

# **Ultraestructura espermática en peces del género *Austrolebias***

Magela Rodao, 2015

Trabajo Especial II

Licenciatura en Bioquímica

Orientadora: Gabriela Casanova

Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión

Facultad de Ciencias-UdelaR

## INDICE

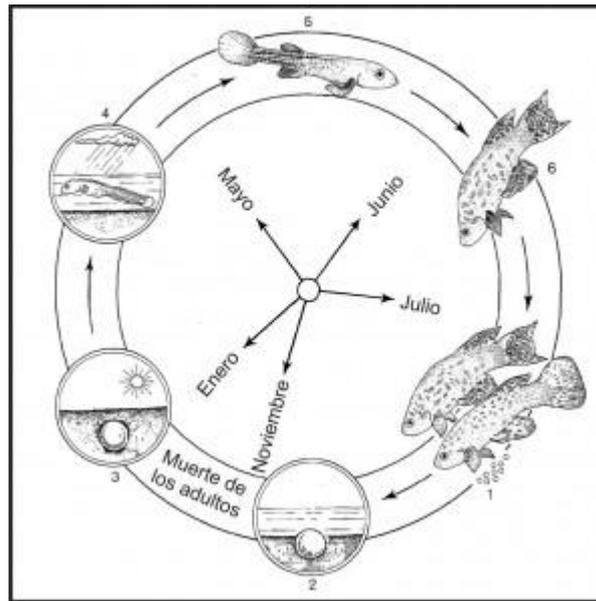
INTRODUCCION .....	1
<i>Austrolebias</i> .....	1
Estructura gonadal.....	2
El espermatozoide .....	3
Por qué el espermatozoide de <i>Austrolebias</i> .....	4
MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
RESULTADOS.....	9
<i>Austrolebias affinis</i> .....	9
<i>Austrolebias bellottii</i> .....	11
<i>Austrolebias charrua</i> .....	13
<i>Austrolebias luteoflammulatus</i> .....	15
<i>Austrolebias melanoorus</i> .....	17
<i>Austrolebias nigripinnis</i> .....	19
<i>Austrolebias reicherti</i> .....	21
<i>Austrolebias vazferreirai</i> .....	23
Morfología subcelular del espermatozoide de <i>Austrolebias</i> .....	25
Características diferenciales a nivel de la cabeza.....	25
Características diferenciales a nivel de la pieza media .....	26
Características diferenciales a nivel del flagelo.....	28
DISCUSIÓN .....	31
CONCLUSIONES.....	36
PERSPECTIVAS.....	37
BIBLIOGRAFÍA .....	38

## INTRODUCCION

### *Austrolebias*

Entre los vertebrados, los peces son el grupo que presenta mayor diversidad morfológica, biológica y ecológica, lo cual se refleja en la variedad de estrategias reproductivas presentes. Dentro de este grupo zoológico, el orden Cyprinodontiformes comprende familias que presentan modos reproductivos únicos. Perteneciente a este orden, el género *Austrolebias* cuenta actualmente con al menos 38 especies reconocidas (Costa, 2006), que habitan charcos temporales de la región sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y norte y noreste de Argentina. Específicamente, están distribuidas en la cuenca Paraná-Plata y en el sistema de lagunas Patos-Merín (Costa, 2006; Loureiro, y col., 2011).

Son peces Neotropicales de agua dulce, con ciclo de vida anual (figura 1). Durante la estación lluviosa, los charcos se mantienen llenos y los adultos se reproducen, generando embriones que quedan enterrados en el barro del fondo de los charcos. Al llegar el verano, las lluvias disminuyen, aumenta la temperatura y, los charcos se secan determinando la muerte de toda la población de peces. Sin embargo los embriones generados tienen la particularidad de resistir a la desecación, de manera que, cuando vuelve la estación lluviosa, el charco se llena y los embriones completan su desarrollo y eclosionan. Los juveniles alcanzan rápidamente la madurez sexual (de 8-12 semanas luego de la eclosión, en condiciones de laboratorio) (Vaz-Ferreira y col., 1964; Volcan y col., 2013), dando inicio a un nuevo ciclo (Wourms, 1964, 1967; Arezo y col., 2005; Berois y col., 2015).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Austrolebias* en Uruguay. 1) Reproducción; 2) Puesta de huevos durante meses de invierno y primavera; 3) Muerte de adultos a medida que los charcos se secan. Los huevos quedan enterrados en el sustrato durante el verano; 4) Período de lluvias (otoño), donde los charcos se llenan de agua y eclosionan las larvas; 5 y 6) desarrollo y maduración de larvas a adultos. Modificado de Wourms (1972).

### *Estructura gonadal*

Las especies de este género son gonocóricas, es decir que las gónadas se desarrollan directamente a ovario o testículo sin estadios intermedios. Su diferenciación sexual, a diferencia de lo que pasa en especies de peces gonocóricos no anuales, ocurre en estadios preeclusión (Arezo y col., 2007; Berois y col., 2015).

En *Austrolebias*, al igual que en otros peces teleósteos, los testículos son estructuras pares, elongadas, rodeadas por la túnica albugínea, situadas dorsalmente en la cavidad peritoneal (Schulz y col., 2010). Cada testículo se compone de un compartimento germinal y uno intersticial separados por una membrana basal. El tejido germinal está organizado en lóbulos, los cuales se extienden desde el borde externo hacia la región central del testículo, donde se abren en una red de tubos deferentes. El ducto deferente principal conecta ambos testículos con la papila genital (Berois y col., 2015). El compartimento germinal está formado por nidos o cistos, que consisten en grupos

de células germinales rodeados por células de Sertoli. Todas las células germinales que integran un cisto están conectadas entre sí a través de puentes citoplásmicos, lo que permite su maduración de manera sincrónica. Entre los lóbulos del compartimento germinal, se ubica el tejido intersticial, integrado por tejido conectivo que contiene células de Leydig (esteroidogénicas), fibroblastos, fibras de colágeno, mastocitos, macrófagos, células de la sangre, vasos sanguíneos y fibras mielínicas (Grier, 1981; Schultz y col., 2010).

De acuerdo al tamaño y a las características citoplasmáticas y nucleares de la célula germinal, ha sido posible identificar cinco estadios: espermatogonia, espermatocitos I y II, espermatidas y espermatozoides (Berois y col., 2015).

Además, los testículos de *Austrolebias* son de tipo "lobular restringido", característica propia de los peces pertenecientes a la serie Atherinomorpha (Grier y col., 1980; Parenti & Grier, 2004). En este tipo de testículo, las espermatogonias menos diferenciadas se disponen exclusivamente en el extremo distal del lóbulo, cerca de la túnica albugínea. A medida que avanza la maduración de las células, se observa un ordenamiento creciente de los cistos que migran desde el extremo distal de los lóbulos hacia los tubos deferentes. La espermiación se produce cuando los cistos se abren liberando los espermatozoides en los conductos espermáticos (Grier, 1981).

### *El espermatozoide*

En peces teleósteos, la morfología espermática presenta notables diferencias según se trate de grupos que presentan fecundación interna o externa. Generalmente, en las especies con fecundación interna, el núcleo es alargado y la pieza media es grande e integrada por numerosas mitocondrias. Los teleósteos con fecundación externa, en cambio, presentan un espermatozoide con organización más simple. En su mayoría el núcleo es esférico, más pequeño y la pieza media mucho más corta e integrada de unas pocas mitocondrias (generalmente entre 1 y 6), pudiendo ser mono o biflagelados (Lahnsteiner y Patzner, 2008). Jamieson (1991) llamó a ambos tipos de espermatozoides como "introesperma" y "aquaesperma", respectivamente. Cabe destacar la existencia de excepciones, d

onde especies de fecundación interna presentan morfología espermática típica de fecundación externa, como las descritas hasta el momento para la familia Goodeidae (Grier y col., 1978; Jamieson, 1991).

Si bien se han publicado algunas revisiones dedicadas al estudio de la estructura subcelular del espermatozoide de varios grupos de peces (Baccetti 1991; Jamieson 1991; Mattei 1991), hasta el momento sólo se conocen dos estudios que involucran datos de este tipo para especies pertenecientes al género *Austrolebias* (Arezo y col., 2007; García y col., 2009). En los mismos, se realiza una descripción parcial del espermatozoide de *A. charrua*, *A. reicherti* y *A. viarius*, caracterizándolos como aquaesperma uniflagelado sin acrosoma, típico de teleósteos de fecundación externa (Jamieson, 1991).

### *Por qué el espermatozoide de Austrolebias*

Si bien la morfología del espermatozoide entre distintos grupos de osteíctios es muy heterogénea, a nivel de especies pertenecientes a una misma familia ó subfamilia sí está muy conservada. Características ultraestructurales como el grado de compactación de la cromatina, la forma final del núcleo, el número y disposición de las mitocondrias en la pieza media, el número de flagelos y el número de aletas en el flagelo, pueden presentar múltiples semejanzas entre espermatozoides de especies pertenecientes a una misma familia (Jamieson, 1991). Este aspecto ha determinado que dichas características sean ampliamente utilizadas en los estudios de sistemática y en análisis que buscan establecer la existencia de relaciones filogenéticas entre peces (Jamieson, 1991; Berois y col., 2011; Cassel y col., 2014).

Dado que estudios morfológicos y genéticos realizados hasta el momento en *Austrolebias*, dan cuenta de la presencia de eventos de hibridación tanto en la naturaleza como en el laboratorio, el estudio de la morfología espermática podría contribuir a establecer relaciones de parentesco entre especies.

Además, la caracterización ultraestructural, tanto de estructuras compartidas como de estructuras especie-específicas, permitiría una mejor comprensión de los mecanismos de interacción ovocito-esperma.

## MATERIALES Y MÉTODOS

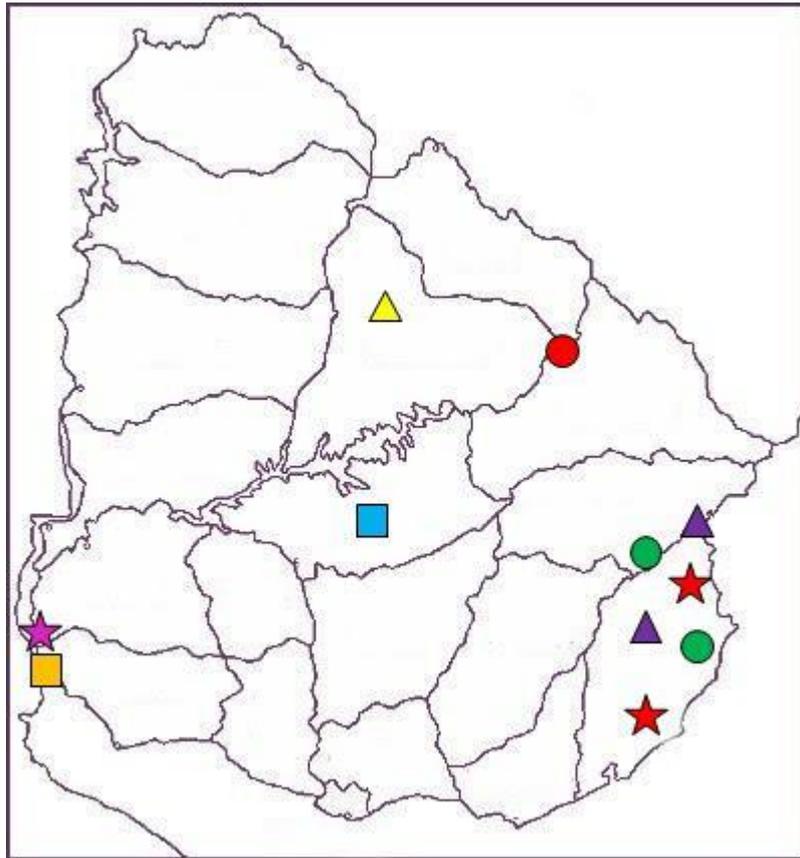
En este estudio se analizaron muestras de testículo de 8 especies diferentes de peces del género *Austrolebias*: *A. affinis*, *A. bellottii*, *A. charrua*, *A. luteoflammulatus*, *A. melanoorus*, *A. nigripinnis*, *A. reicherti* y *A. vazferreirai* (3 ejemplares por especie).

