

# Curso Biología del Desarrollo 2022

## Desarrollo embrionario en peces anuales: características particulares

Docentes: *María José Arezo*<sup>1</sup>, *Nicolás Papa*<sup>1</sup>, *Hellen Schlueb*<sup>1</sup>  
y *Joaquín Garat*<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos Sección Biología Celular FCien – UdelaR

<sup>2</sup> Departamento de Genómica. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable - MEC

# Peces anuales (Cyprinodontiformes, Aplocheloidei)

- Estrategias únicas de desarrollo embrionario
- Plasticidad frente a ambientes variables
- Interés: investigación y acuarismo



*Austrolebias charrua*



*Cynopoecilus melanotaenia*



*Nothobranchius rachovii*

Ambiente efímero: charco temporal (Rocha, ruta 9 Km 272)



# Distribución



Copyright © Verlag Dr. Friedrich Pfeil

Ichthyol. Explor. Freshwaters, Vol. 24, No. 1, pp. 15–20, 3 figs., 1 tab., July 2013  
© 2013 by Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, Germany – ISSN 0936-9902



Fig. 1. *Millerichthys robustus*: a, male; b, female. Scale bars 10 mm.

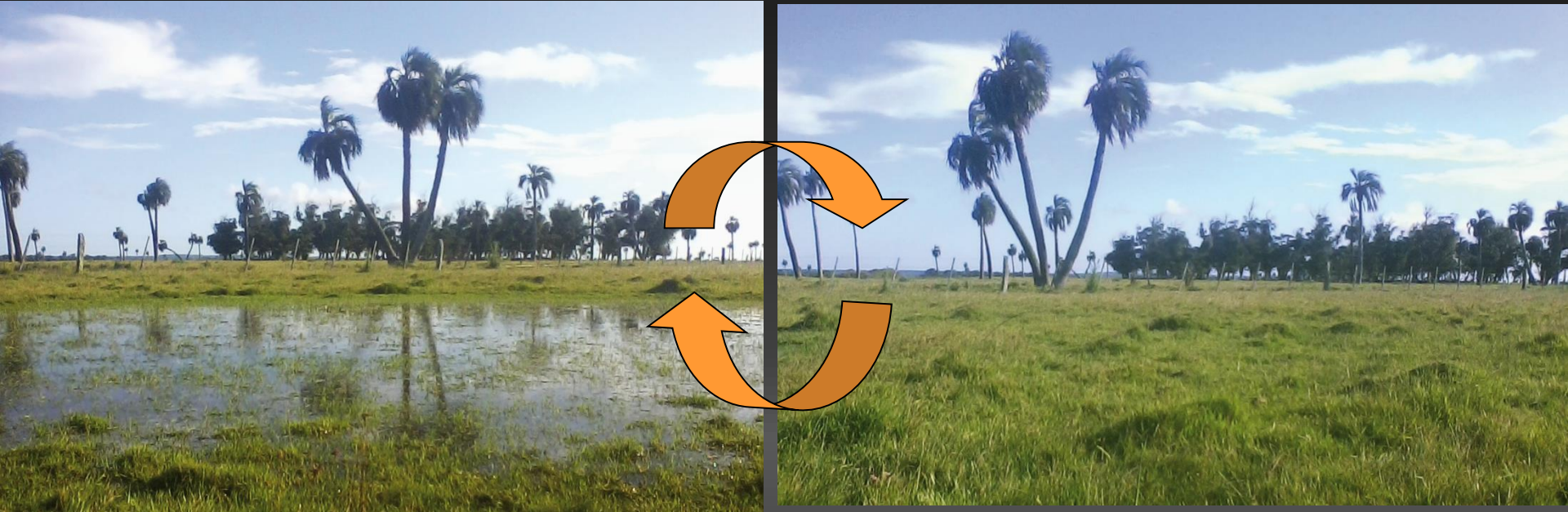
## First observations of annualism in *Millerichthys robustus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)

Omar Domínguez-Castanedo\*, Miguel Ángel Mosqueda-Cabrera\*  
and Stefano Valdesalici\*\*



Africa y América

# Peces anuales: ciclo de vida



Desecación de su hábitat:

ambiente extremo para un pez

*¿clave de la supervivencia?*



# Vida en ambientes extremos



Selección natural - mecanismos de adaptación

# Vida en ambientes extremos: mecanismos de adaptación

**Espacio**

**Tiempo**

**Migración**

**Dormancia**

**Adultos**

**Embriones**

**Criptobiosis**



**Estivación**



**Hibernación**



**Dormancia**



**Diapausa**



**Ejemplos de estrategias de escape a condiciones ambientales adversas**



# Desecación de su hábitat ¿clave de la supervivencia?



## Embriones:

- resistentes al estrés ambiental  
tolerancia a la anoxia y desecación
- patrón de desarrollo embrionario peculiar con diapausas

# Desarrollo embrionario temprano en peces teleósteos

## Organismo ampliamente utilizado en investigación

### *Danio rerio* (Cyrpiniformes)

- pequeño
- fácil de mantener en el laboratorio
- reproducción todo el año
- tiempo de desarrollo corto (2-3 días)
- embriones transparentes
- desarrollo externo: patrón representativo de los teleósteos no anuales
- disponibilidad de herramientas (pérdida/ganancia de función)  
mutantes, transgénicos y genoma disponible
- estudio de procesos vertebrado-específicos (desarrollo, patología – biomedicina,  
ecotoxicología)



