



PROGRAMA DE CONSERVACIÓN DE LA FAUNA ÍCTICA Y LOS RECURSOS PESQUEROS DEL RÍO URUGUAY

IDENTIFICACIÓN DE HUEVOS Y LARVAS DE PECES RECIÉN ECLOSIONADAS EN EL RÍO URUGUAY MEDIANTE EL USO DE CÓDIGO DE BARRAS DE ADN

Alejandro Márquez¹, Carlos Fuentes², María Inés Gómez², Ana Laura Reyes¹, Rafael Fort³,
José R. Sotelo³

1- UMEB, Facultad de Ciencias, UDELAR. Uruguay

2- Dirección de Planificación y Gestión de Pesquerías. Ministerio de Agricultura, Ganadería
y Pesca. Argentina

3- Plataforma de Secuenciación Masiva, Departamento de Genómica, IIBCE, MEC. Uruguay

Introducción

Las especies de peces migratorios de ríos Sudamericanos realizan desplazamientos ascendentes con fines reproductivos. La extensión de las migraciones puede ser variable en las distintas especies, no obstante, la del grupo de los grandes migratorios asciende a varios cientos de kilómetros en trayectos que van desde las zonas habituales de alimentación, hasta las áreas aguas arriba donde llevan a cabo los desoves. Una vez alcanzadas estas últimas, las hembras evacuan una elevada cantidad de huevos en ambientes con condiciones de flujo, o bien, próximos a ellos, de manera que los nuevos individuos ingresen más o menos prontamente en la deriva hacia aguas abajo. Unas 12-18 horas más tarde los huevos

eclosionan y durante la deriva descendente los embriones libres desarrollan gradualmente los rasgos morfológicos característicos de las larvas de cada especie. De esta forma, sólo una vez transcurridos algunos días, las larvas pueden ser identificadas. Cuando las condiciones hidrológicas lo hacen posible, las larvas se distribuyen hacia las áreas marginales de cría donde continuarán la vida larval y juvenil.

El problema del bloqueo de las migraciones ascendentes y de la deriva descendente por parte de los emprendimientos hidroeléctricos ha sido objeto de estudio, dado que en los peces migratorios ambas dinámicas se ven afectadas por el proceso de fragmentación gradual de las cuencas (Agostinho et al, 2002, 2005, 2007, 2011; Pelecice et al, 2015). Por ello, la determinación más o menos precisa de la localización de las áreas de desoves y el grado de obstrucción potencial que los emprendimientos hidroeléctricos imponen a la distribución de los productos de su reproducción son información esencial para la conservación de las especies y el planteo de medidas de mitigación de los impactos.

Los métodos para la estimar la localización de las áreas o hábitats esenciales de las especies se basan en las indicaciones surgidas de muestreos de ictioplancton, dado que en las proximidades de las zonas de desove predominarían los huevos y larvas recién eclosionadas, mientras que las larvas más desarrolladas lo harían en tramos contiguos a las áreas de cría. El criterio morfológico permite estimar la localización general de las mismas mediante cálculos de desplazamiento a partir de la velocidad de la corriente y el grado de desarrollo de los individuos, no obstante, la identificación de los estadios de desarrollo más tempranos (huevos y embriones) a nivel específico permite una estimación más precisa, aunque demanda el uso de métodos confirmatorios basados en técnicas moleculares. En particular, la secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés) permite explorar la composición específica de una muestra de individuos en estadios de desarrollo muy temprano.

Los datos acumulados basados en la presencia de larvas identificables hasta el presente permiten inferir que existe reproducción de peces migratorios aguas abajo y arriba de la represa de Salto Grande (Fuentes et al, 2018). No obstante, se ha encontrado evidencia del paso de individuos en estadio larval desde el tramo medio hacia el inferior del Río Uruguay, lo que induce la pregunta de en qué proporción los estadios larvales de todas las especies que

derivan en el tramo inferior son originados en el mismo respecto a aguas arriba de Salto Grande (Fuentes et al, 2016). La utilización de técnicas moleculares permitiría entonces evaluar los eventos reproductivos a partir de estadios muy tempranos con un alto grado de precisión, lo que permite poner a prueba las siguientes hipótesis:

- a) Las especies migratorias de peces se reproducen en ambos tramos del Río Uruguay.
- b) La reproducción de los grandes migratorios ocurre en los tramos superiores de ambas secciones Media e Inferior del Río Uruguay.
- c) La importancia relativa de la reproducción de peces migratorios es mayor en el tramo medio del Río Uruguay.