### *Animales*

Los procedimientos que implican manipulación directa de los ejemplares fueron realizados por integrantes de un grupo de investigación debidamente habilitados por la CHEA con excepción de la colecta de *Austrolebias charrua* y *A. reicherti* que fue realizada por mí, bajo la supervisión de investigadores habilitados por la CHEA.

### *Áreas de colección*

Todos los ejemplares de *Austrolebias* analizados para este estudio, fueron recolectados dentro de territorio uruguayo (Figura 2): los machos de *A. luteoflammulatus* en el departamento de Rocha, al igual que *A. charrúa* y *A. reicherti*. Ejemplares de estas dos últimas especies, también se colectaron en charcos localizados al sureste del departamento de Treinta y Tres. Los especímenes de *A. affinis* se obtuvieron al sur del río Negro, en la región central del departamento de Durazno. Los ejemplares de *A. bellottii* y *A. nigripinnis* pertenecen a la región sudoeste de Uruguay, entre los departamentos de Colonia y Soriano. Los especímenes de *A. melanoorus* se colectaron en el departamento de Tacuarembó y *A. vazferreirai* en la región noreste de Uruguay, en el área comprendida entre los departamentos de Tacuarembó, Rivera y Cerro Largo, al norte del río Negro. Todos los ejemplares colectados fueron transportados hasta el laboratorio en recipientes conteniendo agua del charco correspondiente. Una vez llegados al acuario, se traspasaron a peceras en las que el agua de charco fue sustituida paulatinamente por agua libre de cloro.



**Figura 2.** Mapa de Uruguay mostrando los puntos donde se colectaron los especímenes de *Austrolebias*. Estrella roja = *A. luteoflammulatus*, círculo verde = *A. charrua*, triángulo violeta = *A. reicherti*, cuadrado azul = *A. affinis* cuadrado anaranjado = *A. bellottii*, estrella violeta = *A. nigripinnis*, triángulo amarillo = *A. melanoorus* y círculo rojo = *A. vazferreirai*.

### *Procesamiento de las muestras*

Los ejemplares de *Austrolebias charrua* y *A. reicherti* fueron fijados por perfusión intracardiaca. Para ello, los animales se anestesiaron previamente colocando una gota de eugenol en el agua, hasta que alcanzaron sedación profunda. Luego de lavado el sistema vascular del pez se procedió a su fijación por perfusión transcardiaca con paraformaldehído (PAF) al 10% en buffer fosfato (BF) a pH 7,2.

Los especímenes de *Austrolebias affinis*, *A. bellottii*, *A. luteoflammulatus*, *A. melanoorus*, *A. nigripinnis* y *A. vazferreirai* fueron sacrificados por decapitación, a continuación se les realizó un corte en posición ventral a través del cual se inyectó una

solución tamponada de paraformaldehído (PAF) al 4% con glutaraldehído al 2.5%. Este procedimiento permite asegurar una mejor preservación del tejido pues, por un lado, al fijar las células se detienen los procesos degradativos que se inician con la muerte del animal y por otro, le confiere mayor rigidez a los tejidos facilitando la disección de las gónadas sin producir lesiones mecánicas en las mismas.

Los testículos obtenidos por ambos procedimientos se fijaron durante toda la noche a 4°C en una solución tamponada de PAF al 4% con glutaraldehído al 2.5% en BF a pH 7,2. A continuación se procedió a eliminar la solución fijadora de las muestras, realizando 5 lavados sucesivos de 5 min c/u con BF. Utilizando una lupa binocular, y siempre bajo inmersión en BF, se trozaron transversalmente con un bisturí. Los fragmentos de testículo así obtenidos se post fijaron con tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% en BF durante 1 hs. Luego se lavaron con BF (5 cambios de 5 min c/u), y se deshidrataron utilizando soluciones de etanol de concentración creciente (concentraciones de etanol: 25%, 50%, 75%, 95% y 100%), seguidas de dos baños con acetona anhidra ppa. La impregnación de las muestras se llevó a cabo en mezclas de araldita-acetona de concentración creciente (25%, 50% y 75%) durante 30 minutos cada una. Luego se sumergieron en araldita pura en recipientes tapados a 4°C durante toda la noche. Finalmente las muestras se incluyeron en moldes de silicona conteniendo araldita pura (Durcupan ACM, Fluka), y se llevaron a polimerizar en estufa regulada a 58 - 60 °C durante 48 horas.

### *Obtención de cortes semi y ultrafinos*

Los bloques de resina conteniendo las muestras fueron tallados bajo lupa con una hoja de afeitar, de modo que las aristas superior e inferior de la cara de corte fuesen paralelas, para poder formar "cintas" con cortes sucesivos. Los cortes semifinos (0.5  $\mu\text{m}$  de espesor) se realizaron utilizando una cuchilla de vidrio unida a una barquilla plástica rellena con agua MilliQ, en un ultramicrotomo marca RMC, modelo MT-X. Los cortes colectados se colocaron sobre un portaobjeto y se adhirieron al mismo por evaporación de los restos de agua con una fuente suave de calor. A continuación se

colorearon con solución acuosa de azul de metileno borácico al 1%. La observación se realizó en un microscopio Nikon ECLIPSE E200 equipado con un objetivo 40X.

Una vez visualizados los espermatozoides en los cortes semifinos, se retalló la cara del bloque y se realizaron cortes ultrafinos (40-60nm), para su observación en MET. Los cortes así obtenidos fueron colectados sobre rejillas de cobre con film formvar. El contraste de las muestras se realizó por flotación de los cortes en una solución de acetato de uranilo acuoso a saturación, en oscuridad y en estufa regulada a 48-50°C durante 1 h. Luego las rejillas conteniendo los cortes se lavaron exhaustivamente con agua bidestilada y se flotaron durante 10 minutos en una gota de citrato de plomo de Reynolds, en atmósfera libre de CO<sub>2</sub>.

### *Análisis ultraestructural*

La observación de la anatomía subcelular se realizó en un microscopio electrónico de transmisión marca Jeol, modelo JEM 1010, operando a 100kV. El registro de las imágenes micrográficas, se realizó a través de una cámara digital HAMAMATSU C4742-95 y software de control AMT ADVENTAGE CCD. El procesamiento de las mismas se llevó a cabo utilizando el programa Photoimpact.

## RESULTADOS

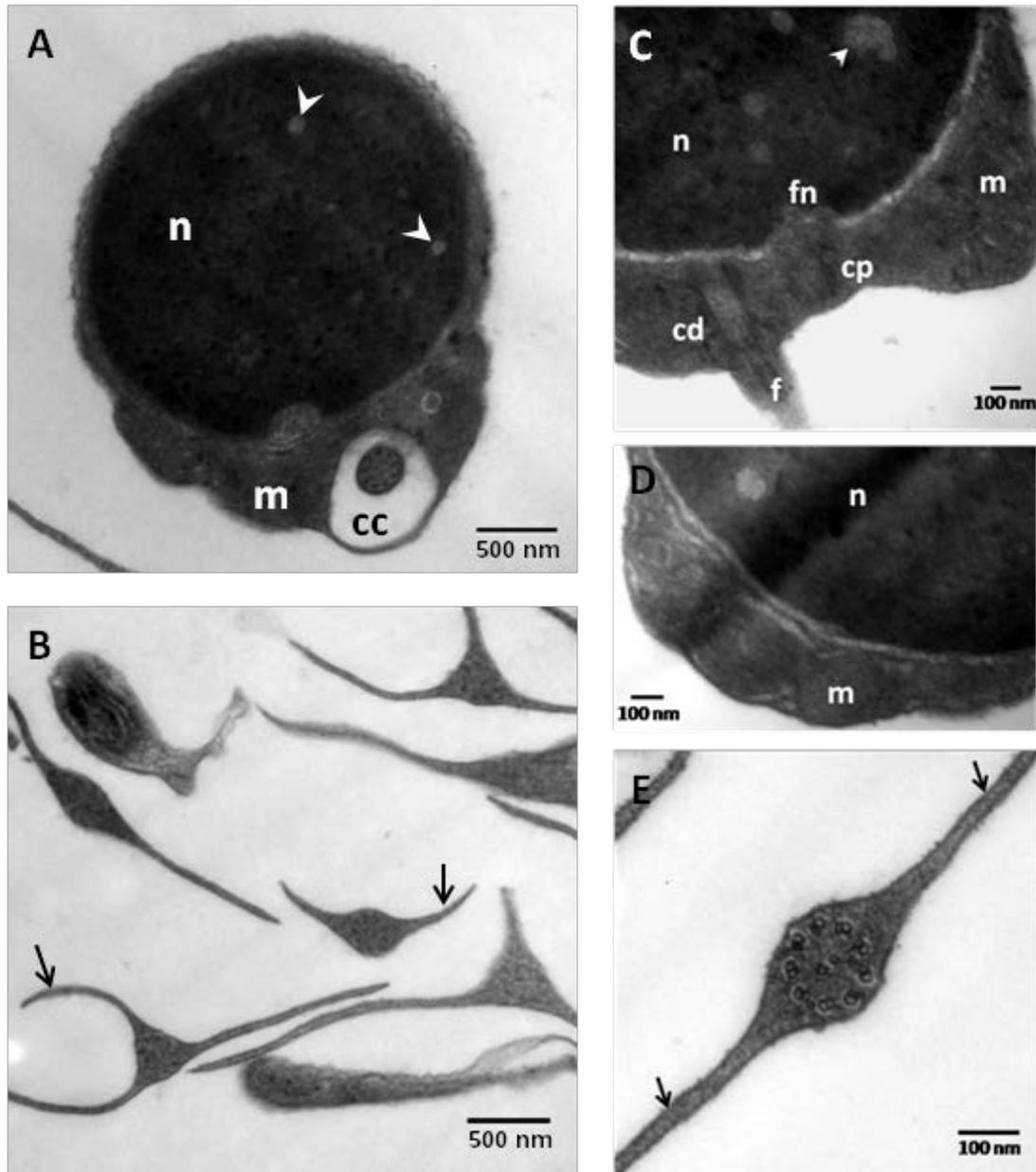
En el presente trabajo se realiza, en primer lugar, la descripción detallada para cada especie de *Austrolebias*, de las principales características ultraestructurales del espermatozoide a nivel de los tres sectores identificados en él: cabeza, pieza media y cola. En segundo lugar se describen y analizan comparativamente, las características subcelulares comunes a las ocho especies, identificando en los tres niveles, características diferenciales que solo algunas de las especies del género comparten.

### *Austrolebias affinis*

Cabeza: no posee acrosoma, presenta un núcleo con cromatina muy condensada con pocas y pequeñas regiones electronlúcidas (figuras 3A y 3C). La fosa nuclear es muy poco profunda y los centríolos se disponen fuera de ésta (figura 3C).

Pieza media: es corta e integrada por un anillo de mitocondrias dispuestas en una única hilera en torno al flagelo. Generalmente se trata de mitocondrias medianas a grandes (más de 500 nm), muy electrodensas y con crestas poco visibles (figura 3D). A este nivel la membrana plasmática se invagina formando el canal citoplasmático que separa físicamente al axonema de las mitocondrias (figura 3A).

Cola: el flagelo es único con axonema clásico (9+2) constituido por 9 dobletes de microtúbulos y un par central (figura 3E). Presenta predominantemente 2 aletas flagelares, aunque ocasionalmente se encuentran espermatozoides con 3 proyecciones laterales (figura 3B).