<http://www.dugdug.com/dr-benner-discusses-zebrafish-selenite-response>



# Desarrollo embrionario temprano en peces teleósteos

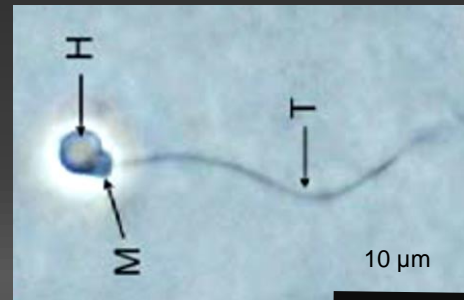


<http://www.dugdug.com/dr-benner-discusses-zebrafish-selenite-response>



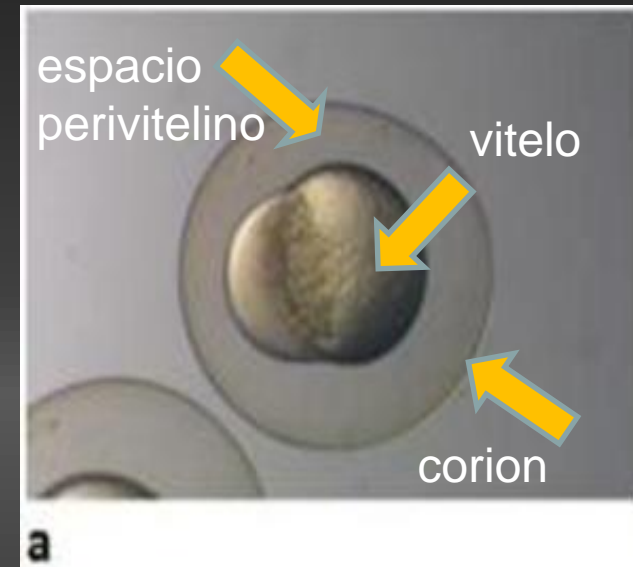
Seki y col. 2008

+



Zhang y col. 2014

=

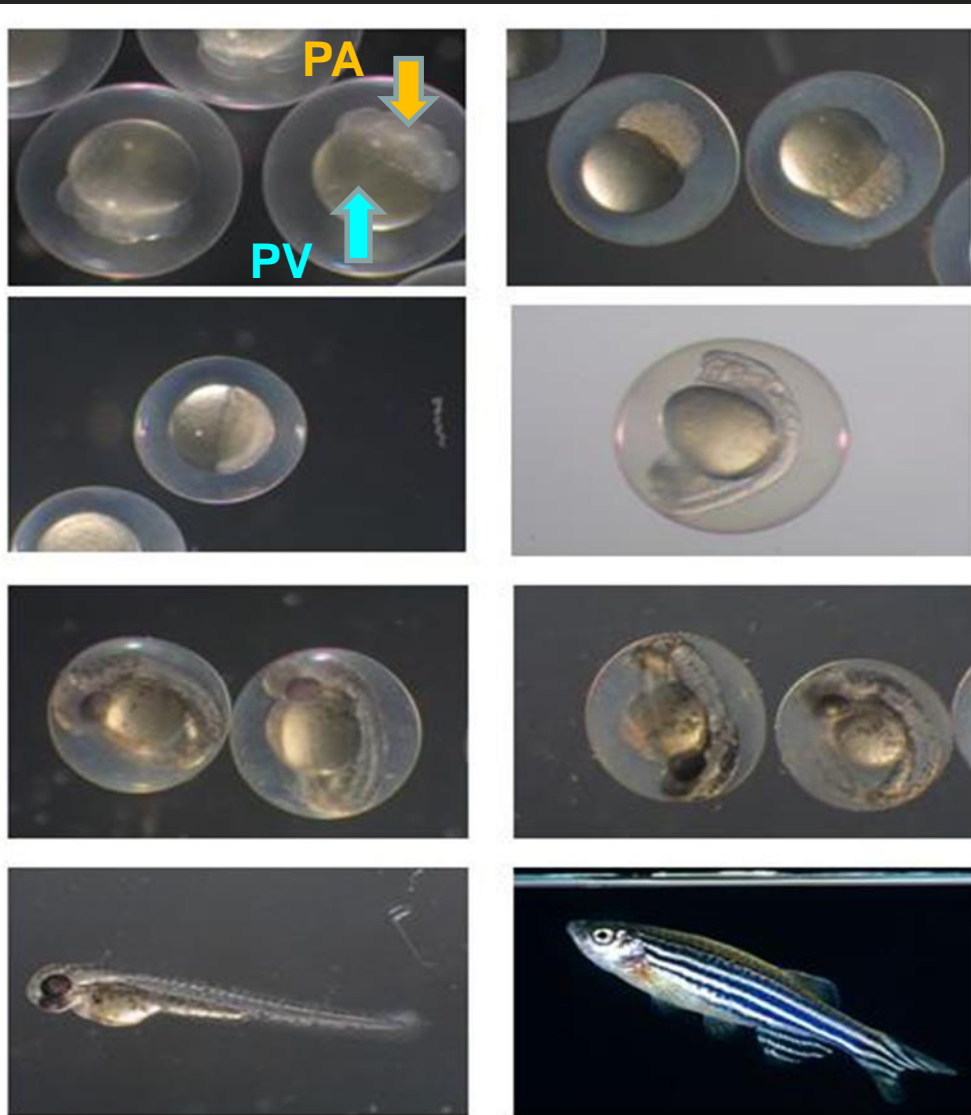


Cigoto 2n  
nuevo potencial genético

## Durante maduración

- proteínas (vitelo = telolecito)
- ribosomas
- ARNt, ARNm
- factores morfogénicos
- filtros UV
- enzimas reparación ADN

# Desarrollo de un nuevo organismo



Proceso altamente conservado en los vertebrados:

- secuencial
- unidireccional
- sin interrupciones (mayoría)

Patrón de clivaje: meroblástico discoidal

PA: polo animal (blastodisco)  
PV: polo vegetal (vitelo)



# Clivaje

## Control materno\*:

primeras divisiones sincrónicas, rápidas, no aumenta el volumen celular

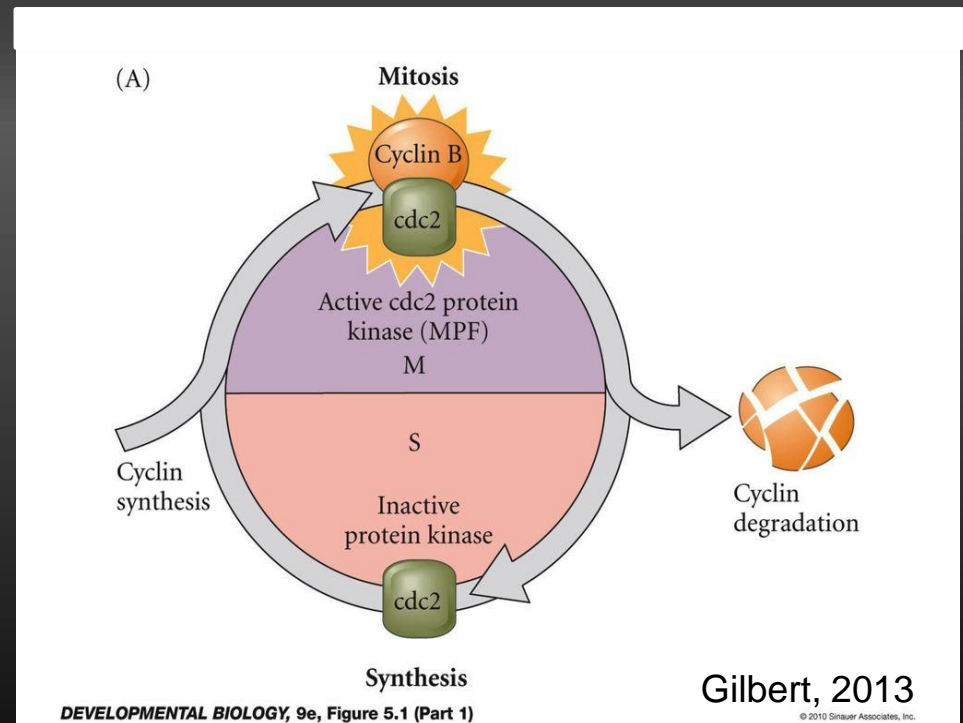
\*excepto mamíferos

## MPF regula ciclo bifásico

- activación transición fecundación / clivaje
- 2 subunidades
- actividad alta en M
- no detectable en S

## Ciclina B

- comportamiento cíclico
- codificada por ARNm materno
- reguladores almacenados



# Transición de la blastula media

- Se inicia la transcripción cigótica
- Asincronía división celular
- Adquisición de motilidad celular