En el presente informe se reportan los resultados del uso técnicas de NGS para la identificación de huevos y embriones recientemente eclosionados, en el Río Uruguay Medio e Inferior, durante el periodo 2016-2017. El objetivo perseguido es describir la localización de las áreas de la reproducción de peces en los tramos medio e Inferior del Río Uruguay, mediante el uso de la identificación molecular de huevos y embriones recién eclosionados de peces.

Materiales y Métodos

Muestreo

Se utilizaron muestras de huevos y larvas viteladas, que fueron colectadas y preservadas en alcohol 96% en muestreos semanales realizados el marco de las actividades desarrolladas por el Programa de Conservación de la Fauna Íctica y los Recursos Pesqueros del Río Uruguay de la CARU, entre octubre de 2016 y marzo de 2017, en 3 localidades del tramo Medio (El Soberbio, R.A., Panambí, R.A. y Yapeyú, R.A.) y 3 del tramo Inferior del Río Uruguay (Benito Legerén, R.A, Paysandú, R.O.U. y Fray Bentos, R.O.U.) (Figura 1). Las muestras de ictioplancton fueron procesadas bajo microscopio estereoscópico en el lapso de los seis meses posteriores a la colecta. Los huevos y larvas recién eclosionadas se agruparon siguiendo un criterio temporal, geográfico y grado de desarrollo (huevos o larvas viteladas), constituyendo 31 pooles.

Extracción, PCR, secuenciación y bioinformática

Se realizó extracción de ADN de 31 pooles de ictioplancton utilizando un kit de extracción DNeasy® Blood & Tissue Kit de Qiagen, y se midió la cantidad de ADN en espectrofotómetro de microvolúmenes y su integridad en electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %. Se amplificaron fragmentos del citocromo b mitocondrial que fueron secuenciados mediante técnicas de NGS. Para el procesamiento de las secuencias se utilizaron scripts escritos en R, utilizando funciones de Biostring (Pagès et al. 2019), ShortRead (Morgan et al. 2009) y SeqinR (Charif and Lobry 2007), así como funciones del paquete USEARCH (Edgar 2010). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias de citocromo b de peces neotropicales del Genbank y de una base de secuencias propia, en especial de especies citadas para el Río Uruguay (Nion and Meneses 2002).

Resultados

La cantidad de secuencias de ADN obtenidas (llamadas “reads”) por pool luego del filtrado varió entre 32.543 y 93.847, y el total de “reads” en las 31 muestras sumadas fue 1.881.343. Se definieron un total de 31 Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs, esto es secuencias diferentes que podrían adjudicarse a unidades taxonómicas diferentes), que representaron 6 Ordenes y 17 Familias, con 24 identificaciones a nivel de especie, 6 a género, 3 como familia, 3 a nivel de Orden y 3 solo pudo identificarse que eran peces óseos. En el tramo medio del río Uruguay se observó mayor diversidad de OTUs que en el tramo inferior (Tabla 1). Los Órdenes predominantes fueron los Siluriformes y los Characiformes, lo que refleja la diversidad de peces adultos en el Río Uruguay donde estos Órdenes son los más abundantes (Tabla 1). Entre los Siluriformes, predominan las especies de la Familia Pimelodidae, en particular los bagres pequeños y no migratorios *Iheringichthys labrosus* y *Parapimelodus valenciennis* son dominantes en los dos tramos del río. El Heptateridae *Pimelodella gracilis* que es un bagre pequeño, también tuvo una distribución amplia (Figura 2). Entre los Characiformes, predominan las especies de la Familia Characidae en general de tamaño medio a pequeño. El clupeiforme *Lycengraulis grossidens* también mostró una amplia distribución, tanto en el tramo inferior como en el medio.