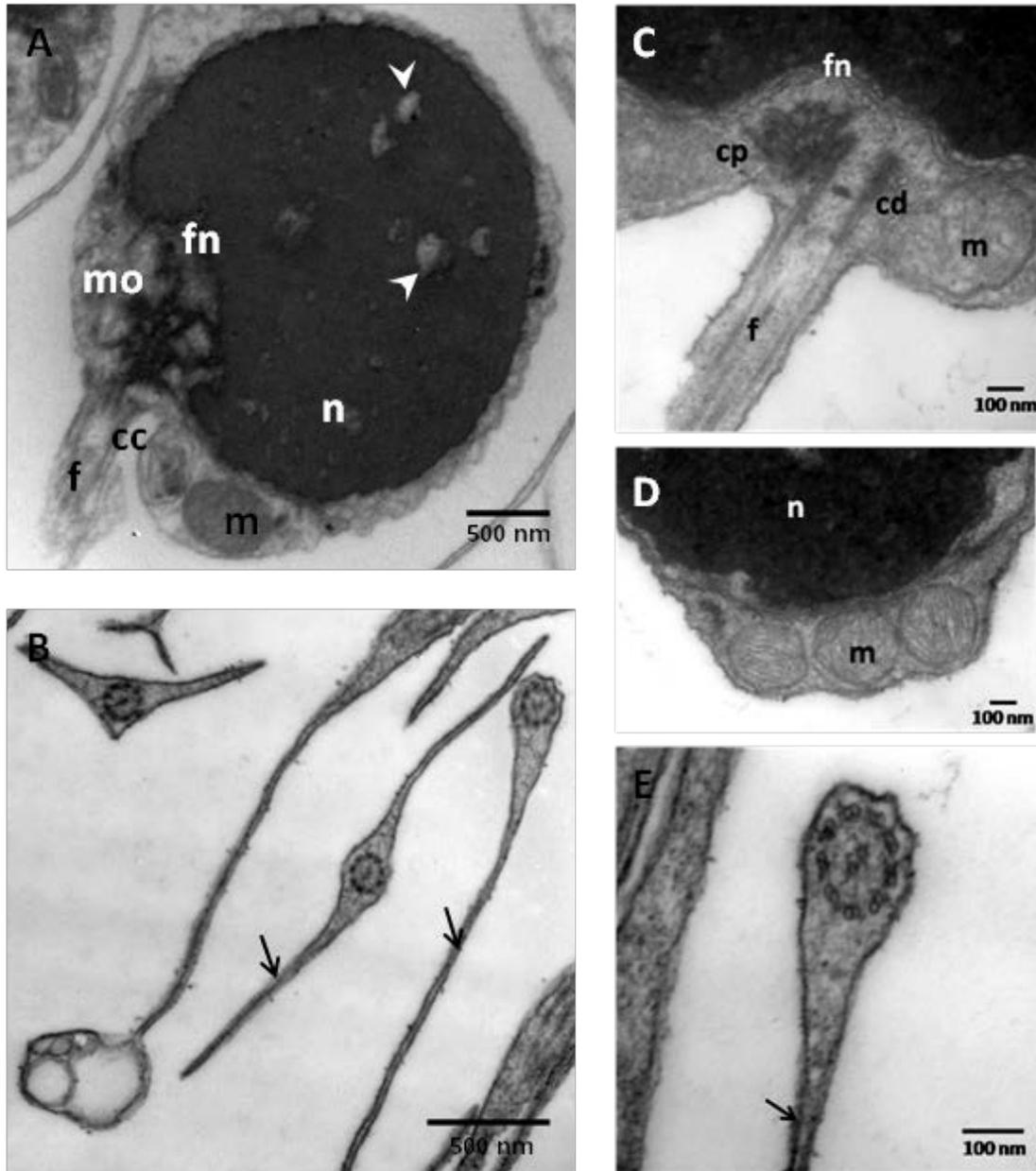
**Figura 3.** Micrografías electrónicas de espermatozoides de *Austrolebias affinis*. A) corte de la cabeza, la pieza media y parte del flagelo. B) corte transversal de flagelos, se observan espermatozoides con dos y tres aletas. C) corte longitudinal de parte de la cabeza, la pieza media y el flagelo, donde se observa el arreglo de los centríolos. D) detalle de la cabeza y la pieza media, se observa la disposición de las mitocondrias. E) corte transversal de un flagelo, donde puede observarse el axonema clásico 9+2. Núcleo (n); espacios electronlúcidos (punta de flecha); mitocondrias (m); el canal citoplasmático (cc); centríolo proximal (cp); centríolo distal (cd); fosa nuclear (fn); flagelo (f); aletas flagelares (flechas).

## *Austrolebias bellottii*

Cabeza: no posee acrosoma y presenta núcleo con cromatina condensada interrumpida por zonas electronúcidas generalmente pequeñas (figura 4A). Posee una fosa nuclear muy profunda que aloja completamente al centriolo proximal, mientras que el distal se encuentra fuera. Ambos en posición oblicua entre sí y asociados a material fibrilar osmiofílico dispuesto en forma radial (figuras 4A y 4C).

Pieza media: es corta y presenta mitocondrias de tamaño mediano dispuestas en una única hilera, cuyas crestas son claramente visibles (figura 4D). El canal citoplasmático se hace presente (figura 4A).

Cola: el flagelo es único y su axonema presenta la organización clásica 9+2. Si bien se encuentran espermatozoides con 1, 2 y 3 aletas flagelares (figuras 4B y 4E), existe una clara predominancia de espermatozoides con 2 aletas.



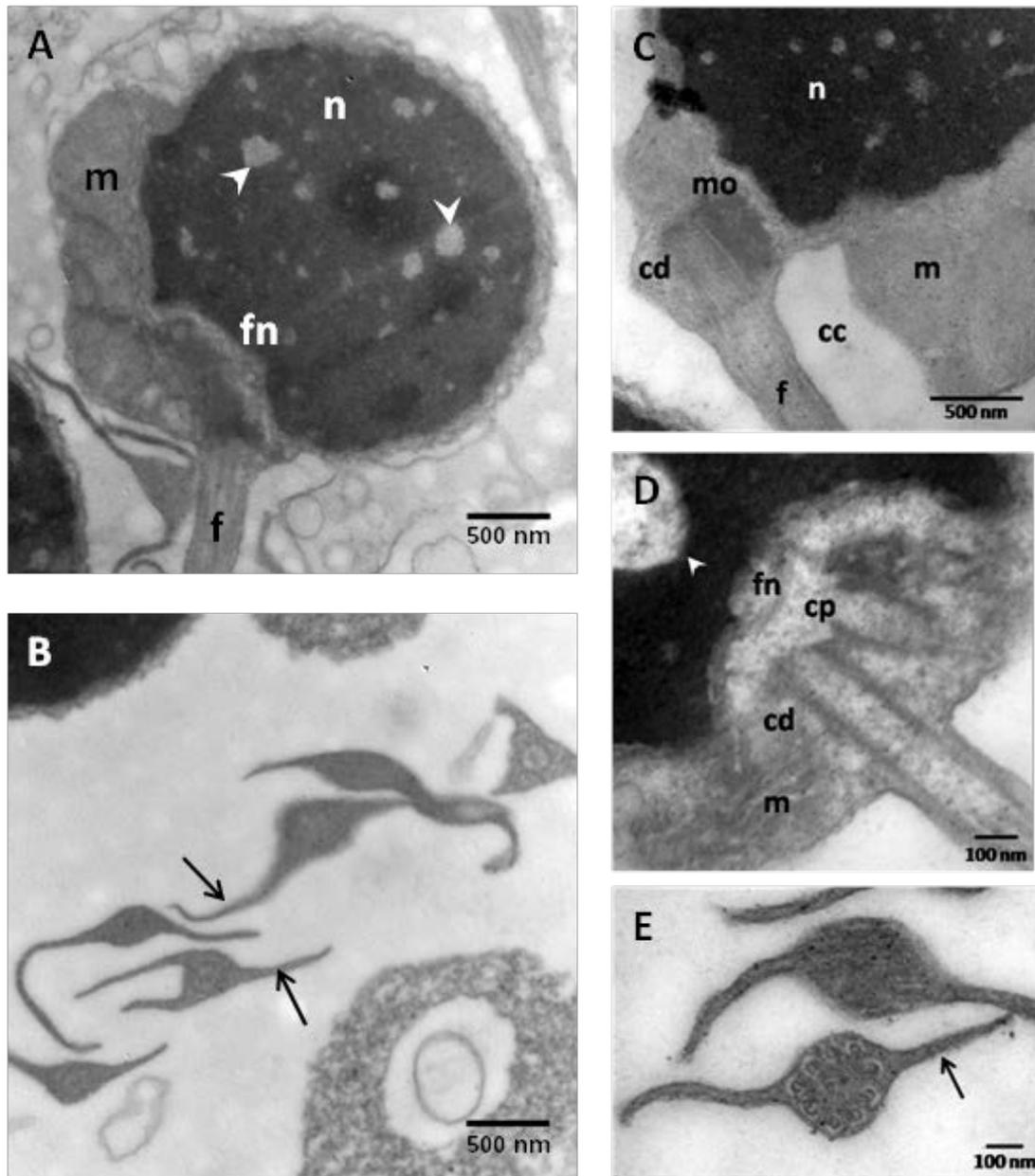
**Figura 4.** Micrografías electrónicas de espermatozoides de *Austrolebias bellottii*. A) corte longitudinal de la cabeza, la pieza media y parte del flagelo. B) corte transversal de flagelos, se observan espermatozoides con una, dos y tres aletas. C) corte longitudinal de parte de la cabeza, la pieza media y el flagelo, donde se observa el arreglo de los centriolos. D) vista parcial de la cabeza y la pieza media, se observa la disposición de las mitocondrias. E) corte transversal de una cola con una única aleta, donde puede observarse el axonema clásico 9+2. Núcleo (n); espacios electronlúcidos (punta de flecha); mitocondrias (m); el canal citoplasmático (cc); centriolo proximal (cp); centriolo distal (cd); material osmiofílico (mo); fosa nuclear (fn); flagelo (f); aletas flagelares (flechas).

## *Austrolebias charrua*

Cabeza: no posee acrosoma, presenta cromatina condensada con apariencia granular (figura 5C) interrumpida por numerosos espacios electronlúcidos de tamaños variados predominando los pequeños (figura 5A). Los centriolos se disponen oblicuamente entre sí y presentan material fibrilar osmiofílico asociado. La fosa nuclear es poco profunda y los centriolos se alojan fuera de ella (figura 5D).

Pieza media: es corta y presenta mitocondrias medianas y grandes con crestas poco visibles dispuestas en una única hilera. Posee canal citoplasmático que separa la hilera de mitocondrias del axonema (figura 5C).

Cola: el flagelo es único con axonema 9+2 (figura 5E). En los ejemplares de *A. charrua* analizados, se observó que en los testículos se encuentran espermatozoides con 2 y 3 aletas flagelares, predominando los espermatozoides con 2 aletas (figura 5B).