*Fundulus heteroclitus*

Ciclo 10  
Trinkaus, 1992

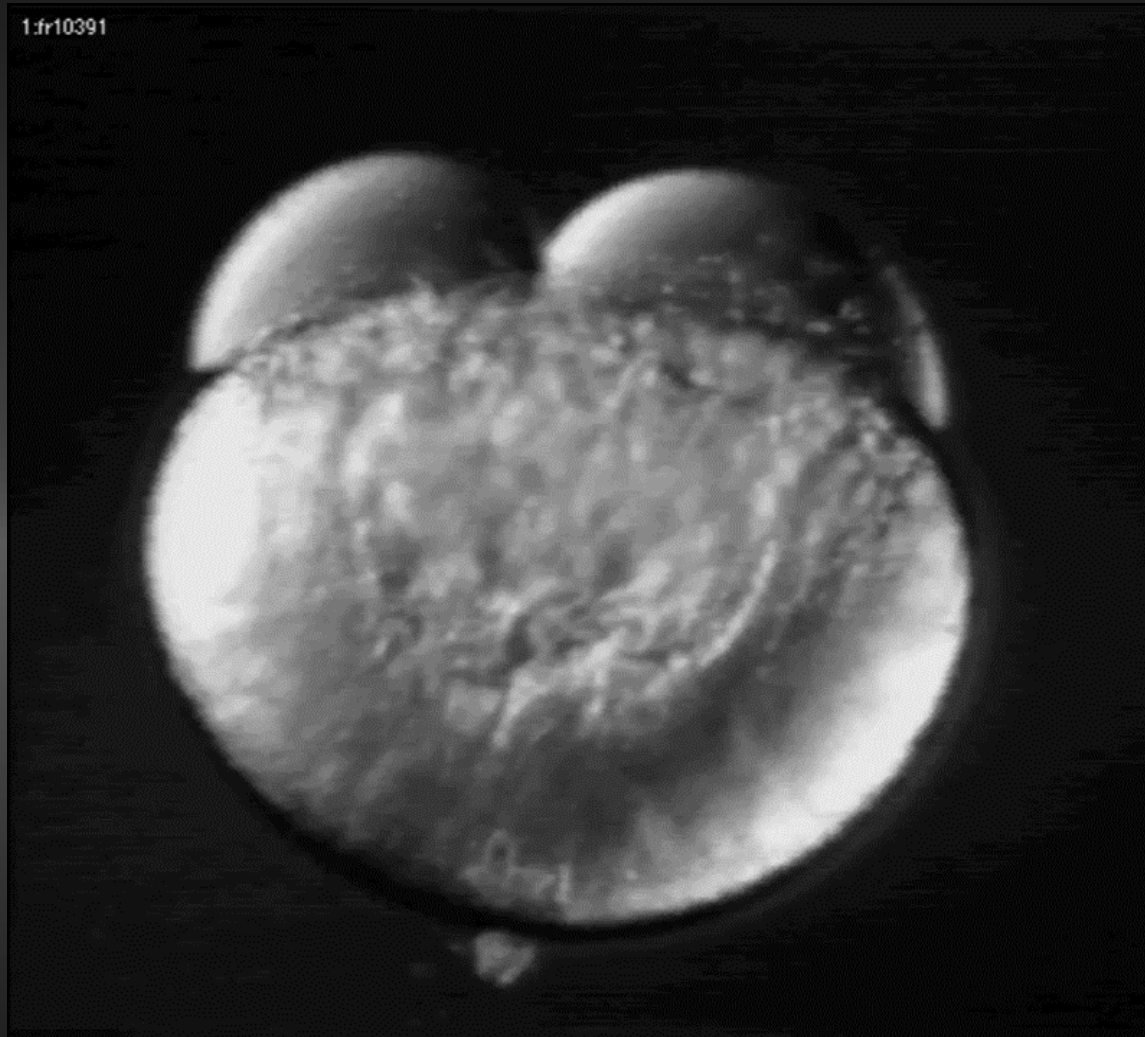
*Danio rerio*



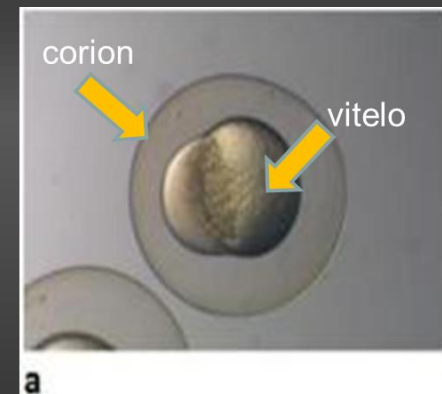
Ciclo 10  
Kane y Kimmel,  
1993



# Desarrollo embrionario en pez cebra



*Danio rerio*



# Desarrollo embrionario en peces con ciclo de vida anual

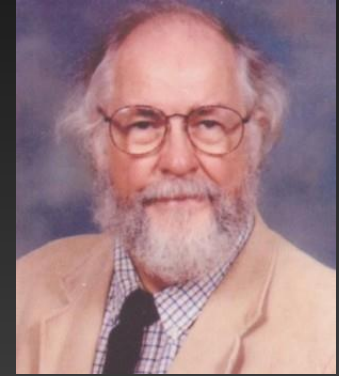
1972

J. EXP. ZOOL., 182: 143-168.

## Developmental Biology of Annual Fishes

I. STAGES IN THE NORMAL DEVELOPMENT OF *AUSTROFUNDULUS MYERSI* DAHL<sup>1</sup>

JOHN P. WOURMS<sup>2</sup>  
*Department of Pathology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada*



(1935 – 2013)

## The Developmental Biology of Annual Fishes

II. NATURALLY OCCURRING DISPERSION AND REAGGREGATION OF BLASTOMERES DURING THE DEVELOPMENT OF ANNUAL FISH EGGS<sup>1</sup>

JOHN P. WOURMS\*  
*Department of Pathology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada*

## The Developmental Biology of Annual Fishes

III. PRE-EMBRYONIC AND EMBRYONIC DIAPAUSE OF VARIABLE DURATION IN THE EGGS OF ANNUAL FISHES<sup>1</sup>

JOHN P. WOURMS\*  
*Department of Pathology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada*

