a los valores reportados por Hernández *et al.* (2012b) (tratándose del mismo biotipo poblacional), mientras que el promedio observado en el biotipo AP fue ligeramente más alto. Según Boglione *et al.* (2001), las características merísticas muestran una alta variabilidad en criaderos en comparación con grupos silvestres, sugiriendo que las condiciones de cría pueden producir amplia variación merística.

En el presente estudio, anomalías vertebrales tales como compresiones se observaron con mayor frecuencia que las fusiones vertebrales para ambos biotipos en estudio. El patrón de distribución de las anomalías esqueléticas sobre el eje vertebral, independiente del alimento recibido, indica que la región más afectada en el biotipo AP fue la pre-caudal, mientras que en el biotipo NE fue la caudal. Concordando con lo observado en el biotipo AP, una mayor incidencia de anomalías esqueléticas en la región pre-caudal fue reportado en *Danio rerio* (Ferreri *et al.*, 2000) y en juveniles de *Hippoglossus hippoglossus* (Lewis & Lall, 2006), que consistieron en hipertrofia, lordosis y escoliosis. Por el contrario, en *Sparus aurata* la mayor frecuencia de anomalías se produjo en la porción caudal del esqueleto (Boglione *et al.*, 2001), coincidiendo con lo observado en el biotipo NE.

Las deformidades de la aleta caudal suelen presentarse como la afección más frecuente en los peces criados en cautiverio (Koumoundouros *et al.*, 2001, 2002; Sfakianakis *et al.*, 2004). Resultados de este estudio muestran un bajo número de lesiones en el esqueleto caudal, mientras que el eje vertebral fue la porción más afectada. En *Pagellus erythrinus* se registró un elevado número de malformaciones en el esqueleto caudal, incrementando su incidencia con el aumento de la temperatura de cría (Sfakianakis *et al.*, 2004). Según los autores, esta tendencia general se

atribuiría al hecho que en muchas especies la aleta caudal es la primera aleta que inicia el desarrollo, considerando al complejo caudal como un indicador de las condiciones de cría. Sin embargo, esto no se ajustaría a lo observado en *R. quelen*, ya que en esta especie el complejo caudal también es el primero en desarrollarse (Hernández *et al.*, 2012b).

Los factores que influyen en la aparición de anomalías esqueléticas son numerosos (Cahu *et al.*, 2003; Lall & Lewis-McCrea, 2007; Castro *et al.*, 2008; Roo *et al.*, 2010; Sassi *et al.*, 2010). Trabajos previos demostraron que diferentes componentes alimenticios pueden desencadenar trastornos en los procesos de desarrollo y diferenciación celular (Cahu *et al.*, 2003; Lall & Lewis-McCrea, 2007). La utilización de vitamina A (Villeneuve *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2008; Mazurais *et al.*, 2009), vitamina C (Merchie *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002; Darias *et al.*, 2011) y vitamina D (Darias *et al.*, 2010), entre otras, tienen una marcada relación con los niveles dietarios y la incidencia de malformaciones en las larvas. Sin embargo, estas sustancias se suministran a niveles superiores a los requeridos por las larvas (NRC, 1993), con la finalidad de compensar la pérdida de estos compuestos durante la fabricación de los alimentos o por la rápida lixiviación (principalmente en vitaminas hidrosolubles) (Lazo, 2000; Guillaume *et al.*, 2004). Además, se debe considerar la variable de consumo de alimento, tracto gastrointestinal inmaduro, almacenamiento, biodisponibilidad o su forma química (Dabrowski, 1991; Waagbo, 2010).