Los huevos y larvas de las grandes especies migratorias se encontraron principalmente en el tramo medio (Figura 2) asociados a los incrementos hidrométricos de

primavera. En la Figura 3 se consignan las proporciones de las especies migratorias de importancia comercial (*Megaleporinus obtusidens*, *Salminus brasiliensis*, *Brycon orbygnianus*, *Prochilodus lineatus*, *Pseudoplatystoma corruscans* y *Luciopimelodus pati*), donde puede observarse que sus huevos y larvas recién eclosionadas se encuentra principalmente en el tramo medio, salvo por la presencia de huevos de *Salminus brasiliensis* y por la observación de larvas de patí (*Luciopimelodus pati*) que fueron también registradas en el tramo inferior aunque con un menor número de “reads”.

Discusión

La utilización de metodologías de secuenciación de nueva generación (NGS) resultó una herramienta eficaz para la identificación formas de desarrollo temprano del ictioplancton del Río Uruguay que no eran discriminados utilizando caracteres morfológicos.

La composición de las especies fue en su mayoría concordante con las descripciones realizadas sobre formas identificables morfológicamente. Los bagres pequeños y especies de la Familia Characidae como *Odontostilbe pequirá* resultaron abundantes en todo el río, principalmente en el tramo inferior. El tramo medio resultó ser muy diverso en la composición del ictioplancton. A nivel molecular, se identificaron más especies que en el tramo inferior, entre ellas las especies migratorias que son componentes principales de la actividad pesquera en el río Uruguay como el *Prochilodus lineatus*, *Megaleporinus obtusidens*, *Salminus brasiliensis* y *Pseudoplatystoma corruscans*. Esto muestra al tramo medio, en particular en la Provincia de Misiones y Corrientes, como una región importante para la reproducción de especies migratorias que son la base de la actividad pesquera en el río; además los resultados muestran la importancia que el tramo medio tiene para el salmón de río o pirapitá *Brycon orbignyanus* una especie de interés comercial y deportivo con problemas de conservación en la cuenca.

La gran diversidad de especies desovantes y la identificación de reproducción de los grandes peces migratorios del Río Uruguay, hacen de Corrientes, y en particular Misiones, una zona muy vulnerable a alteraciones significativas del tramo del río, como pueden ser la construcción de represas hidroeléctricas que imposibilitan la llegada habitual de los ejemplares adultos a las zonas de desove. La reproducción de aquellas especies que utilizan el canal principal del río y su distribución hacia aguas abajo está altamente influenciada por

las condiciones hidrológicas y la alteración del caudal podría afectar seriamente la reproducción de muchísimas especies, y en particular aquellas migratorias que mantiene una actividad pesquera artesanal.

El tramo inferior parece menos variable y la presencia de reproducción de especies migratorias no se detectó, con la excepción de la aparición de huevos de *Salminus brasiliensis* aguas debajo de la represa de Salto Grande, una zona de alta concentración de adultos. La presencia de adultos de peces migratorios en el tramo inferior del río podría estar muy influenciada por el aporte de individuos de desoves del Río Paraná y de la deriva de larvas desde el tramo medio a través de la represa de Salto Grande (Fuentes et al. 2016), más que por un desove significativo de estas especies en el tramo inferior.

No se encontraron huevos o larvas de especies invasoras que han constituido serios problemas en otras regiones como *Ctenophthalmichthys molitrix*, *Arstichthys nobilis*, *Cyprinus carpio*, u *Oreochormis niloticus*, especies que han sido detectadas como adultos en la cuenca y que podrían representar una amenaza a la diversidad íctica nativa.