## Particularidades

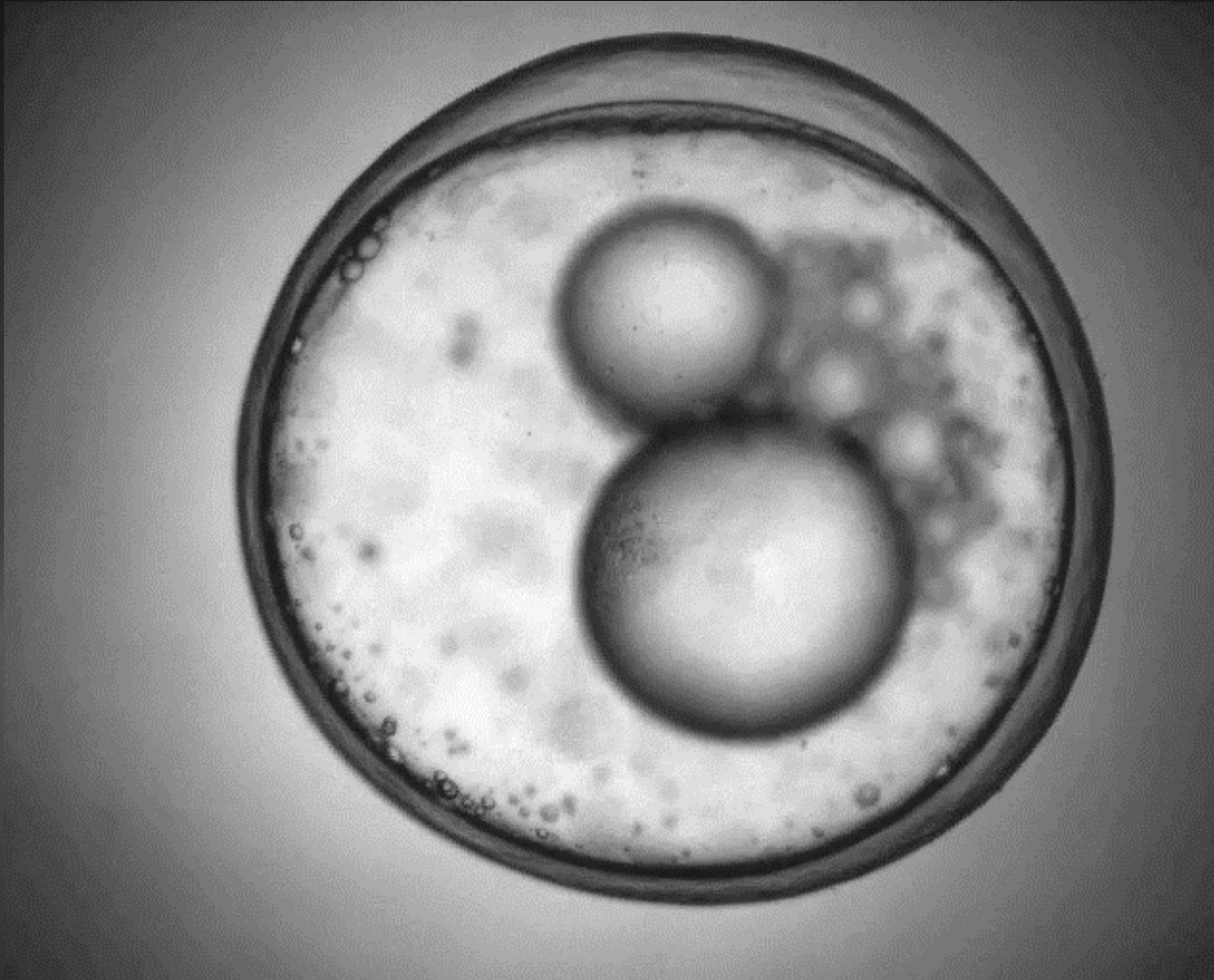
1. Dispersión/Reagregación

2. Diapausas

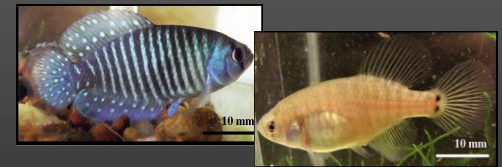
43 especies analizadas

Nicolaus Peters, 1963: define estas particularidades, publicación en alemán – según Wourms: incompleto

# Desarrollo embrionario en peces anuales



Mag. Soledad de la Piedra



*Austrolebias charrua*

Fase D/R: separación espacio-temporal epibolia /ingreso  
endomesodermo: carácter derivado (Dolfi y col. 2014)  
(eventos simultáneos en peces teleósteos no anuales)



# Particularidad 3

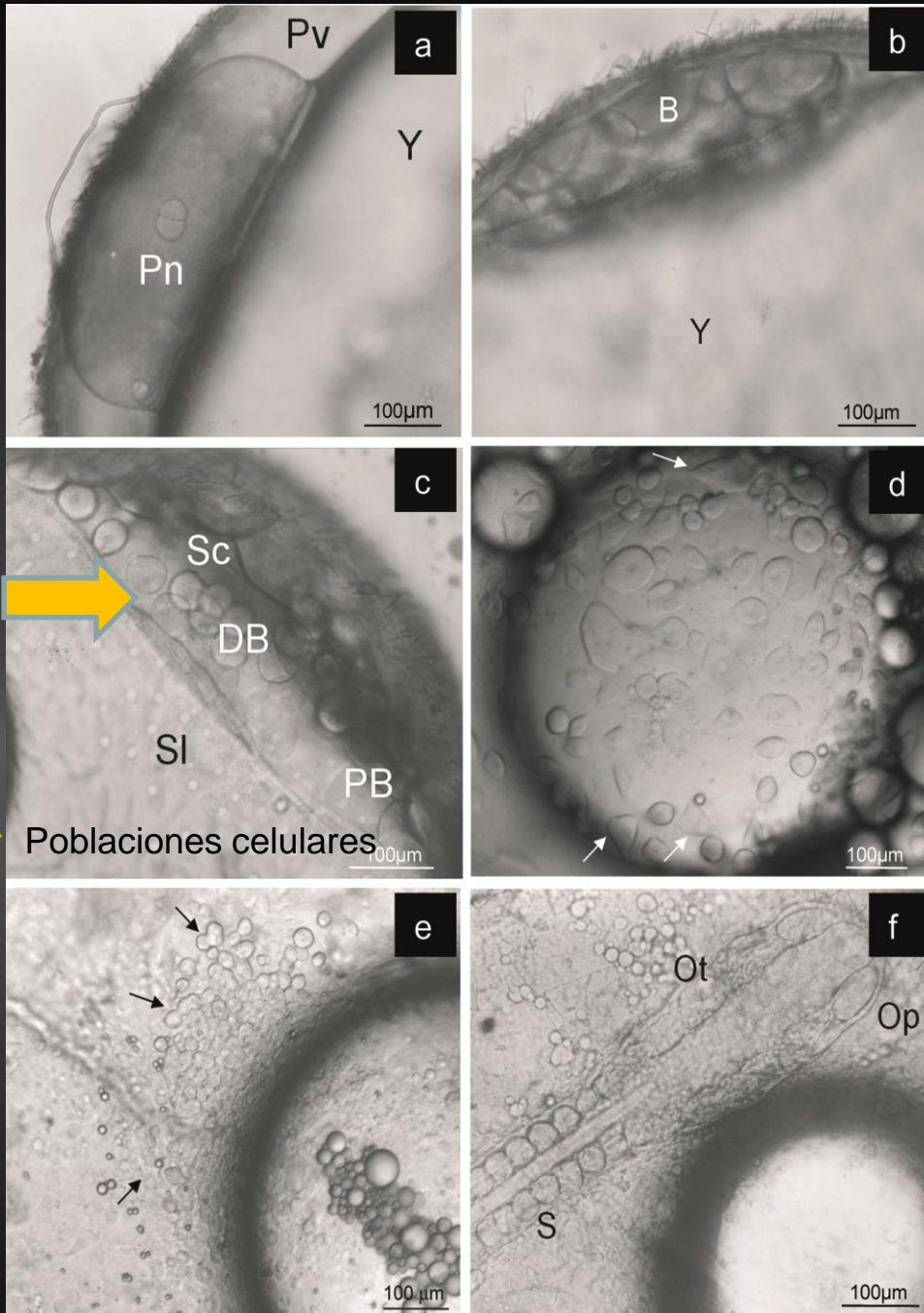
## Inicio de epibolia

200 a 1.000 blastómeras profundas

(Wourms, 1972b)