La vitamina A (VA) participa en el normal desarrollo embrionario y juega un rol clave en el proceso de formación del eje anteroposterior en los vertebrados (Ross *et al.*, 2000). Su exceso acelera la formación y crecimiento de las vértebras conduciendo a alteraciones óseas (Cahu *et al.*, 2003). Diversos trabajos fueron realizados con el objeto de evaluar la incidencia de malformaciones óseas en larvas de peces alimentadas con nauplios de *Artemia*, enriquecidos con diferentes niveles y formas químicas de la VA (Dedi *et al.*, 1995; Takeuchi *et al.*, 1995, 1998; Tarui *et al.*, 2006). Dedi *et al.* (1995) observaron que la alimentación larvas de *Paralichthys olivaceus* alimentadas con nauplios de *Artemia*, enriquecidos con niveles crecientes de VA-palmitato (de 0 a 100 mg), produjo un efecto negativo en el crecimiento y una elevada incidencia de malformaciones con valores superiores a 50 mg. En el presente trabajo, las larvas de ambos biotipos alimentadas con nauplios de *Artemia* (no enriquecidos con VA), presentaron escasos valores de alteraciones óseas. Si bien, en este estudio no se evaluó el contenido real de VA en los

alimentos, según Nelis *et al.* (1988) los nauplios de *Artemia* contienen carotenoides en la forma de cantaxantina, que pueden ser convertidos por los peces a betacarotenos y luego retinol (Olson, 1989). Mazurais *et al.* (2008) evaluaron dietas suplementadas con niveles crecientes de mezclas vitamínicas desde 0,5 a 8% para alimentar larvas de *Dicentrarchus labrax* observando una escasa incidencia de deformidades de columna y una adecuada diferenciación de las células óseas de la columna vertebral al mayor nivel inclusión, mientras que bajo de 1,5%, las larvas murieron antes de los 30 días de vida. Los autores consideran que el máximo nivel de la mezcla vitamínica utilizada en ese ensayo concuerda con los niveles medios o normales reportados en la literatura. Similares resultados fueron encontrados por Villeneuve *et al.* (2005) y Hernández *et al.* (2006). Bajo las condiciones experimentales del presente estudio, las larvas del biotipo NE alimentadas con DS adicionada con mezcla vitamínica-mineral al 6% (ver tabla de composición en Hernández *et al.*, 2009), presentaron un elevado número de malformaciones respecto del biotipo AP, e inclusive del mismo biotipo alimentado con AV. Según Fernández *et al.* (2008), un exceso de VA en la dieta acelera el proceso de osificación del cuerpo vertebral conduciendo a una elevada incidencia de fusiones y compresiones de las mismas, considerando la necesidad de encontrar el momento adecuado, dentro de la etapa temprana de desarrollo, para el aporte de VA y evitar la ocurrencia de alteraciones óseas. Por otra parte, Darias *et al.* (2011), comprobaron que dosis menores o mayores a 50 mg kg⁻¹ de ácido ascórbico en dietas para *D. labrax* ocasionan disturbios a nivel molecular asociados a la interrupción de los procesos de osificación y aparición de anomalías esqueléticas.

Considerando la participación de los alimentos en la incidencia de malformaciones en larvas, es posible que los componentes alimentarios puedan desencadenar alteraciones esqueléticas dependiendo de la sensibilidad de la especie e inclusive del biotipo. De cualquier modo, la gravedad de la incidencia dentro de un determinado grupo sería el resultado de la interacción de su constitución génica y la influencia ambiental (Wimberger, 1992; Koumoundouros *et al.*, 2001; Gjerde *et al.*, 2005).

Kause *et al.* (2007) expresaron que diferentes familias o cohortes muestran una respuesta variable a la incidencia de malformaciones debido al impacto de los diferentes factores ambientales. Asimismo, Castro *et al.* (2008) evaluaron la heredabilidad de las anomalías esqueléticas (lordosis y ausencia opercular) en *S. aurata* y observaron que la variación génica no está involucrada o contribuye en una proporción muy

pequeña en la aparición de dichas anomalías, haciendo hincapié en las condiciones ambientales de las granjas piscícolas como la principal causa. En el presente trabajo, las condiciones de larvicultura y la contaminación originada por el alimento residual, también pudieron ser factores causales de malformaciones, ya que los mismos suelen inducir deformidades múltiples y no específicas (Koumoundouros *et al.*, 2001). Así, la expresión de los factores genéticos y el normal desarrollo del sistema esquelético tendrán mayores posibilidades de ocurrir en la medida que las condiciones del medio sean las adecuadas. Las diferencias en incidencia de malformaciones óseas observadas con el tratamiento dietario se deberían al desarrollo ontogenético disímil entre los diferentes biotipos evaluados.