Conclusiones principales y recomendaciones para el manejo

- En el Río Uruguay, el tramo inferior parece ser de menor importancia para la reproducción de especies migratorias de importancia pesquera, mientras que el tramo medio, en particular en la Provincia de Misiones y el norte de Corrientes se identificaron desoves de todas estas especies. Se recomienda prestar especial atención a posibles emprendimientos que alteren el caudal del río en la región de Misiones (tramo medio del río), para la preservación de los principales recursos pesqueros del tramo medio compartido (Entre Salto Grande y Bella Unión) y al tramo inferior por medio de deriva de larvas aguas abajo a través de la Represa de Salto Grande.
- Se destaca que no se encontraron huevos o larvas no viteladas de especies invasoras pero sería recomendable vigilar la presencia de esas especies en el ictioplancton, de modo de tener una alerta temprana de su reproducción, para mitigar la influencia negativa que pudieran tener las especies invasoras sobre la diversidad íctica del Río Uruguay.

Referencias

- Agostinho AA, Gomes LC, Fernandez DR, Suzuki HI. 2002. Efficiency of fish ladders for neo tropical ichthyofauna. *River Research and Applications* 18: 299–306.
- Agostinho AA, Thomaz SM, Gomes LC. 2005. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. *Conservation Biology* 19: 646–652.
- Agostinho AA, Marques EE, Agostinho CS, Almeida DA, Oliveira RJ, Melo JRB. 2007. Fish ladder of Lajeado dam: migrations on one-way routes? *Neotropical Ichthyology* 5: 121–130.
- Agostinho CS, Pelicice FM, Marques EE, Soares AB, Almeida DA. 2011. All that goes up must come down? Absence of downstream passage through a fish ladder in a large Amazonian river. *Hydrobiologia* 675: 1–12.
- Charif, D., and Lobry, J.R. 2007. Seqin{R} 1.0-2: a contributed package to the {R} project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis. *In* Structural approaches to sequence evolution: Molecules, networks, populations. *Edited by* U. Bastolla, M. Porto, H.E. Roman, and M. Vendruscolo. Springer Verlag, New York. pp. 207–232.
- Edgar, R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19): 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461.
- Fuentes, C.M., Gómez, M.I., Brown, D.R., Arcelus, A., and Espinach Ros, A. 2016. Downstream Passage of Fish Larvae at the Salto Grande Dam on the Uruguay River. *River Res. Appl.* 32(9): 1879–1889. doi:10.1002/rra.3030.
- Fuentes, C.M., M. I. Gómez, J. L. Salva, I. E. Lozano y S. Llamazares Vegh. 2018. Actividad reproductiva de peces migratorios estimada a través del flujo de larvas . Indices de abundancia larval (IAL). Períodos 2014-2015 y 2015-2016, y análisis en retrospectiva 2008-2016. Informe Técnico. Programa de Conservación de la Fauna Ictica y los Recursos Pesqueros del Río Uruguay. CARU.

- Morgan, M., Anders, S., Lawrence, M., Aboyoun, P., Pages, H., and Gentleman, R. 2009. ShortRead: a bioconductor package for input, quality assessment and exploration of high-throughput sequence data. *Bioinformatics* **25**(19): 2607–2608. doi:10.1093/bioinformatics/btp450.
- Nion, H., and Meneses, P. 2002. Peces del Uruguay. Lista Sistemática y Nombres Comunes. DINARA / INFOPECA, Montevideo, Uruguay.
- Pagès, H., Aboyoun, P., Gentleman, R., and DebRoy, S. 2019. Biostrings: Efficient manipulation of biological strings. R package version 2.52.0.
- Pellicice FM, Pompeu PS, Agostinho AA. 2015. Large reservoirs as ecological barriers to downstream movements of Neotropical migratory fish. *26*(4): 697-715. *Fish and Fisheries*. DOI:10.1111/faf.12089.

Figura 1. Localidades del Río Uruguay donde se realizaron los muestreos de huevos y larvas viteladas. El area roja consigna la zona de deriva en tramo medio y en azul la del tramo inferior. Los números indican las localidades de muestreo: El Soberbio (1), Panambí (2), Yapeyú (3), Benito Legerén (4), Paysandú (5) y Fray Bentos (6).