50 a 350 en *Nothobranchius*

(van Haarlem, 1983)



\* Poblaciones celulares



*Austrolebias varius* = 100 células

(Arezo y col. 2005)

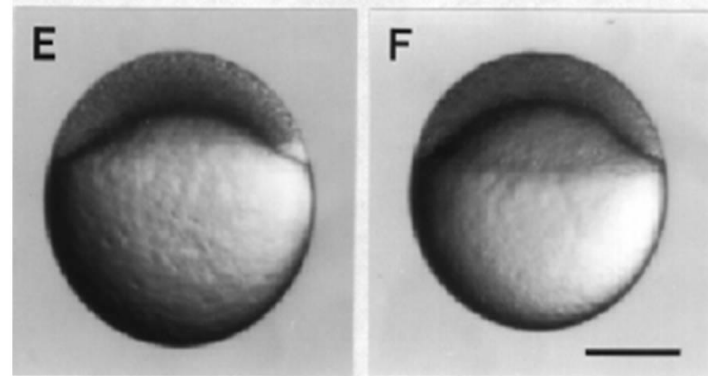


*Danio rerio*

Inicio de epibolia

4.000 células

(Marrable, 1965)



Face views of embryos during the blastula period. **E:** dome stage (4.3 h). **F:** 30%-y stage (4.7 h). Scale bar: 250  $\mu$ m.



*Fundulus heteroclitus*

27.500 células

(Richards y Porter, 1935)

Dispersion/reaggregation in early development of annual killifishes:  
Phylogenetic distribution and evolutionary significance of a unique feature

Benjamin Naumann<sup>a,b,\*</sup>, Christoph Englert<sup>b,c</sup>

2018

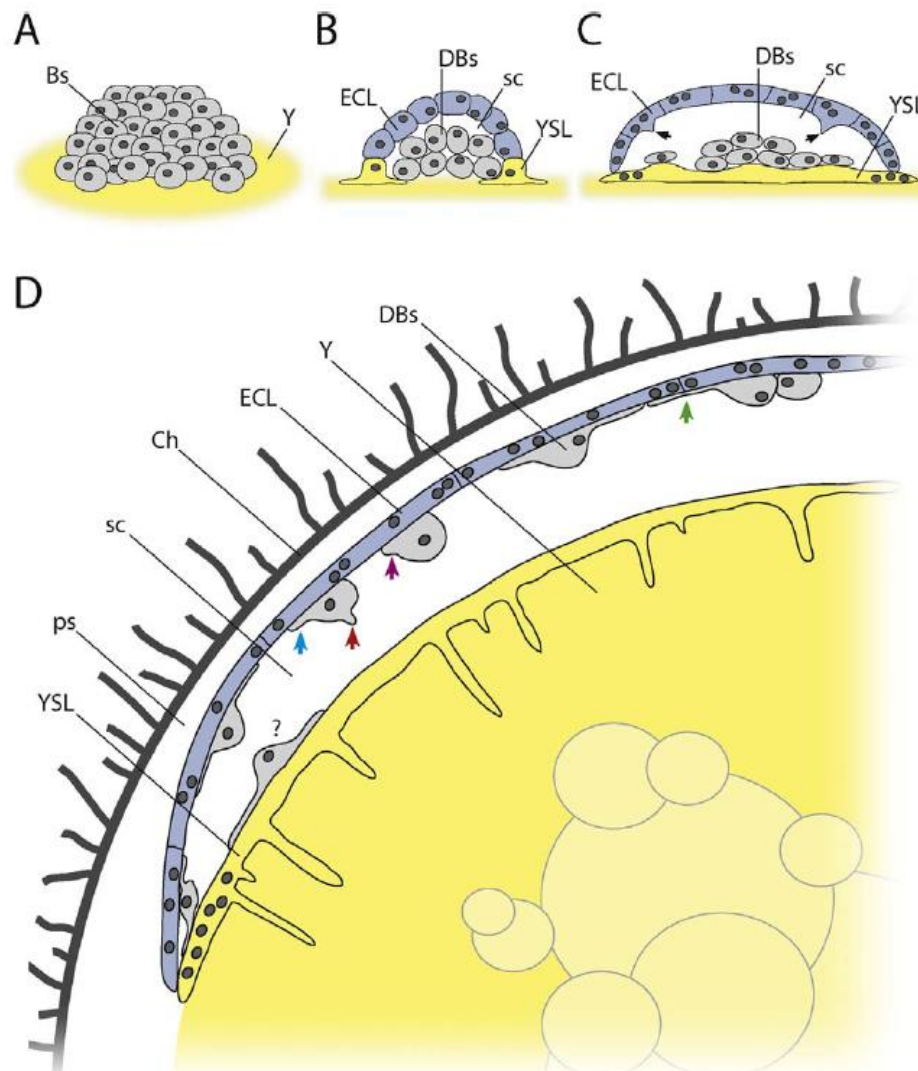
<sup>a</sup> Institute of Zoology and Evolutionary Research, Jena, Germany