La aparición de malformaciones puede asociarse con elevados niveles de determinados nutrientes en las dietas durante ventanas temporales específicas que afectan los procesos fisiológicos normales en la esquelotogénesis, luego de los cuales no existiría efecto negativo (Fernández *et al.*, 2008; Darias *et al.*, 2011). Estudios recientes muestran que la mineralización de las estructuras óseas en larvas de *D. labrax* se incrementa exponencialmente en relación con el patrón de expresión del gen osteocalcin, determinando una rápida mineralización de la columna vertebral, cuando las larvas se encuentran entre los 8,3 y 15,5 mm de longitud total (Darias *et al.*, 2010).

Futuros estudios destinados a estimar los niveles de inclusión de diferentes componentes nutricionales, podrían orientarse a evaluar si la incidencia de alteraciones óseas asociada al déficit o exceso de algunos elementos pueda controlarse modificando la frecuencia de alimentación o la calidad de las raciones, en momentos específicos del desarrollo larvario, más que utilizando una única estrategia a lo largo de la larvicultura, como habitualmente se realiza en estudios experimentales.

REFERENCIAS

- Boglione, C., F. Gagliardi, M. Scardi & S. Cataudella. 2001. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wildcaught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture*, 192: 1-22.
- Cahu, C., J.L. Zambonino-Infante & T. Takeuchi. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227: 1-4.
- Cardoso, A.P., J. Radünz-Neto, T.S. Medeiros, M.A. Knöpker & R. Lazzari. 2004. Criação de larvas de

- jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com rações granuladas contendo fígados ou hidrolisados. *Acta Scientiarum*, 26: 457-462.
- Carneiro, P.C.F., J.D. Mikosi, M. Schorer, P.R. Campagnoli-Oliveira-Filho & F. Bendhacki. 2003. Live and formulated diet evaluation through initial growth and survival of jundiá larvae, *Rhamdia quelen*. *Sci. Agric.*, 60: 615-619.
- Castro, J., A. Pino-Querido, M. Hermida, D. Chavarrías, R. Romero, L.A. García-Cortés, M.A. Toro & P. Martínez. 2008. Heritability of skeleton abnormalities (lordosis, lack of operculum) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) supported by microsatellite family data. *Aquaculture*, 279: 18-22.
- Dabrowski, K. 1991. Some aspects of ascorbate metabolism in developing embryos of the brine shrimp. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 1-3.
- Darias, M.J., D. Mazurais, G. Koumoundouros, N. Glynatsi, S. Christodouloupoulou, C. Huelvan, E. Desbruyeres, M.M. Le Gall, P. Quazuguel, C.L. Cahu & J.L. Zambonino-Infante. 2010. Dietary vitamin D3 affects digestive system ontogenesis and ossification in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 298: 300-307.
- Darias, M.J., D. Mazurais, G. Koumoundouros, M.M. Le Gall, C. Huelvan, E. Desbruyeres, P. Quazuguel, C.L. Cahu & J.L. Zambonino-Infante. 2011. Imbalanced dietary ascorbic acid alters molecular pathways involved in skeletogenesis of developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 159: 46-55.
- Dedi, J., T. Takeuchi, T. Seikai & T. Watanabe. 1995. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder *Paralichthys olivaceus* fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, 133: 135-146.
- Engrola, S., L. Figueira, L.E.C. Conceição, P.J. Gavaia, L. Ribeiro & M.T. Dinis. 2009. Co-feeding in *Senegalese sole* larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. *Aquaculture*, 288: 264-272.
- Fernández, I., F. Hontoria, J.B. Ortiz-Delgado, Y. Kotzamanis, A. Estévez, J.L. Zambonino-Infante & E. Gisbert. 2008. Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, 283: 102-115.
- Ferreri, F., C. Nicolais, C. Boglione & B. Bertolini. 2000. Skeletal characterization of wild and reared zebrafish: anomalies and meristic characters. *J. Fish Biol.*, 56: 1115-1128.
- Gjerde, B., M.J. Pante & G. Baeverfjord. 2005. Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 244: 77-87.
- Guillaume, J., S. Kaushik, P. Bergot & R. Metailler. 2004. Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 475 pp.
- Hernández, L.H., S. Teshima, S. Koshio, M. Ishikawa, F.J. Gallardo-Cigarroa, M.S. Alam & O. Uyan. 2006. Effects of vitamin A palmitate, beta-carotene and retinoic acid on the growth and incidence of deformities in larvae of red sea bream *Chrysophrys major*. *Cienc. Mar.*, 32: 195-204.
- Hernández, D.R., S. Sánchez, J.J. Santinón & H.A. Domitrovic. 2009. Fontes não convencionais de proteína na primeira alimentação do bagre sul americano (*Rhamdia quelen*). *Cienc. Rural*, 39: 878-884.
- Hernández, D.R., J.J. Santinón, S. Sánchez & H.A. Domitrovic. 2012a. Dietary soybean meal on growth and intestinal morphology of South American catfish, *Rhamdia quelen*, larvae. *Cienc. Rural*, 42: 1662-1668.
- Hernández, D.R., J.R. Casciotta, J.J. Santinón, S. Sánchez & H.A. Domitrovic. 2012b. Desarrollo ontogénico de la columna vertebral y del esqueleto caudal en larvas de *Rhamdia quelen* en condiciones de larvicultura intensiva. *Int. J. Morphol.*, 30: 1520-1525.
- Hopkins, K.D. 1992. Reporting fish growth: a review of the basics. *J. World Aquacult. Soc.*, 23: 173-179.
- Izquierdo, M.S., J. Socorro & J. Roo. 2010. Studies on the appearance of skeletal anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional quality of live preys. *J. Appl. Ichthyol.*, 26: 320-326.
- Kanazawa, A., S. Teshima, S. Inamori, T. Iwashita & A. Nagao. 1981. Effects of phospholipids on growth, survival rate and incidence of malformation in the larval Ayu. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, 30: 301-309.
- Koumoundouros, G., P. Divanach & M. Kentouri. 2001. The effect of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* (L.). *Aquaculture*, 200: 285-304.
- Koumoundouros, G., E. Maingot, P. Divanach & M. Kentouri. 2002. Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture*, 209: 49-58.
- Kause, A., O. Ritola & T. Paananen. 2007. Changes in the expression of genetic characteristics across cohorts in skeletal deformations of farmed salmonids. *Genet. Sel. Evol.*, 39: 529-543.
- Lall, S.P. & L. Lewis-McCrea. 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish, an overview. *Aquaculture*, 267: 3-19.