Figura 2. Proporción de individuos de cada especie en las muestras, agrupadas según estrategia reproductiva. ES (El Soberbio), PA (Panambí), YA (Yapeyú), BL (Benito Legerén), PU (Paysandú) y FB (Fray Bentos). EL eje x indica espacio y tiempo según las etiquetas dispuestas. Las etiquetas finalizadas con H y L indican pools de huevos y larvas respectivamente.

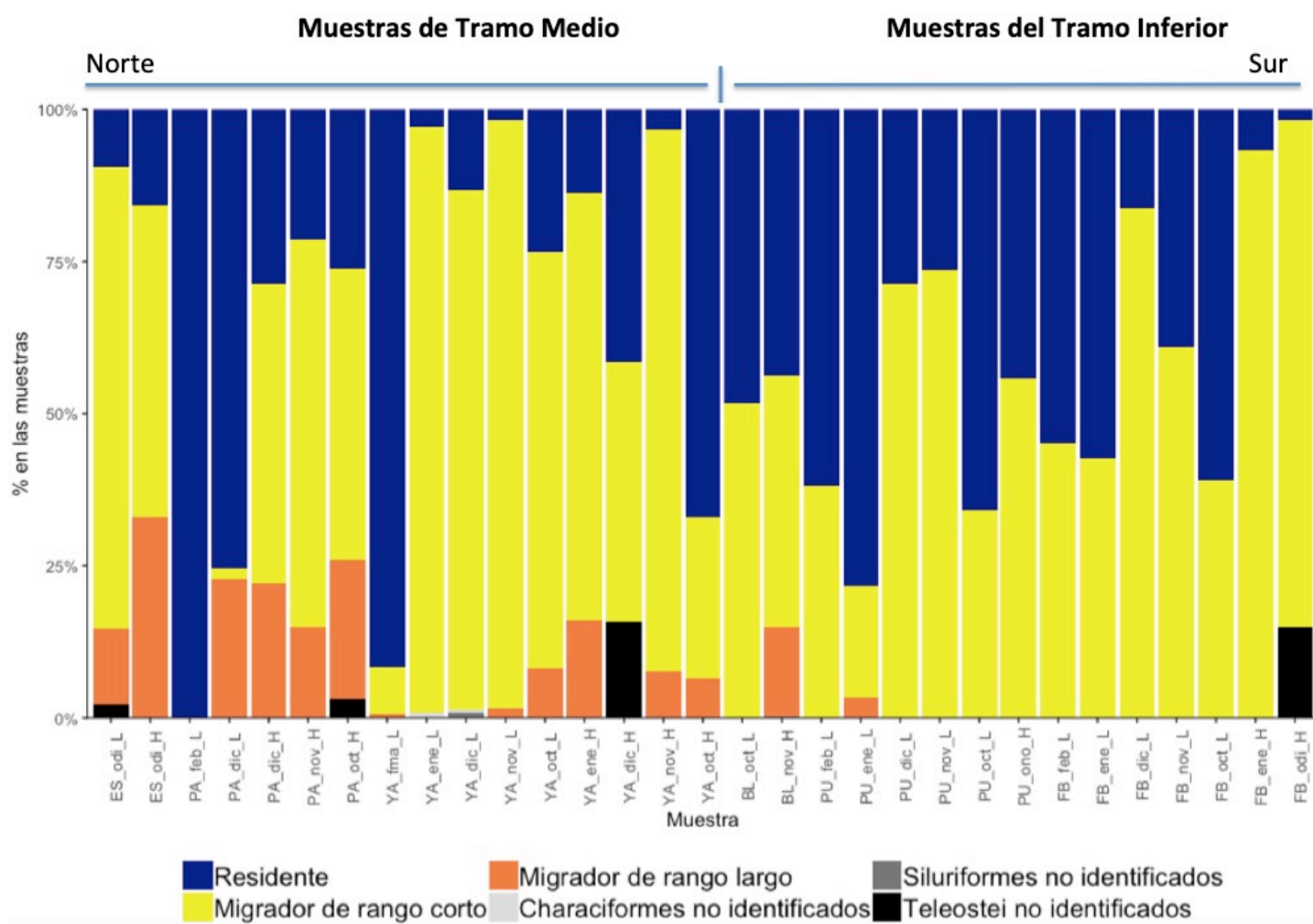


Figura 3. Proporción de las especies observadas por muestra al considerar solamente las especies migratorias de rango largo de importancia pesquera (*Megaleporinus obtusidens*, *Brycon orbignyanus*, *Salminus brasiliensis*, *Prochilodus lineatus*, *Luciopimelodus pati* y *Pseudoplatystoma corruscans*) en las 31 muestras analizadas.