<sup>b</sup> Leibniz Institute on Aging – Fritz Lipmann Institute, Jena, Germany

<sup>c</sup> Institute of Biochemistry and Biophysics, Jena, Germany

## Capa celular envolvente:

- Barrera osmótica
- Sustrato principal migración blastómeras profundas







ARTICLE

Received 19 Jul 2016 | Accepted 30 Mar 2017 | Published 5 Jun 2017

DOI: 10.1038/ncomms15431

OPEN

# Extra-embryonic tissue spreading directs early embryo morphogenesis in killifish

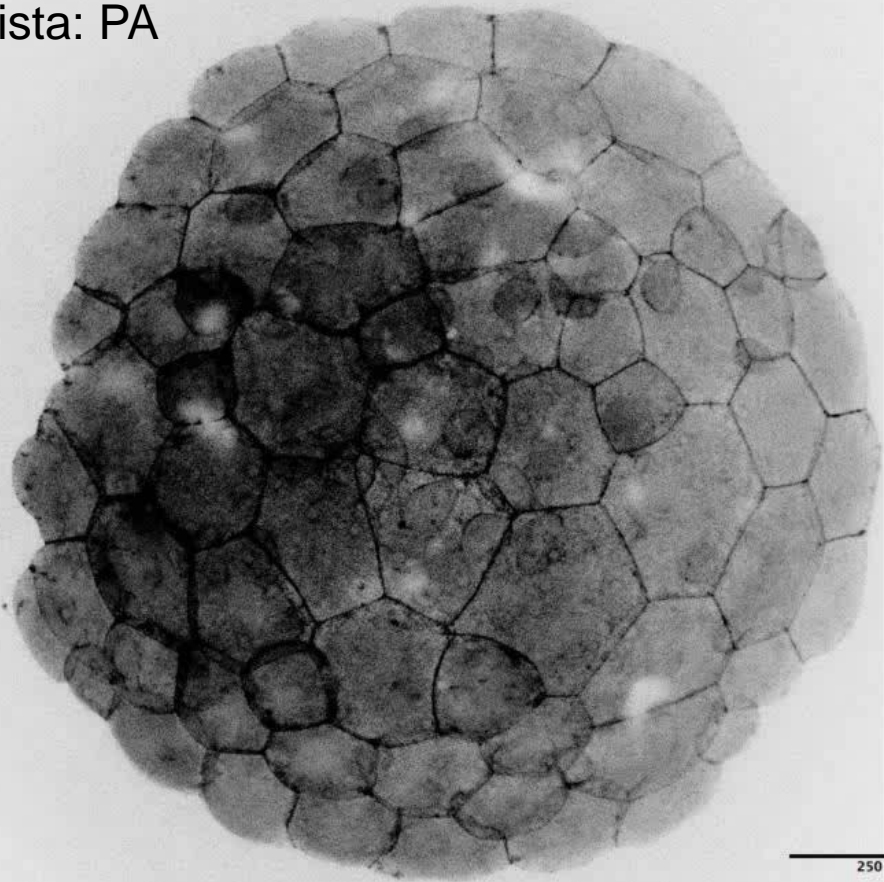
Germán Reig<sup>1,2</sup>, Mauricio Cerda<sup>1,2</sup>, Néstor Sepúlveda<sup>3</sup>, Daniela Flores<sup>1,2</sup>, Víctor Castañeda<sup>1,2</sup>, Masazumi Tada<sup>4</sup>, Steffen Härtel<sup>1,2,5</sup> & Miguel L. Concha<sup>1,2,6</sup>

***Epibolia***: capa celular envolvente dirige migración de blastómeras profundas (adhesión mediada por cadherina E, señales mecánicas en bordes CCE)

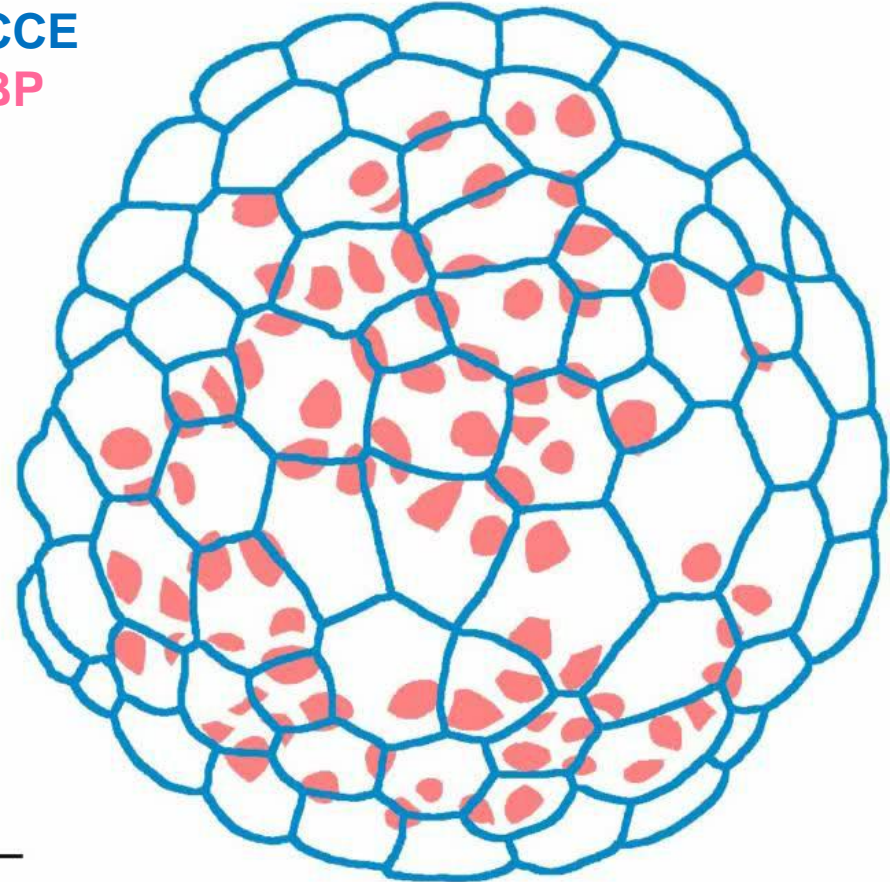
- Fenómeno descrito por Wourms: 1972
- Hipótesis sugerida por Carter y Wourms: 1990, 1991
- Detalles moleculares: 2017 (Reig y col.)