- Lazo, J. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa & R. Civera-Cerecedo (eds.). Avances en nutrición acuícola Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán, pp. 300-312.
- Lewis, L.M. & S.P. Lall. 2006. Development of the axial skeleton and skeletal abnormalities of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) from first feeding through metamorphosis. *Aquaculture*, 257: 124-135.
- Malabarba, L. 2010. Sistemática do gênero *Rhamdia*. III Workshop sobre jundiá, 2010. Santa Maria RS: UFSM - Dep. de Fisiologia, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 42 pp.
- Mazurais, D., M.J. Darias, M.F. Gouillou-Coustans, M.M. Le Gall, C. Huelvan, E. Desbruyères, P. Quazuguel, C. Cahu & J.L. Zambonino-Infante. 2008. Dietary vitamin mix levels influence the ossification process in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 294: 520-527.
- Mazurais, D., N. Glynatsi, M.J. Darias, S. Christodouloupoulou, C.L. Cahu, J.L. Zambonino-Infante & G. Koumoundouros. 2009. Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. *Aquaculture*, 294: 262-270.
- Merchie, G., P. Lavens & P. Sorgeloos. 1997. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. *Aquaculture*, 155: 165-181.
- National Research Council (NRC). 1993. Nutrient requirements of fish. National Academy Press, Washington, 114 pp.
- Nelis, H.J., P. Lavens, M.M. Van Steenberge, P. Sorgeloos, G.R. Criel & A.P. De Leenheer. 1988. Qualitative and quantitative changes in the carotenoids during development of the brine shrimp *Artemia*. *J. Lipid Res.*, 29: 491-499.
- Olson, J.A. 1989. Provitamin-A function of carotenoids - the conversion of beta-carotene into vitamin-A. *J. Nutr.*, 119: 105-108.
- Roo, F.J., J. Socorro & M.S. Izquierdo. 2010. Effect of rearing techniques on skeletal deformities and osteological development in red porgy *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758) larvae. *J. Appl. Ichthyol.*, 26: 372-376.
- Roo, F.J., C.M. Hernández-Cruz, J.A. Socorro, H. Fernández-Palacios, D. Montero & M.S. Izquierdo. 2009. Effect of DHA content in rotifers on the occurrence of skeletal deformities in red porgy *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 287: 84-93.
- Ross, S.A., P.J. Caffery, U.C. Dragner & L.M. De Luca. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.*, 80: 1021-1054.
- Sassi, A., A. Annabi, K. Kessabi, A. Kerkeni, K. Said & I. Messaoudi. 2010. Influence of high temperature on cadmium-induced skeletal deformities in juvenile mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Fish Physiol. Biochem.*, 36: 403-409.
- Sfakianakis, D.G., G. Koumoundouros, P. Divanach & M. Kentouri. 2004. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture*, 232: 407-424.
- Sfakianakis, D.G., E. Georgakopoulou, I.E. Papadakis, P. Divanach, M. Kentouri & G. Koumoundouros. 2006. Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 254: 54-64.
- Sikorska, J., J. Wolnicki, R. Kamiński & V. Stolovich. 2012. Effect of different diets on body mineral content, growth, and survival of barbel, *Barbus barbus* (L.), larvae under controlled conditions. *Arch. Pol. Fish.*, 20: 3-10.
- Silfvergrip, A.M.C. 1996. A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, 156 pp.
- Takeuchi, T., J. Dedi, C. Ebisawa, T. Watanabe, T. Seikai, K. Hosoya & J.I. Nakazoe. 1995. The effect of beta-carotene and vitamin-A enriched *Artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval Japanese flounder. *Fish. Sci.*, 61: 141-148.
- Takeuchi, T., J. Dedi, Y. Haga, T. Seikai & T. Watanabe. 1998. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 169: 155-165.
- Tarui, F., Y. Haga, K. Ohta, Y. Shima & T. Takeuchi. 2006. Effect of *Artemia* nauplii enriched with vitamin-A palmitate on hypermelanosis on the blind side in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, 72: 256-262.
- Taylor, W.R. & G.C. Van Dyke. 1985. Revised procedure for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium*, 2: 107-119.
- Uliana, O., J.H. Souza da Silva & J. Radünz Neto. 2001. Substituição parcial ou total de óleo de canola por lecitina de soja em rações para larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*), Pisces, Pimelodidae. *Cienc. Rural*, 31: 677-681.