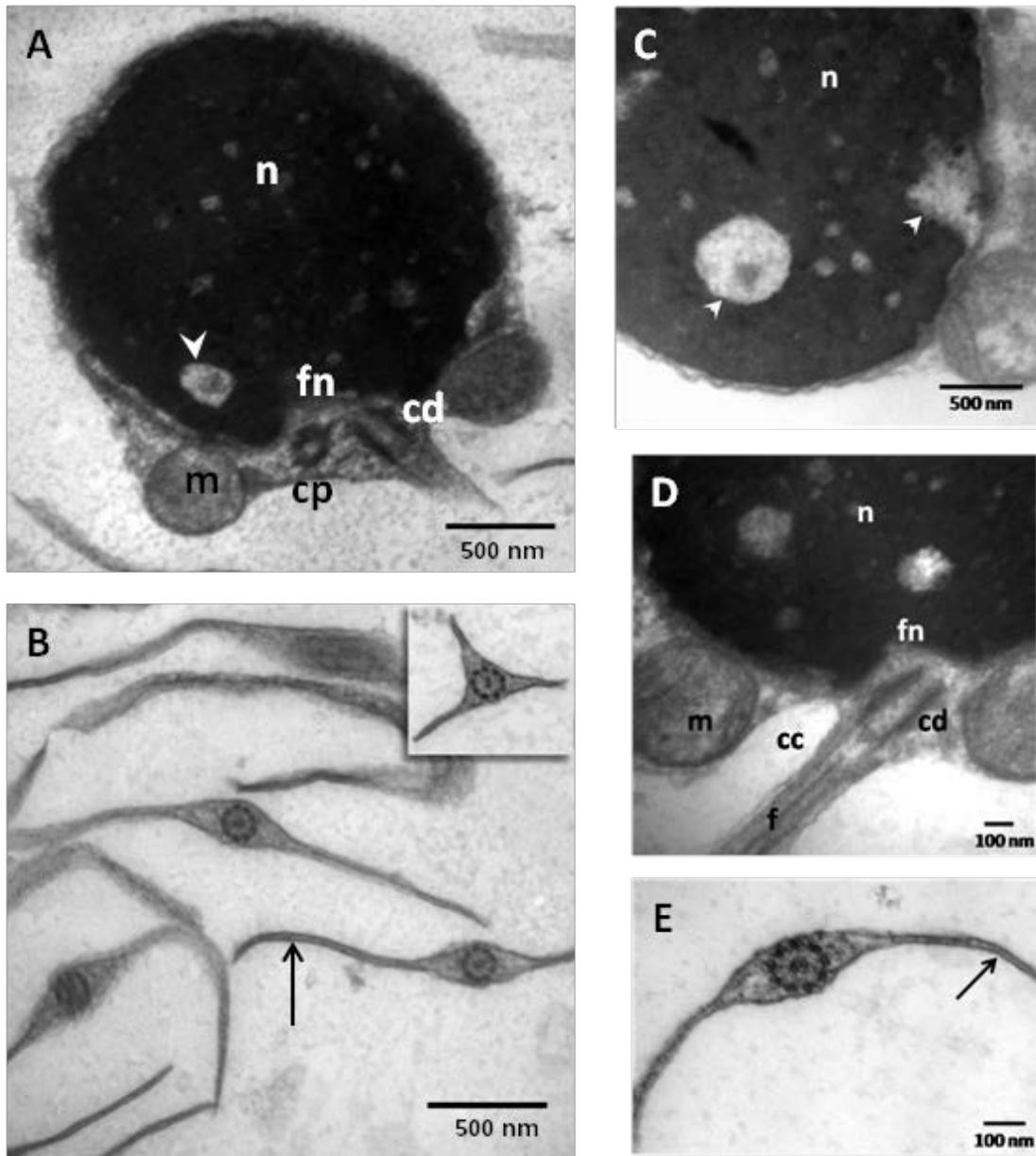
**Figura 5.** Micrografías electrónicas de espermatozoides de *Austrolebias charrua*. A) corte de la cabeza, la pieza media y parte del flagelo, se observa la cromatina, espacios electronlúcidos, fosa nuclear, flagelo y disposición de las mitocondrias. B) corte transversal de flagelos, se observan espermatozoides con dos y tres aletas. C) detalle de la cabeza, la pieza media y el flagelo. Se observa el canal citoplasmático, el centriolo distal con material osmiofílico asociado. D) corte longitudinal de la fosa nuclear, en la que se observa la disposición de los centriolos. E) Corte transversal de flagelos donde puede observarse el axonema clásico 9+2. Núcleo (n); espacios electronlúcidos (punta de flecha); mitocondrias (m); el canal citoplasmático (cc); centriolo proximal (cp); centriolo distal (cd); material osmiofílico (mo); fosa nuclear (fn); flagelo (f); aletas flagelares (flechas).

## *Austrolebias luteoflammulatus*

Cabeza: no posee acrosoma y presenta cromatina condensada interrumpida por unos pocos espacios electronlúcidos, generalmente grandes (figura 6C). La fosa nuclear, de profundidad moderada, contiene parcialmente al centríolo proximal, mientras que el centríolo distal se ubica fuera de la misma (figuras 6A y 6D).

Pieza media: es corta y presenta canal citoplasmático (figura 6D). Las mitocondrias son generalmente grandes (más de 500 nm) con pocas crestas visibles dispuestas en una única hilera (figuras 6A y 6D).

Cola: el flagelo es único con axonema 9+2 (figura 6E). Predominan espermatozoides con 2 aletas flagelares, aunque ocasionalmente pueden presentar 3 (figura 6B, inserto).



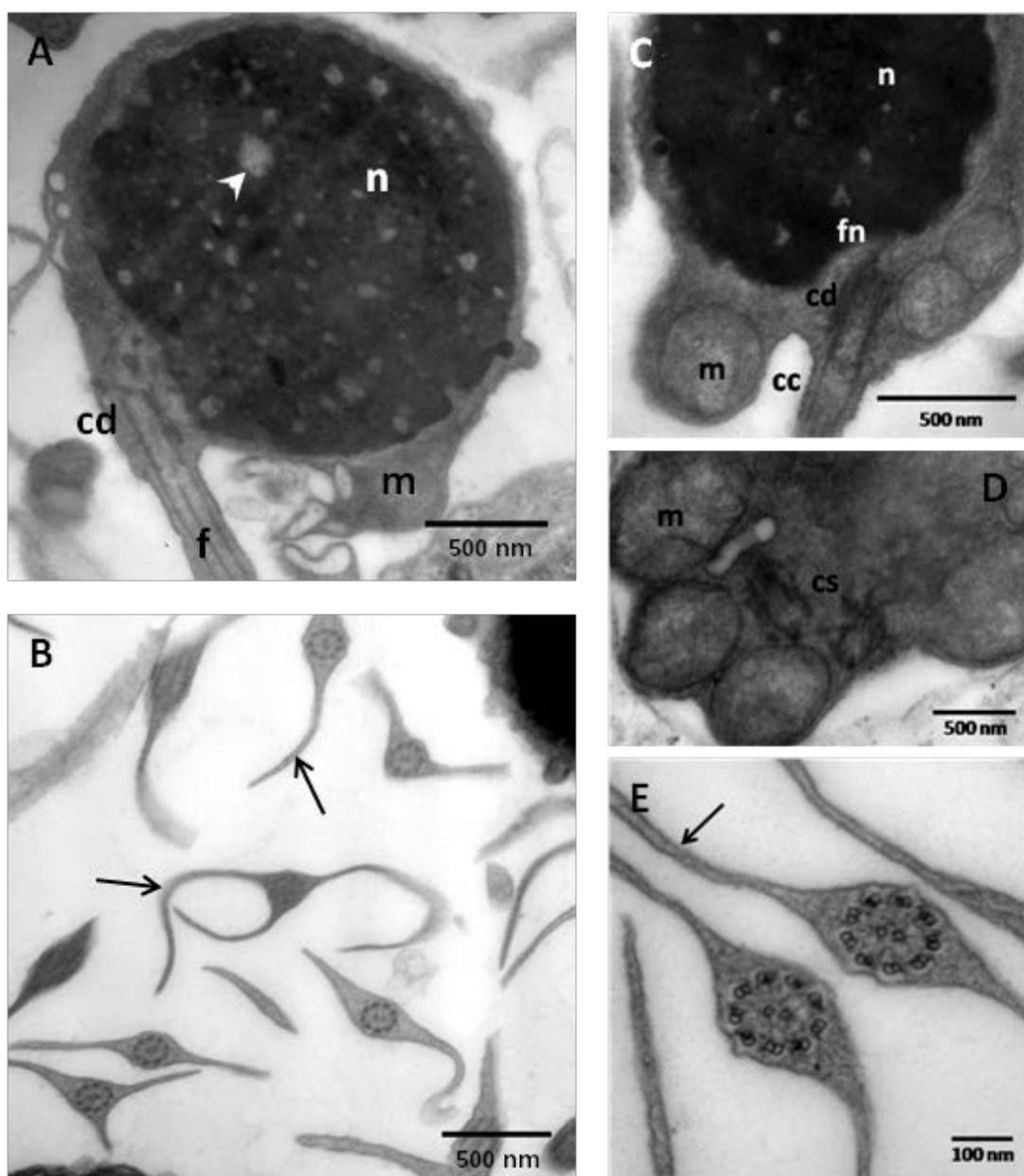
**Figura 6.** Micrografías electrónicas de espermatozoides de *Austrolebias luteoflammulatus*. A) y D) corte longitudinal con detalle de estructuras presentes en la cabeza, pieza media y flagelo. B) corte transversal de colas. Se observan flagelos con dos y tres aletas (inserto). C) corte longitudinal donde se observa parte de la cabeza con espados electronlúcidos grandes. E) corte trasversal de un flagelo en el que se observa el axonema 9+2. Núcleo (n); espacios electronlúcidos (punta de flecha); mitocondrias (m); el canal citoplasmático (cc); centriolo proximal (cp); centriolo distal (cd); fosa nuclear (fn); flagelo (f); aletas flagelares (flechas).

## *Austrolebias melanoorus*

Cabeza: no presenta acrosoma. El núcleo presenta cromatina condensada que a veces muestra apariencia granular (figura 7C). La cromatina condensada está interrumpida por numerosos espacios electronlúcidos generalmente pequeños (figura 7A). La fosa nuclear es pequeña (figura 7C) y ambos centriolos se alojan fuera de ésta. Los centriolos se disponen en posición oblicua entre sí (figura 7D).

Pieza media: es corta y presenta canal citoplasmático (figura 7C). Está constituido por mitocondrias generalmente de tamaño mediano con crestas poco visibles dispuestas en una hilera única (figura 7C y 7D).

Cola: el flagelo es único con axonema 9+2 (figura 7E). Presenta 2 y 3 aletas flagelares con predominio de espermatozoides con 2 aletas (figura 7B).



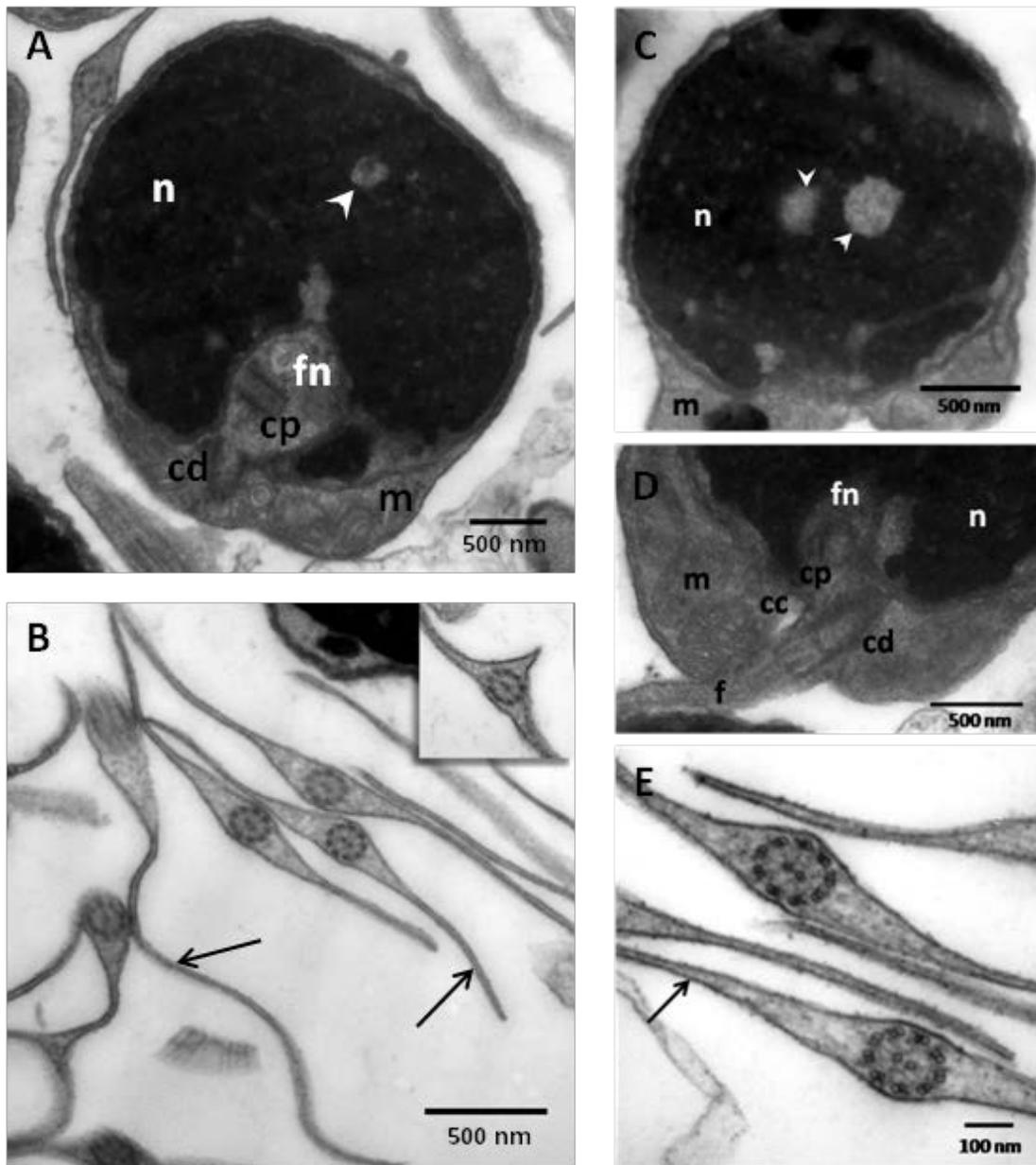
**Figura 7.** Micrografías electrónicas de espermatozoides de *Austrolebias melanoorus*. A) y C) corte longitudinal de la cabeza, pieza media y flagelo. Se observan la cromatina con espacios electronlúcidos; centriolo distal, canal citoplasmático y disposición de las mitocondrias. B) corte transversal de colas, se observan flagelos con dos y tres aletas. D) corte transversal de la pieza media dónde se observan mitocondrias y la disposición de los centriolos. E) corte trasversal de flagelos donde se observa el axonema 9+2. Núcleo (n); espacios electronlúcidos (punta de flecha); mitocondrias (m); el canal citoplasmático (cc); centriolos (cs); centriolo distal (cd); fosa nuclear (fn); flagelo (f); aletas flagelares (flechas).