# Blástula tardía - 60% epibolia, Lifeact-GFP

Vista: PA

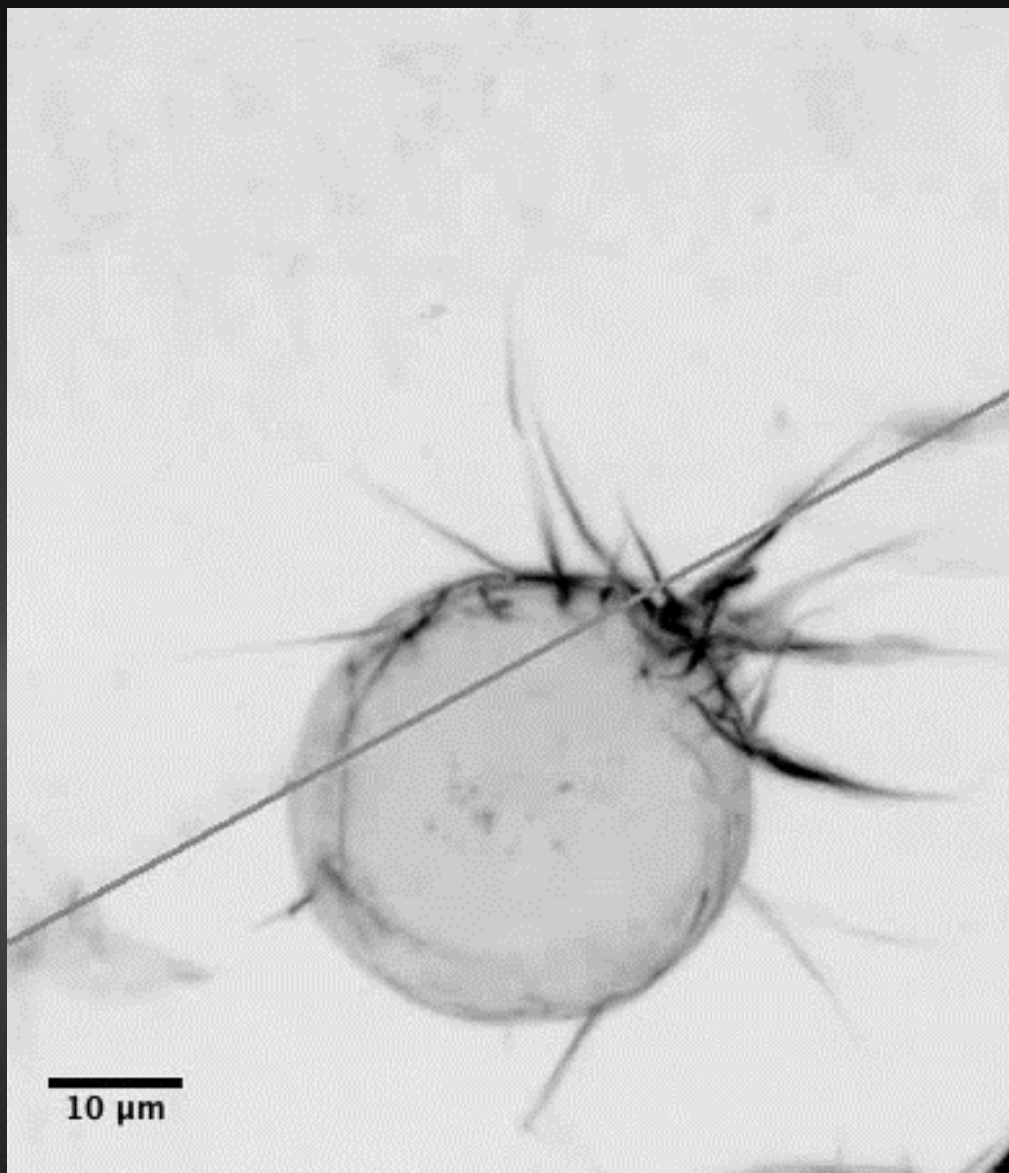


CCE  
BP



Película: 18 hs (54 a 72 hpf). Imágenes tomadas cada 10 minutos.

(Reig y col. 2017)

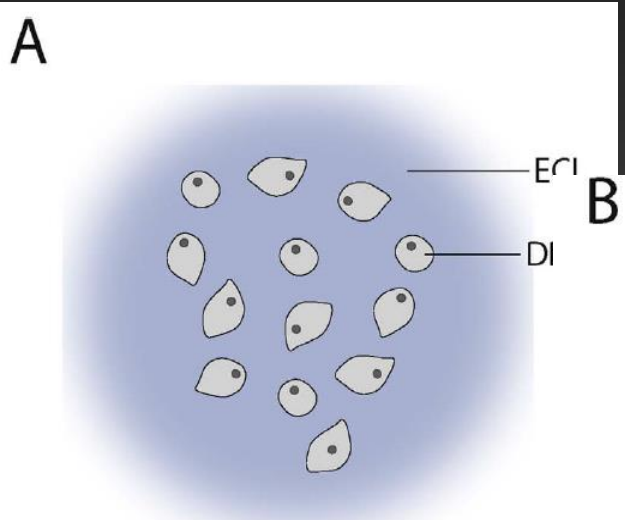


Imágenes tomadas cada 10 minutos.

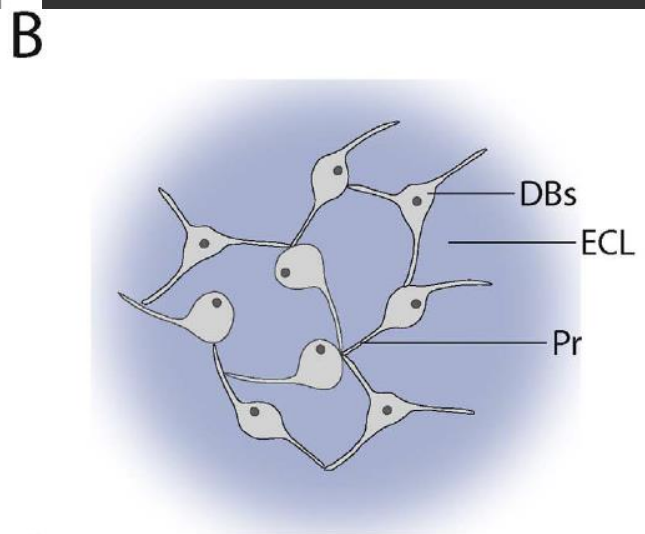
(Reig y col. 2017)



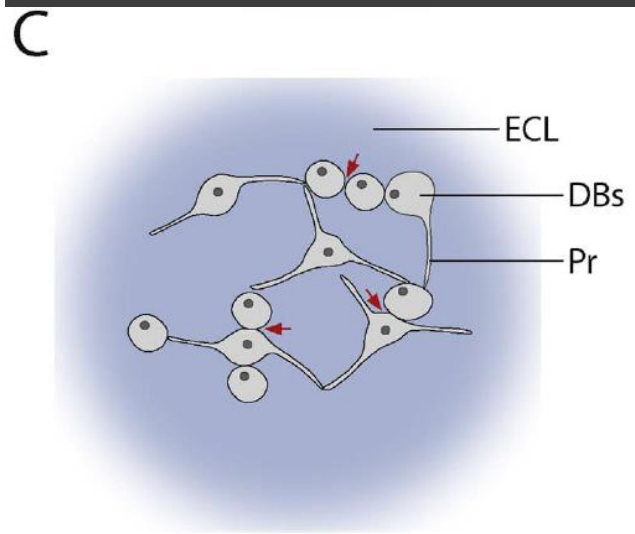
# Patrones de migración de las blastómeras profundas



*Austrofundulus*  
*Pterolebias*  
*Rachovia*  
*Nothobranchius*



*Austrolebias*, *Cynolebias*  
*Nothobranchius guentheri*



*Nothobranchius*

**Fig. 5.** Schematic illustration of the different migration types of deep blastomeres. A, deep blastomeres migrate as single cells and make only random contact. B, deep blastomeres are in contact via protrusions. C, deep blastomeres are in contact via protrusions and somata (red arrows). DBs, deep blastomeres; ECL, enveloping cell layer; Pr, protrusions.