- Villeneuve, L., E. Gisbert, H. Le Delliou, C.L. Cahu & J.L. Zambonino-Infante. 2005. Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *Br. J. Nutr.*, 93: 1-12.
- Villeneuve, L., E. Gisbert, H. Le Delliou, C.L. Cahu & J.L. Zambonino-Infante. 2006. Intake of high levels of levels of vitamin A and polyunsaturated fatty acids during different developmental periods modifies the expression of morphogenesis genes in European sea bass (*Dicentrarchus labax*). *Br. J. Nutr.*, 95: 677-687.
- Waagbo, R. 2010. Water-soluble vitamins in fish ontogeny. *Aquacult. Res.*, 41: 733-744.
- Wang, X., K. Kim & S.C. Bai. 2002. Effects of different dietary levels of L-ascorbyl-2-polyphosphate on growth and tissue vitamin C concentrations in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquacult. Nutr.*, 33: 261-267.
- Wicki, G., F. Rossi, S. Martín & L. Luchini. 2006. Cría de bagre randiá en Argentina: crecimiento comparado entre dos líneas de distinto origen silvestre. *Infopesca Internacional*, 26: 33-39.
- Wimberger, P.H. 1992. Plasticity of fish body shape: the effects of diet, development, family and age in two species of *Geophagus* (Pisces: Cichlidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, 45: 197-218.

Received: 26 April 2013; Accepted: 27 September 2013