## *Austrolebias nigripinnis*

Cabeza: no presenta acrosoma. La cromatina es altamente condensada ocasionalmente interrumpida por espacios electronlúcidos, generalmente de tamaño medio o grande (alrededor de 300 nm) (figuras 8A y 8C). La fosa nuclear es profunda y contiene al centriolo proximal; mientras que el centriolo distal se aloja fuera de ésta. Los centriolos se presentan dispuestos en posición oblicua entre sí (figuras 8A y 8D).

Pieza media: es corta y se observa el canal citoplasmático. Presenta mitocondrias de tamaño medio (alrededor de 500 nm), electrondensas y con crestas bien marcadas dispuestas en una única hilera (figuras 8A y 8D).

Cola: el flagelo es único con axonema 9+2 (figura 8E). Si bien se pueden observar espermatozoides con 1, 2 y 3 aletas flagelares (figura 8B inserto), predominan aquellos con 2 aletas (figura 8B).



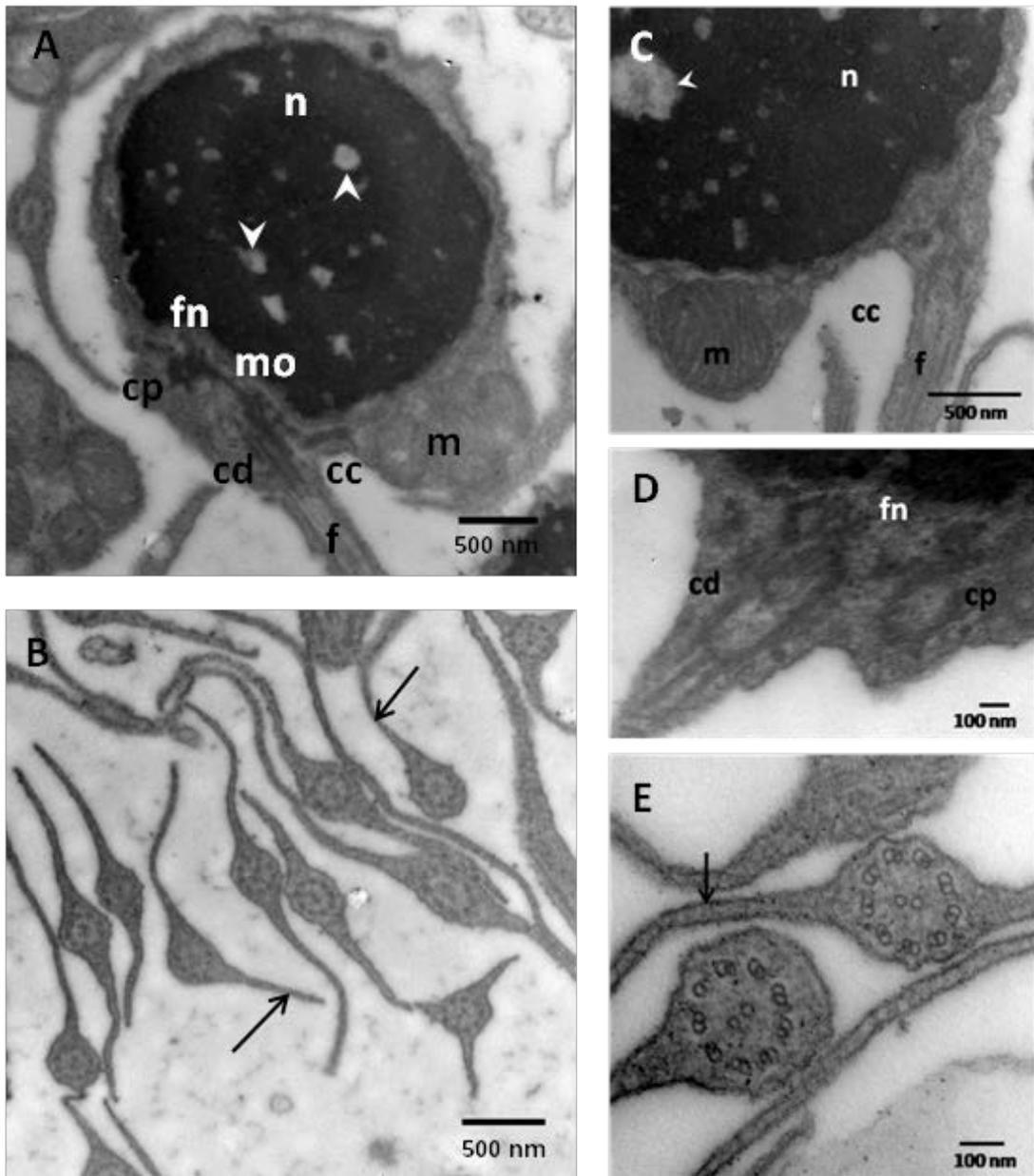
**Figura 8.** Micrografías electrónicas de espermatozoides de *Austrolebias nigripinnis*. A) corte longitudinal de la cabeza y la pieza media, se observan la cromatina condensada, espacios electronlúcidos, fosa nuclear, centriolos y mitocondrias. B) corte transversal de colas, se observan flagelos con dos y tres aletas (inserto). C) corte longitudinal del núcleo, con espacios electronlúcidos. D) corte longitudinal donde se observa parte de la cabeza, pieza media y flagelo. E) corte trasversal de flagelos donde se observa el axonema 9+2. Núcleo (n); espacios electronlúcidos (punta de flecha); mitocondrias (m); el canal citoplasmático (cc); centriolo proximal (cp); centriolo distal (cd); fosa nuclear (fn); flagelo (f); aletas flagelares (flechas).

## *Austrolebias reicherti*

Cabeza: no posee acrosoma y el núcleo presenta cromatina condensada con apariencia granular interrumpida por numerosos espacios electronlúcidos de tamaños variados predominando los pequeños (figuras 9A y 9C). La fosa nuclear es muy poco profunda y los centriolos se alojan fuera de ella dispuestos oblicuamente entre sí (figura 9D) y con material fibrilar osmiofílico asociado a ellos (figura 9A).

Pieza media: es corta y presenta canal citoplasmático (figura 9C). Las mitocondrias suelen ser de tamaño medio o grandes y aparecen generalmente electrondensas con crestas visibles dispuestas en una única hilera (figura 9A y 9C).

Cola: el flagelo es único con axonema clásico 9+2 (figura 9E). Se pueden observar espermatozoides con 1, 2 y 3 aletas flagelares, predominando aquellos con 2 aletas (figura 9B).



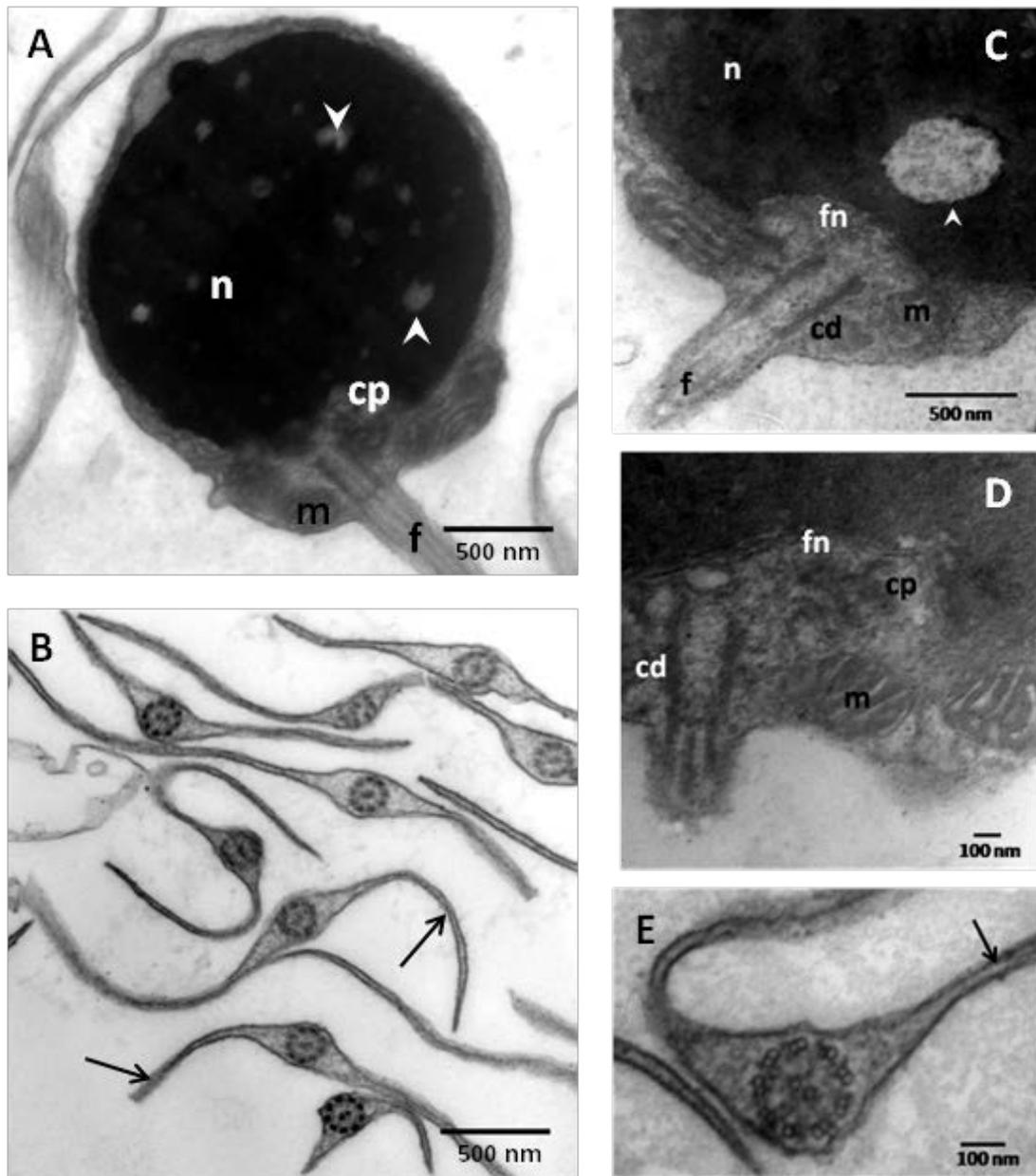
**Figura 9.** Micrografías electrónicas de espermatozoides de *Austrolebias reicherti*. A) y C) corte de cabeza, pieza media y flagelo. Se observan la cromatina granular, fosa nuclear, centriolos, material osmiofílico, canal citoplasmático, mitocondrias y flagelo. B) corte transversal de colas, se observan flagelos con una, dos y tres aletas. D) detalle de la cabeza y pieza media en que se observa la disposición de los centriolos. E) corte trasversal de flagelos donde se observa el axonema 9+2. Núcleo (n); espacios electronlúcidos (punta de flecha); mitocondrias (m); el canal citoplasmático (cc); centriolo proximal (cp); centriolo distal (cd); material osmiofílico (mo); fosa nuclear (fn); flagelo (f); aletas flagelares (flechas).