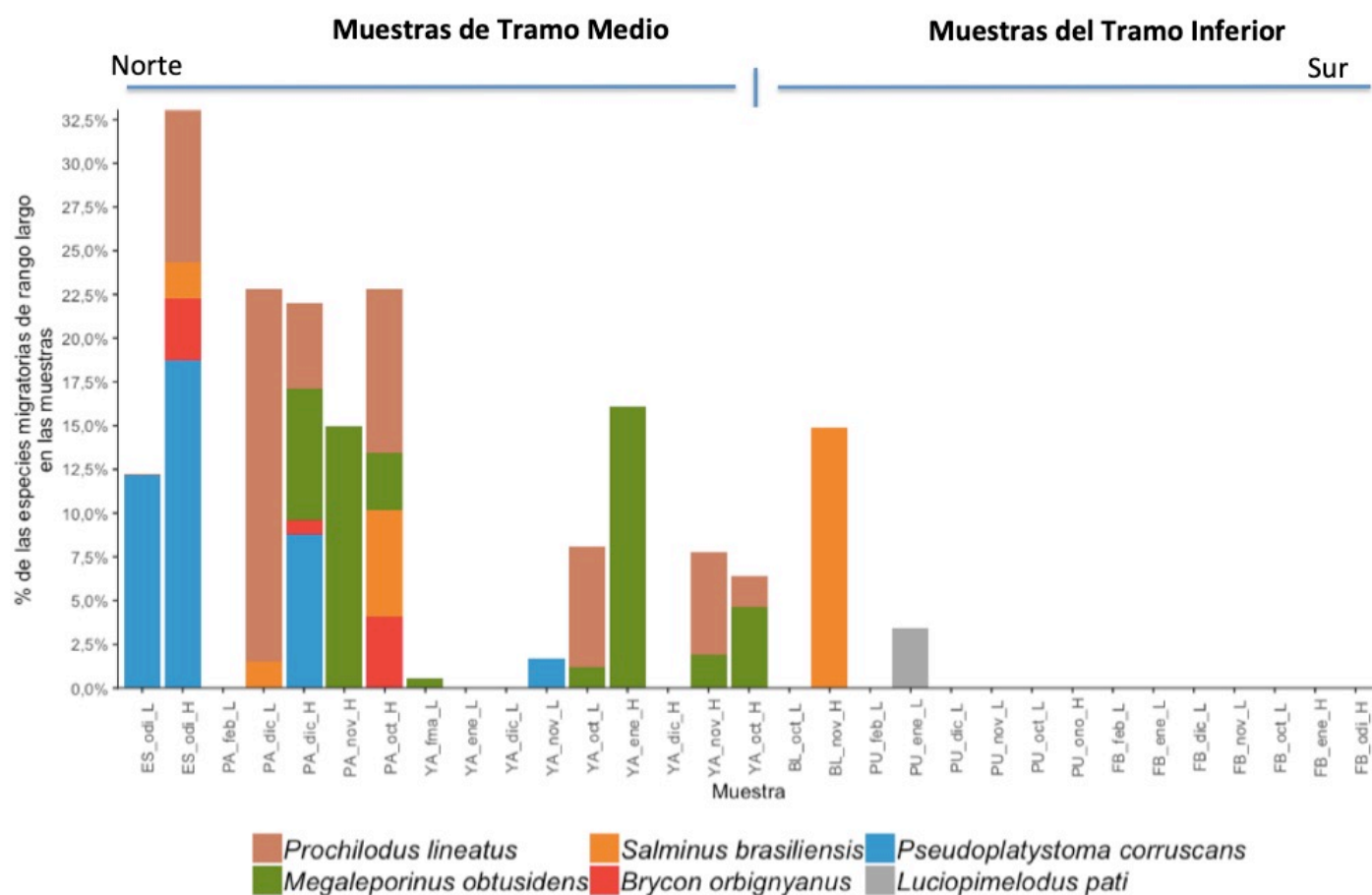


Tabla 1. Distribución de las Unidades Taxonómicas identificadas en los tramos medio e inferior del Río Uruguay, indicando la estrategia reproductiva de la especie relacionada a su movilidad. NC: no conocida; Res: residente; MRCM: migratorio de rango corto o medio; MRL: migratorio de rango largo.

Espece	Estrategia reproductiva	Tramo medio	Tramo inferior
TELEOSTEI 01	NC	+	+
TELEOSTEI 02	NC	+	-
TELEOSTEI 03	NC	+	-
ORDEN CHARACIFORMES			
Characiformes 01	NC	+	-
Familia Parodontidae			
Parodontidae 01	Res	+	+
Familia Curimatidae			
<i>Cyphocharax platanus</i>	Res	+	+
<i>Cyphocharax sp_01</i>	Res	-	+
Familia Prochilodontidae			
<i>Prochilodus lineatus</i>	MRL	+	-
Familia Anostomidae			
<i>Leporinus striatus</i>	MRCM	+	+
<i>Megaleporinus obtusidens</i> 01	MRL	+	-
<i>Megaleporinus obtusidens</i> 02	MRL	+	-
<i>Schizodon sp. 01</i>	MRCM	+	+
<i>Schizodon sp. 02</i>	MRCM	+	-
Familia Crenuchidae			
<i>Characidium zebra</i>	Res	+	-
Familia Characidae			
<i>Astyanax sp.</i>	Res	+	+

<i>Odontostilbe pequirá</i>	Res	+	+
Characidae 01	Res	+	-
Characidae 02	Res	+	+
Familia Bryconidae			