## *Austrolebias vazferreirai*

Cabeza: no presenta acrosoma. La cromatina condensada está interrumpida por numerosos espacios electronlúcidos, en su mayoría pequeños (figura 10A). Presenta fosa nuclear moderada que aloja parcialmente al centriolo proximal mientras que el centriolo distal se aloja fuera de ésta (figuras 10C y 10D). La posición entre centriolos es oblicua.

Pieza media: es corta y presenta mitocondrias generalmente pequeñas (aproximadamente 300 nm) con crestas marcadas dispuestas en una única hilera (figuras 10A, 10C y 10D). Posee canal citoplasmático pequeño.

Cola: el flagelo es único con axonema 9+2 (figura 10E). Se observan espermatozoides con 2 y 3 aletas flagelares con predominio de espermatozoides con 2 aletas (figura 10B).



**Figura 10.** Micrografías electrónicas de espermatozoides de *Austrolebias vazferreirai*. A) y C) corte longitudinal de la cabeza, la pieza media y el flagelo. Se observan la cromatina con espacios electronlúcidos, la fosa nuclear, los centriolos y las mitocondrias. B) corte transversal de colas, se observan flagelos con dos y tres aletas. D) vista parcial de la cabeza y pieza media, se observa la disposición de los centriolos. E) corte trasversal de un flagelo donde se observa el axonema 9+2. Núcleo (n); espacios electronlúcidos (punta de flecha); mitocondrias (m); centriolo proximal (cp); centriolo distal (cd); fosa nuclear (fn); flagelo (f); aletas flagelares (flechas).

### *Morfología subcelular del espermatozoide de Austrolebias*

Los espermatozoides de todas las especies analizadas comparten algunas características de su ultraestructura. La cabeza está ocupada casi completamente por el núcleo, cuya cromatina está fuertemente compactada. En la zona posterior de la cabeza, la envoltura nuclear se invagina dando lugar a la fosa nuclear. El grado de invaginación es variable y generalmente, cuando la fosa es profunda, aloja a los centriolos. Tanto el centriolo distal como el proximal están presentes en el espermatozoide maduro y se disponen oblicuamente entre sí. La pieza media es pequeña y está formada por una única hilera de mitocondrias de número, forma y tamaño variables. La cola está formada por un único flagelo cuyo axonema presenta la clásica disposición de 9 pares de microtúbulos periféricos y un par central. La membrana plasmática que rodea a todo el espermatozoide forma, en la región de la pieza media, un pliegue que separa al axonema de las mitocondrias originando el canal citoplasmático. En la región de la cola, la membrana plasmática se pliega formando expansiones laterales a forma de aletas radiales respecto del axonema. El número de aletas laterales es variable de una especie a otra e incluso en un mismo individuo.

Además de compartir estas características, se encontraron diferencias en la morfología subcelular de los espermatozoides de las ocho especies estudiadas (Tabla 1).

#### *Características diferenciales a nivel de la cabeza*

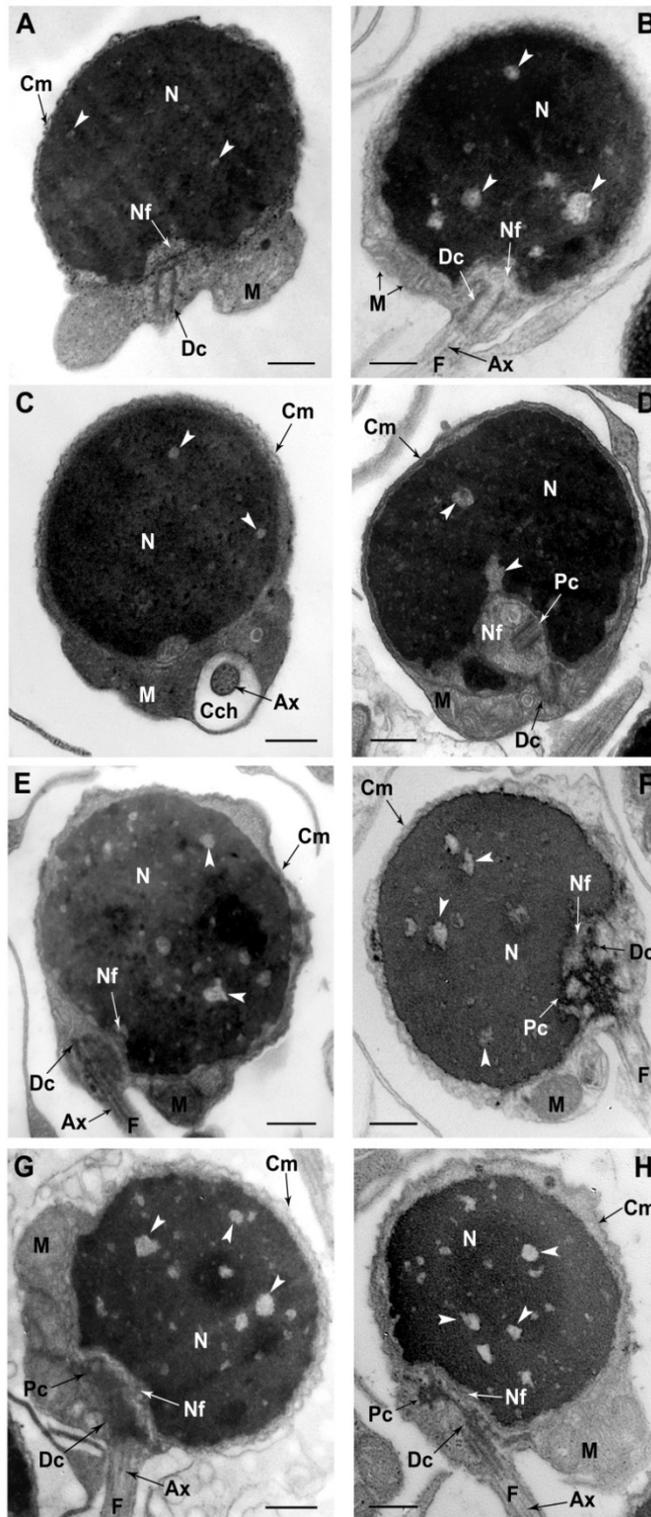
En *Austrolebias affinis* y *A. nigripinnis*, el núcleo presenta cromatina de aspecto homogéneo, fuertemente compactada y de elevada electrondensidad (figura 11 C y D), respecto de las otras especies analizadas. Sin embargo, en *A. affinis*, los espacios electronlúcidos aparecen como espacios grises que no contrastan demasiado con la apariencia de la cromatina compacta (figura 11 C). A diferencia de ello, el núcleo del espermatozoide de *Austrolebias nigripinnis* y *A. luteoflammulatus* posee áreas electronlúcidas más claras y generalmente de mayor tamaño (figura 11 C y A). En el núcleo del espermatozoide de *A. vazferreirai* las áreas electronlúcidas son generalmente de menor tamaño y más numerosas que lo descrito para las especies

antes mencionadas (figura 11 B). En *Austrolebias bellottii* el núcleo del espermatozoide, presenta áreas electrónlúcidas que son generalmente de tamaño similar a las de *A. vazferreirai* (figura 11 F y B). Tres de las ocho especies (*A. melanoorus*, *A. charrua* y *A. reicherti*) ocasionalmente presentan en sus espermatozoides cromatina con apariencia granular y diferente grado de electrondensidad, exhibiendo espacios electrónlúcidos generalmente numerosos y pequeños (figura 11 E, G y H).

En todas las especies analizadas se detectó la presencia de una fosa nuclear en la región posterior de la cabeza del esperma. Sin embargo su aspecto difiere entre especies. En *Austrolebias bellottii* y *A. nigripinnis*, la fosa es significativamente profunda y ocupa aproximadamente el 25% del diámetro nuclear y en ambos aloja completamente al centríolo proximal (figura 11 F y D). *Austrolebias luteoflammulatus* y *A. vazferreirai*, aunque menos profunda, también presentan fosa nuclear fácilmente distinguible, y la misma aloja al centríolo proximal de forma parcial y total, respectivamente (figura 11 A y B). En las otras especies estudiadas la fosa nuclear es muy poco profunda y los centríolos se encuentran fuera de ella, ocupando el sector de citoplasma ubicado frente a la fosa (figura 11 C, E, G y H). Los centríolos de *A. bellottii*, *A. reicherti* y *A. charrua* exhiben fibras osmiofílicas perisféricas asociadas. En *A. bellottii* estas fibras se disponen formando un arreglo radial (figura 11 F, H y G).

#### *Características diferenciales a nivel de la pieza media*

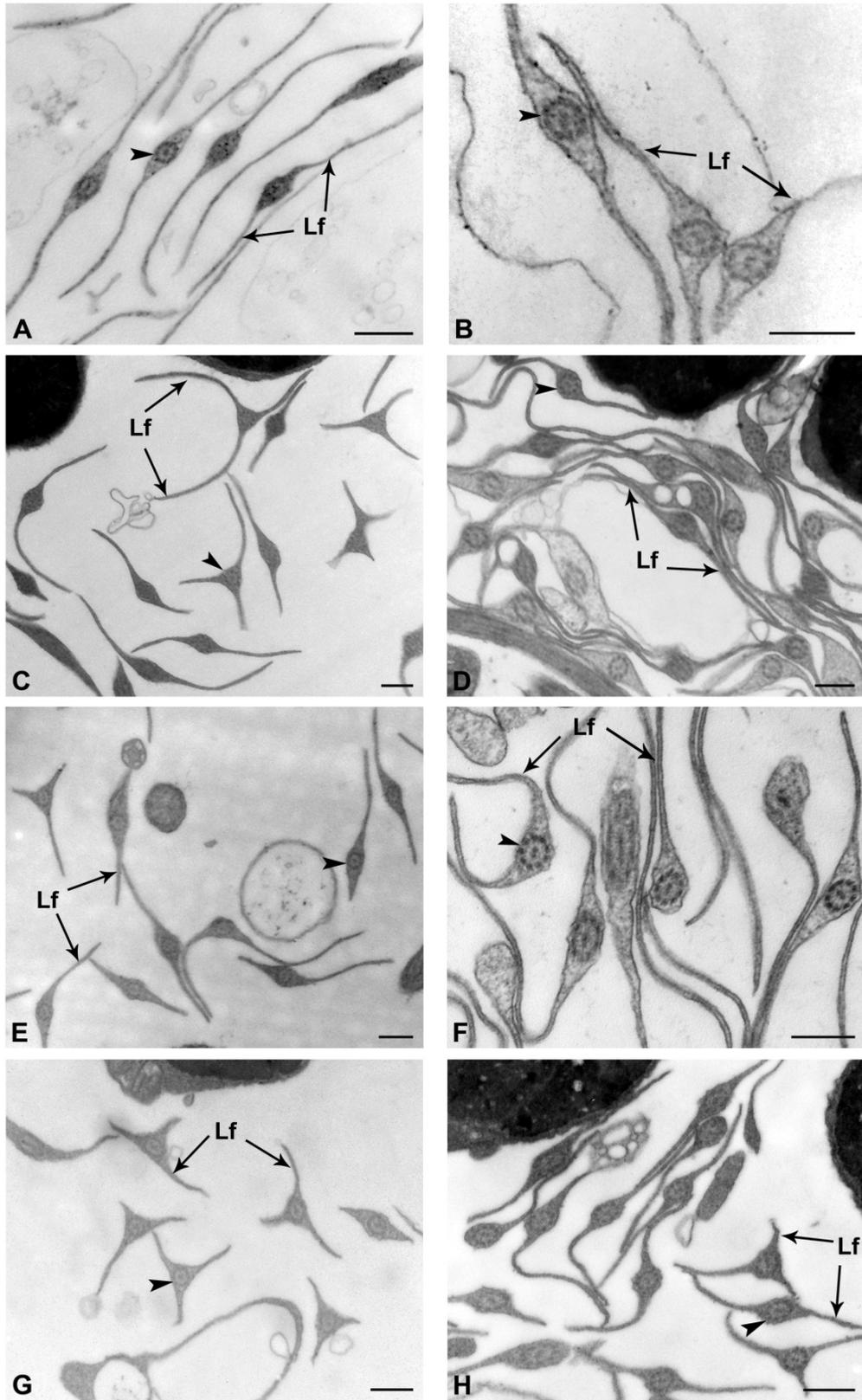
Las mitocondrias *A. bellottii*, *A. nigripinnis*, *A. reicherti* y *A. vazferreirai* presentan crestas claramente visibles (figura 11 F, D, H y B), mientras que en el resto de las especies se observan mitocondrias con escasas crestas, no muy evidentes. Por otro lado, todas las especies presentan mitocondrias de tamaño medio o grande (aproximadamente 500 nm o más) excepto *A. vazferreirai* que exhibe mitocondrias de menor tamaño (aproximadamente 300 nm) (figura 11 B).



**Figura 11.** Micrografías electrónicas de cabeza y pieza media de espermatozoides de *Austrolebias*. **A.** *A. luteoflammulatus*; **B.** *A. vazferreirai*; **C.** *A. affinis*; **D.** *A. nigripiniis*; **E.** *A. melanoorus*; **F.** *A. bellottii*; **G.** *A. charrua*; **H.** *A. reicherti*. Se observan: núcleo (N); espacios electronlúcidos (puntas de flecha); membrana citoplasmática (Cm); fosa nuclear (Nf); centriolo proximal (Pc); centriolo distal (Dc); axonema (Ax); mitocondrias (M); flagelo (F); canal citoplasmático (Cch). Barras = 500 nm. (Tomado de Rodao y col., 2015)

### *Características diferenciales a nivel del flagelo*

Como ya ha sido mencionado, el número de aletas laterales, formadas por expansión de la membrana plasmática del espermatozoide, varía tanto entre especies como dentro de un mismo individuo. Si bien la ocurrencia de dos aletas flagelares prevalece entre las especies estudiadas, se observó que las células espermáticas de *A. affinis*, *A. charrúa*, *A. luteoflammulatus*, *A. melanoorus* y *A. vazferreirai* pueden presentar simultáneamente, espermatozoides con dos y tres aletas flagelares (figura 12 C, G, A, E y B). En *A. bellottii*, *A. nigripinnis* y *A. reicherti* los espermatozoides pueden desarrollar flagelo con una, dos o tres aletas flagelares (figura 12 F, D y H).



**Figura 12.** Micrografías electrónicas de corte transversal de colas de espermatozoides de *Austrolebias*. **A.** *A. luteoflammulatus*; **B.** *A. vazferreirai*; **C.** *A. affinis*; **D.** *A. nigripiniis*; **E.** *A. melanoorus*; **F.** *A. bellottii*; **G.** *A. charrua*; **H.** *A. reicherti*. Se observan: axonema (puntas de flecha); expansiones laterales (Lf). Barras = 500 nm. (Tomado de Rodao y col., 2015)

**Tabla 1. Diferencias ultraestructurales del espermatozoide de las distintas especies de *Austrolebias***

	Cabeza		Pieza media	Cola
	Núcleo / cromatina	Fosa nuclear / complejo centriolar	Mitocondrias	Flagelo / Aletas flagelares
<i>A. affinis</i>	Espacios intercromatínicos electronlúcidos pocos y pequeños	Fosa nuclear muy poco profunda, centriolos fuera de la fosa	Mitocondrias muy electrondensas, medianas y grandes con crestas poco visibles	Presenta 2 o 3 aletas flagelares
<i>A. bellottii</i>	Espacios intercromatínicos electronlúcidos pequeños	Fosa nuclear muy profunda, aloja al centriolo proximal, presencia de material fibrilar asociado	Mitocondrias de tamaño medio con crestas muy marcadas	Presenta 1, 2 o 3 aletas flagelares
<i>A. charrua</i>	Cromatina granular. Espacios intercromatínicos electronlúcidos generalmente pequeños	Fosa nuclear poco profunda, complejo centriolar fuera de la fosa, presencia de material fibrilar asociado	Mitocondrias medianas y grandes con crestas poco visibles	Presenta 2 o 3 aletas flagelares
<i>A. luteoflammulatus</i>	Espacios intercromatínicos electronlúcidos pocos y grandes	Fosa nuclear moderada, aloja parcialmente al centriolo proximal.	Mitocondrias grandes con crestas poco visibles	Presenta 2 o 3 aletas flagelares
<i>A. melanoorus</i>	Cromatina granular. Espacios intercromatínicos electronlúcidos numerosos y pequeños	Fosa nuclear muy poco profunda, centriolos fuera de la fosa	Mitocondrias medianas con crestas poco visibles	Presenta 2 o 3 aletas flagelares
<i>A. nigripinnis</i>	Espacios intercromatínicos electronlúcidos medianos y grandes	Fosa nuclear poco profunda, que aloja al centriolo proximal	Mitocondrias medianas, electrondensas y con crestas muy marcadas	Presenta 1, 2 o 3 aletas flagelares
<i>A. reicherti</i>	Cromatina granular. Espacios intercromatínicos electronlúcidos numerosos y pequeños	Fosa nuclear poco profunda, complejo centriolar fuera de la fosa, presencia de material fibrilar asociado	Mitocondrias medianas o grandes con crestas visibles	Presenta 1, 2 o 3 aletas flagelares
<i>A. vazferreirai</i>	Espacios intercromatínicos electronlúcidos generalmente pequeños.	Fosa nuclear moderada. Aloja parcialmente al centriolo proximal.	Mitocondrias pequeñas con cresta marcadas	Presenta 2 o 3 aletas flagelares

## DISCUSIÓN

El análisis de la estructura fina del espermatozoide de *Austrolebias affinis*, *A. bellottii*, *A. charrua*, *A. luteoflammulatus*, *A. melanoorus*, *A. nigripinnis*, *A. reicherti* y *A. vazferreirai*, confirma que todos ellos poseen cabeza pequeña sin acrosoma y núcleo esférico, pieza media corta con canal citoplasmático y un largo flagelo. Este tipo de espermatozoide es considerado primitivo desde el punto de vista evolutivo (Mattei, 1988) y es llamado aquaesperma anacrosomal (Jamieson, 1991). Para la familia Rivulidae la descripción ultraestructural completa del espermatozoide se ha realizado en solo dos especies, *Rivulus marmoratus* (Kewon y col., 1998) y *Melanorivulus punctactus* (Cassel y col., 2014). En ambos casos se reporta que los espermatozoides poseen la estructura típica de aquaesperma uniflagelado, lo que concuerda con lo encontrado en este estudio para *Austrolebias*.

Todas las especies aquí analizadas parecen tener espermatozoides cuyas cabezas presentan forma y diámetro similares. Si tenemos en cuenta que el diámetro de la cabeza de *A. charrúa* es de 3.8  $\mu\text{m}$  (Arezo y col., 2007; Berois y col., 2015), vemos que sus dimensiones son relativamente grandes en comparación a lo reportado para otros peces que también presentan espermatozoides del tipo aquaesperma, como ha sido reportado para *Rivulus marmoratus* con 1.8  $\mu\text{m}$  (Kewon y col., 1998); *Pagellus erythrinus* 1.62  $\mu\text{m}$  (Maricchiolo y col., 2004); *Siniperca chuatsi* con 1.43  $\mu\text{m}$ ; *S. kneri* con 1.77  $\mu\text{m}$  y *S. scherzeri* con 1.77  $\mu\text{m}$  (Luo y col., 2011).

Si bien en *Austrolebias* la cromatina nuclear está fuertemente condensada, se observa generalmente interrumpida por áreas electronlúcidas de tamaño variable. Éstos espacios electronlúcidos han sido descritos también en *Rivulus marmoratus* (Kewon y col., 1998) y *Melanorivulus punctactus* (Cassel y col., 2014), así como para otros peces no rivulidos (Quagio-Grassiotto y Carvalho 2000; Quagio-Grassiotto y Oliveira, 2008; Quagio-Grassiotto y col., 2011). Aunque las diferentes especies de *Austrolebias* parecen mostrar distintos patrones en el tamaño y contraste de dichas áreas, la alta variabilidad de las mismas incluso dentro de un mismo individuo, no parece prudente definirlo como un carácter especie-específico. Más aún, *A. charrua*, *A.*

*melanoorus* y *A. reicherti* presentan cromatina con aspecto granular, de aspecto muy similar a lo descrito para los espermatozoides de algunos miembros de la familia Sparidae, perteneciente al orden Perciformes (Maricchiolo y col., 2004; Lahnsteiner y Patzner, 2008; Maricchiolo y col., 2010). Por su parte, las demás especies de *Austrolebias* analizadas aquí, presentan cromatina de textura compacta, característica más frecuente entre los espermatozoides de peces teleósteos.

En los teleósteos, la posición del complejo centriolar se relaciona con la forma de la fosa nuclear (Quagio-Grassiotto y Oliveira, 2008), y ambas características dependen del tipo de espermiogénesis a través del cual se genera el espermatozoide maduro (Mattei, 1970). Si la fosa nuclear es muy profunda, alojará a ambos centriolos; una fosa de profundidad moderada alojará parcialmente al complejo centriolar y cuando la fosa es poco profunda los centriolos se dispondrán parcial ó totalmente fuera de ella (Quagio-Grassiotto y Oliveira, 2008).

Las ocho especies de *Austrolebias* analizadas presentaron fosa nuclear, aunque con algunas diferencias entre sí. *A. bellottii* y *A. nigripinnis* presentan fosa nuclear profunda que aloja completamente al centríolo proximal, coincidentemente con lo descrito para *Rivulus marmoratus* (Kewon y col., 1998). Por otro lado, *A. luteoflammulatus* y *A. vazferreirai* presentan fosa nuclear moderada que aloja parcialmente al centríolo proximal, lo cual coincide con lo descrito previamente para *Melanorivulus punctatus* (Cassel y col., 2014).

Sin embargo cuatro de las especies analizadas en este estudio (*A. affinis*; *A. melanorus*; *A. reicherti* y *A. charrua*), presentan fosa nuclear muy poco profunda. El complejo centriolar, si bien se dispone enfrentado a la fosa, se ubica por fuera de ella. Esta es la primera descripción de centriolos alojados fuera de la fosa para miembros de la familia Rivulidae (Rodao y col., 2015), ya que hasta el momento no se conocen otras descripciones que den cuenta de esta característica para este grupo.

Únicamente *A. bellottii*, *A. charrua* y *A. reicherti* mostraron material fibrilar osmiofílico asociado a los centriolos, lo cual podría corresponder a lo descrito por Kweon y col. (1998). Dichos autores describen la existencia de un anillo osmiofílico alrededor del extremo anterior del centríolo distal en el espermatozoide de *Rivulus marmoratus*

De acuerdo a lo reportado por Mattei (1970), Jamieson (1991) y Mattei (1991), la pieza media del espermatozoide de teleósteos puede ser corta, simétrica y con un canal citoplasmático reducido, o larga y sin canal citoplasmático. Este último tipo de pieza media, suele ser el más común entre Cyprinodontiformes (Cassel y col., 2014).

En *Austrolebias* la pieza media es corta y con canal citoplasmático reducido. Esto podría responder a que está constituida por una única hilera de mitocondrias, además de no presentar vesículas u otras estructuras que han sido descritas en la pieza media de otros teleósteos (Baccetti y col., 1984; Gwo y col., 2004; Quagio-Grassiotto y Oliveira, 2008; Cassel y col., 2014).

Las mitocondrias de la pieza media de *Austrolebias*, presentan un tamaño similar en todas las especies analizadas, con excepción de *A. vazferreirai* que presenta mitocondrias más pequeñas. En todos los casos su distribución es similar, se agrupan rodeando la base del flagelo y se separan del axonema mediante un muy corto canal citoplasmático. Todas las especies presentan entre 5 y 8 mitocondrias por gameto. El análisis mediante microscopía electrónica de barrido podría ayudar a determinar con mayor exactitud, el número de mitocondrias presentes en la pieza media del espermatozoide de cada especie lo cual tiene además valor taxonómico. La disposición y número aproximado de mitocondrias encontrado en *Austrolebias*, es similar al reportado para otros rivulidos (Kweon y col., 1998; Cassel y col., 2014). Las diferencias más notorias observadas en este estudio corresponden al aspecto de la matriz y crestas mitocondriales.