<i>Brycon orbignyanus</i>		+	-
<i>Salminus brasiliensis</i> 01	MRL	+	+
<i>Salminus brasiliensis</i> 02	MRL	+	-
Familia Cynodontidae			
<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	MRCM	+	-
ORDEN SILURIFORMES			
Siluriformes 01	NC	+	-
Siluriformes 02	NC	-	+
Familia Heptateridae			
<i>Pimelodella gracilis</i>	Res	+	+
Familia Pimelodidae			
<i>Iheringichthys labrosus</i>	MRCM	+	+
<i>Luciopimelodus pati</i>	MRL	-	+
<i>Megalonema platanum</i>	MRCM	+	-
<i>Parapimelodus valenciennis</i>	MRCM	+	+
<i>Pimelodus albicans</i>	MRCM	+	-
<i>Pimelodus maculatus</i>	MRCM	+	+
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	MRL	+	-
Familia Pseudopimelodidae			
<i>Microglanis</i> sp	Res	+	-
<i>Pseudopimelodus mangurus</i>	MRCM	+	-
Familia Trichomycteridae			
<i>Paravandellia</i> sp	Res	+	-

Familia Doradidae			
<i>Pterodoras granulosus</i>	MRCM	+	-
ORDEN CLUPEIFORMES			
Familia Engraulidae			
<i>Lycengraulis grossidens</i>	MRCM	+	+
ORDEN PERCIFORMES			
Familia Sciaenidae			
<i>Pachyurus bonariensis</i>	MRCM	+	-
ORDEN PLEURONECTIFORMES			
Familia Achiridae			
<i>Catathyridium jeninsii</i>	Res	+	-
Número de especies por tramo		36	17