Las mitocondrias de *A. bellottii*, *A. nigripinnis*, *A. vazferreirai* (y en menor medida *A. reicherti*), presentan crestas bien marcadas y matriz electrodensa, similares a las descritas para *Rivulus marmoratus* (Kweon y col., 1998). Las mitocondrias de *A. charrua*, *A. luteoflammulatus* y *A. melanoorus* aparecen poco electrodensas y con unas pocas crestas. Estas características han sido reportadas por primera vez para miembros de la familia Rivulidae (Rodao y col., 2015), y son similares a las descritas por Quagio-Grassiotto y Oliveira, (2008), para *Pimelodus maculatus*, Siluriforme que también presenta un espermatozoide primitivo similar al de *Austrolebias*. Por otro lado, *A. affinis* presenta mitocondrias con matriz electrodensa pero con crestas poco

marcadas. En todas las especies analizadas, la distribución de las mitocondrias no parece ser simétrica, sino estar determinada por el ángulo de inserción del flagelo, que no es completamente perpendicular sino ligeramente tangencial a la base del núcleo. Las mitocondrias se observan en menor número en la región de la pieza media en que el flagelo y la cabeza forman un ángulo agudo, dato también novedoso dentro de los Rivulidos (Rodao y col., 2015).

Como en la mayoría teleósteos, incluidos otros rivulidos, el flagelo de todas las especies de *Austrolebias* presenta el patrón axonémico clásico 9+2. Además, el flagelo es único y la membrana plasmática que lo recubre puede expandirse lateralmente formando aletas (Rodao y col., 2015). La presencia de aletas flagelares es similar a la descrita previamente por otros autores, para otras especies de peces, tanto marinos como de agua dulce (Billard, 1978, 1983; Dreanno y col., 1999). En *A. bellottii*, *A. nigripinnis* y *A. reicherti* los espermatozoides pueden presentar una, dos o tres aletas flagelares; mientras que en *A. affinis*, *A. charrua*, *A. luteoflammulatus*, *A. melanoorus* y *A. vazferreirai* los espermatozoides presentan flagelos con dos o tres aletas. Estas variaciones se presentan incluso dentro de un mismo individuo con una ocurrencia mayor de flagelos con dos aletas en todos los casos. Esto ha sido previamente reportado por Thiaw y col. (1986), quienes describen este tipo de estructuras para 15 especies del orden Cyprinodontiformes, incluida *Cynolebias whitey* (familia Rivulidae), con resultados similares a los observados para *Austrolebias* (Arezo y col., 2007; García y col., 2009; Rodao y col., 2015).

Cabe destacar que las observaciones realizadas aquí para *A. charrua* y *A. reicherti* presentan diferencias a nivel del flagelo con las descripciones previas realizadas para estas especies (Arezo y col., 2007; García y col., 2009). Por un lado, Arezo y col. (2007) describen el flagelo espermático de *A. charrua* con dos, tres o cuatro aletas; mientras que, el análisis realizado en el presente estudio reporta espermatozoides con dos o tres aletas. A su vez, García y col. (2009) describen el espermatozoide de *A. reicherti* con dos o tres aletas flagelares; mientras que aquí se observa también la presencia de flagelos con una única aleta. Tal vez, esta diferencia se deba a la muy baja ocurrencia de ambos tipos flagelares (con una ó cuatro aletas), lo que dificulta su localización en

las secciones ultrafinas de espermatozoides maduros utilizadas para su observación mediante MET.

## CONCLUSIONES

En resumen, el espermatozoide maduro de todas las especies de *Austrolebias* estudiadas, presenta una estructura fina muy similar, y una serie de características propias para cada especie. Se trata de un espermatozoide primitivo simple, con tres regiones claramente identificables: cabeza esférica relativamente pequeña, sin acrosoma y ocupada casi en su totalidad por el núcleo celular. En éste, la cromatina se observa condensada, interrumpida por zonas electronlúcidas. En la región caudal del núcleo se presenta la fosa nuclear, cuya profundidad varía entre las especies estudiadas. Ambos centriolos están presentes en el espermatozoide maduro, pudiendo alojarse en la fosa según sea su profundidad. La pieza media es corta y está integrada por unas pocas mitocondrias dispuestas en torno al flagelo ocupando un mismo plano. Entre las mitocondrias y el flagelo la membrana plasmática se invagina dando lugar al canal citoplasmático. El flagelo es único, con axonema clásico 9+2 y presenta expansiones de membrana plasmática a modo aletas, cuyo número varía entre especies y dentro de un mismo individuo. Dicha organización es coincidente con la descrita para espermatozoides de otras especies de peces de fecundación externa, siendo esta la primera vez que, para peces anuales, se describe en detalle y comparativamente, la organización subcelular del espermatozoide completo.

## **PERSPECTIVAS**

El análisis estadístico de los datos obtenidos en el presente trabajo, permitirá identificar cual ó cuales de este conjunto de características, que parecen ser especie-específicas, tiene valor significativo y podrá (o no) ser utilizada en futuros análisis filogenéticos.

Por otra parte, el desarrollo de estudios complementarios que permitan correlacionar la estructura fina con la funcionalidad de las características observadas, permitirá una mejor comprensión de los procesos fisiológicos que subyacen a la activación espermática de estas especies, así como también de las interacciones gaméticas, de suma importancia para aquellos grupos entre los que existe hibridación.

## BIBLIOGRAFÍA

**Arezo, M.J., L. Pereiro, & N. Berois. 2005.** Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. *Journal of Fish Biology* 66:1357–1370.

**Arezo, M.J., S. D'Alessandro, N.G. Papa, R.O. de Sá, & N. Berois. 2007.** Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Tissue and Cell* 39:89–98.

**Baccetti, B., Burrini, A. G., Gibertini, G., Mazzini, M., & Zerunian, S. 1984.** Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. *Gamete Research*, 10(4), 373-396.

**Baccetti, B. 1991.** *Comparative Spermatology 20 years After*. Raven Press, New York.

**Berois, N., Arezo, M. J., & Papa, N. G. 2011.** Gamete interactions in teleost fish: the egg envelope. Basic studies and perspectives as environmental biomonitor. *Biological research*, 44(2), 119-124.

**Berois, N., Arezo, M. J., Papa, N. G., & Chalar, C. 2015.** Life Cycle, reproduction, and Development in annual Fishes. *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*, 33.

**Billard, R. 1978.** Changes in structure and fertilizing ability of marine and fresh water fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture* 14:187–198.

**Billard, R. 1983.** Ultrastructure of trout spermatozoa: Changes after dilution and deep-freezing. *Cell and Tissue Research* 228:205–218.

**Cassel, M., Ferreira, A., & Mehanna, M. 2014.** Ultrastructural features of spermatogenesis in *Melanorivulus punctatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Micron*, 62: 1-6.

**Costa, W.J.E.M. 2006.** The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): Phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa* 1213:1–162. ISSN 1175–5334.

**Dreanno, C., J. Cosson, M. Suquet, F. Seguin, G. Dorange, & R. Billard. 1999.** Nucleotide content, oxidative phosphorylation, morphology, and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period. *Molecular Reproduction and Development* 53:230–243.

**García, G., M. Loureiro, N. Berois, M.J. Arezo, G. Casanova, G. Clivio, & Olivera. 2009.** Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: A multidisciplinary approach. *Biological Journal of the Linnean Society* 98:620–635.

**Grier, H.J. 1981.** Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *American Zoologist* 21:345–357.

**Grier, H.J.; J. M. Fitzsimons & J. R. Linton. 1978.** Structure and ultrastructure of the testis and sperm formation in goodeid teleosts. *J. Morph.* 156:419-438.

**Grier, H.J., L.R. Linton, J.F. Leatherland, & V.L. De Vlaming. 1980.** Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *American Journal of Anatomy* 159:331–345.

**Gwo, J. C., Kuo, M. C., Chiu, J. Y., & Cheng, H. Y. 2004.** Ultrastructure of *Pagrus major* and *Rhabdosargus sarba* spermatozoa (Perciformes: Sparidae: Sparinae). *Tissue and Cell*, 36(2), 141-147.

**Jamieson, B.G.M. 1991.** *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. With a Survey of Lophophorate, Echinoderm and Protochordate Sperm and an Account of Gamete Cryopreservation.* (Chapters 5 and 17). Cambridge University Press, Cambridge.

**Kweon, H. S., Park, E. H., & Peters, N. 1998.** Spermatozoon ultrastructure in the internally self-fertilizing hermaphroditic teleost, *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Copeia*, 4:1101-1106.

**Lahnsteiner, F., & R.A. Patzner. 2008.** Sperm morphology and ultrastructure in fish. In *Fish Spermatology*, eds. S.M.H. Alavi et al. 1–61. Oxford, UK: Alpha Science Ltd.

- Loureiro, M., A. Duarte, & M. Zarucki. 2011.** A new species of *Austrolebias*, Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. *Neotropical Ichthyology* 9:335–342.
- Luo, D., Sun, J. J., Lu, X., Liu, L. Z., Chen, S. J., & Li, G. F. 2011.** Comparative sperm ultrastructure of three species in *Siniperca* (Teleostei: Perciformes: Siniperacidae). *Micron*, 42(8), 884-891.
- Maricchiolo, G., Genovese, L., Laurà, R., Micale, V., & Muglia, U. 2004.** Fine structure of spermatozoa in the common pandora (*Pagellus erythrinus* Linnaeus, 1758) (Perciformes, Sparidae). *Histol. Histopathol.* 19, 1237–1240.
- Maricchiolo, G., Laurà, R., Genovese, L., Guerrera, M. C., Micale, V., & Muglia, U. 2010.** Fine structure of spermatozoa in the blackspot sea bream *Pagellus bogaraveo* (Brünnich, 1768) with some considerations about the centriolar complex. *Tissue and Cell*, 42(2), 88-96.
- Mattei, X. 1970.** Spermio-genése comparé des poisson. In: Baccetti, B. (Ed.), *Comparative Spermatology*. Academic Press, New York, pp. 57–72.
- Mattei, X. 1988.** The flagellar apparatus of spermatozoa in fish. Ultrastructure and evolution. *Biol. Cell* 63: 151-158.
- Mattei, X. 1991.** Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology* 69:3038–3055.
- Parenti, L.R., & H.J. Grier. 2004.** Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integrative and Comparative Biology* 44:333–348.
- Quagio-Grassiotto, I., & Carvalho, E. D. 2000.** Ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermiogenesis. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*, 32(4), 629-633.
- Quagio-Grassiotto, I., & Oliveira, C. 2008.** Sperm ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm

ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysii). *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 247(1), 55-66.

**Quagio-Grassiotto, I., Ortiz, R. J., Pérez, M. S., & Oliveira, C. 2011.** Sperm of Doradidae (Teleostei: Siluriformes). *Tissue and Cell*, 43(1), 8-23.

**Rodao, M., Montagne, J., Clivio, G. A., Papa, N. G., & Larrosa, G. C. 2015.** Sperm and Egg Envelope Ultrastructure and Some Considerations on Its Evolutionary Meaning. *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*, 47.

**Schulz, R.W., L.R. de França, J.J. Lareyre, & col. 2010.** Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165:390–411.

**Thiaw, O. T., Mattei, X., Romand, R. & Marchand, B. 1986.** Reinvestigation of spermatid flagella structure: the teleostean Cyprinodontidae. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* 97, 109-118.

**Vaz-Ferreira, R., B. Sierra, & S. Scaglia. 1964.** Eco-etología de la reproducción en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. *Apartados de los Archivos de la Sociedad de Biología de Montevideo* 26:44–49.

**Volcan, M.V., L.A. Sampaio, D.C. Bongalhardo, & R.B. Robaldo. 2013.** Reproduction of the annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* (Rivulidae) maintained at different temperatures. *Journal of Applied Ichthyology* 29:648–652.

**Wourms, J.P. 1964.** Comparative observations on the early embryology of *Nothobranchius taeniopygus* and *Aplocheilichthys pumilis* with special reference to the problem of naturally occurring embryonic diapause in teleost fishes. *Annual Report East African Freshwater Fisheries Institute*, pp. 68–73.

**Wourms, J.P. 1967.** *Annual fishes. In Methods in Developmental Biology*, eds. F.H. Wilt and N. Wessels. New York: Thomas and Crowell Company, 123–137.

**Wourms, J. P. 1972.** The developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology*, 182(3), 389-414.