Dispersion/reaggregation in early development of annual killifishes:  
 Phylogenetic distribution and evolutionary significance of a unique feature  
 Benjamin Naumann<sup>a,b,\*</sup>, Christoph Englert<sup>b,c</sup>  
<sup>a</sup> Institute of Zoology and Evolutionary Research, Jena, Germany  
<sup>b</sup> Leibniz Institute on Aging – Fritz Lipmann Institute, Jena, Germany  
<sup>c</sup> Institute of Biochemistry and Biophysics, Jena, Germany

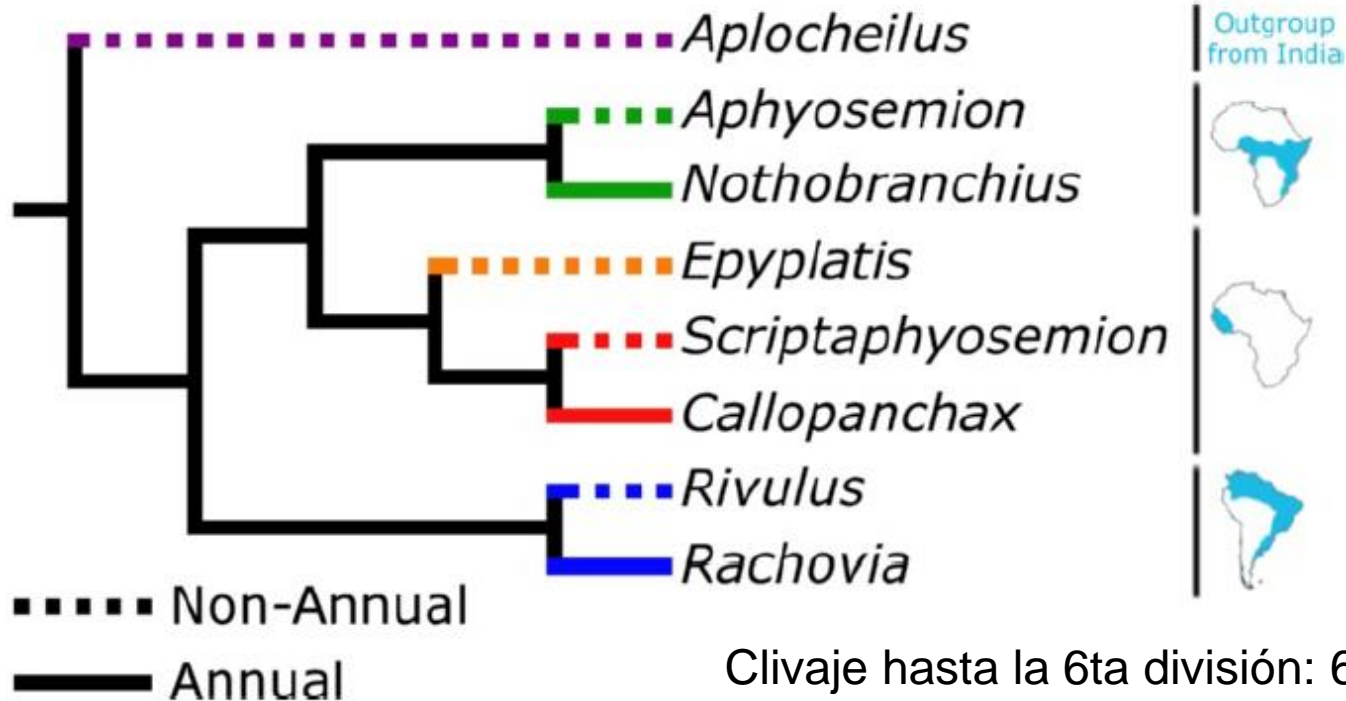
RESEARCH

Open Access

Particularidad 4

Transition to annual life history coincides with reduction in cell cycle speed during early cleavage in three independent clades of annual killifish

Luca Dolfi<sup>1</sup>, Roberto Ripa<sup>1</sup> and Alessandro Cellerino<sup>1,2\*</sup>



**Figure 1** Phylogram of the species used in the present study. Dashed lines indicate non-annual species, solid lines annual species and color codes for the three evolutionary lineages. The geographic distribution of each lineage is shown on the right. The phylogram is derived from the original Murphy and Collier molecular phylogram [19] based on cytochrome b, 12 s rRNA and 16 s rRNA genes.



# Duración del ciclo celular anuales vs. no anuales



varía dramáticamente

Tiempo promedio no anuales:  
34,8 min (rango 23 - 48)

Tiempo promedio anuales:  
75,6 min (rango de 66 - 100)

En los 3 clados: transición ciclo de vida =  
fuerza directriz cambio fenotípico



¿Ventaja evolutiva?

**Figure 4 Early cleavage time-lapse.** Non-annual species (dashed boxes) are compared with annual species (solid boxes) by brightfield time-lapse imaging. Early cleavage stages are shown for each species and the time at which they occur is indicated. There is a large difference in early division rate between annual and non-annual species.



# Escenario 1

## ***Pérdida de restricción evolutiva***

Disminución de la velocidad del ciclo celular  
en respuesta a debilitamiento en la selección direccional  
desarrollo rápido (anules: meses/años)

## Escenario 2

### *Ganancia de una nueva restricción*

ciclo celular se extiende como resultado de una adaptación específica prolongando un período donde el embrión puede responder con plasticidad fenotípica a condiciones ambientales

¿Cómo es posible que ocurra un enlentecimiento del ciclo celular?



# Hipótesis

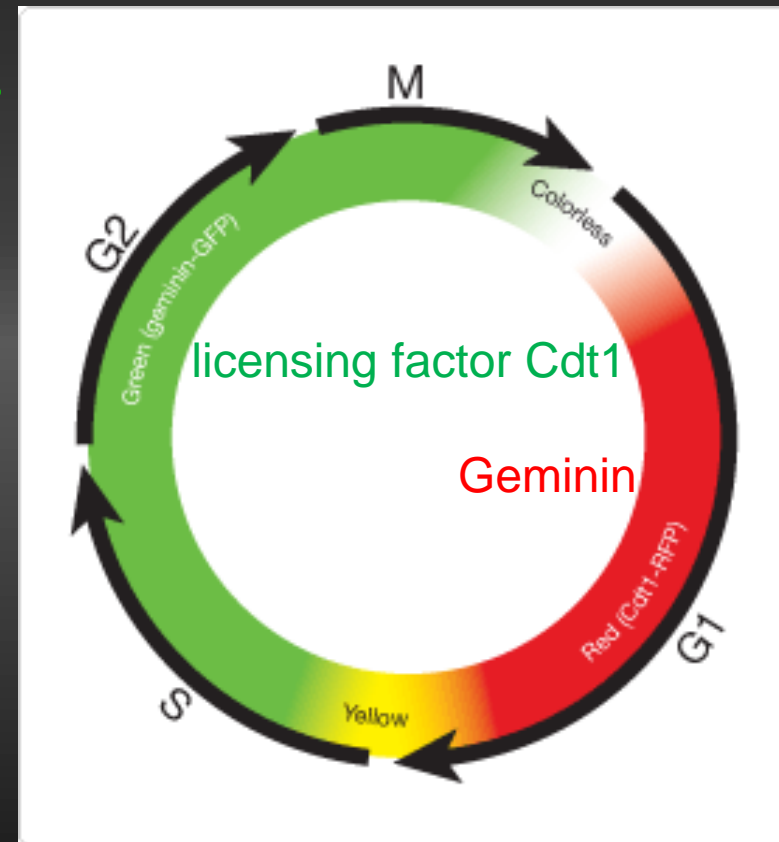
(Dolfi y col. 2014)

- 1) Fases S y M más lentas
- 2) Presencia de G1

ARNm reportero S/G2  
ARNm reportero G1

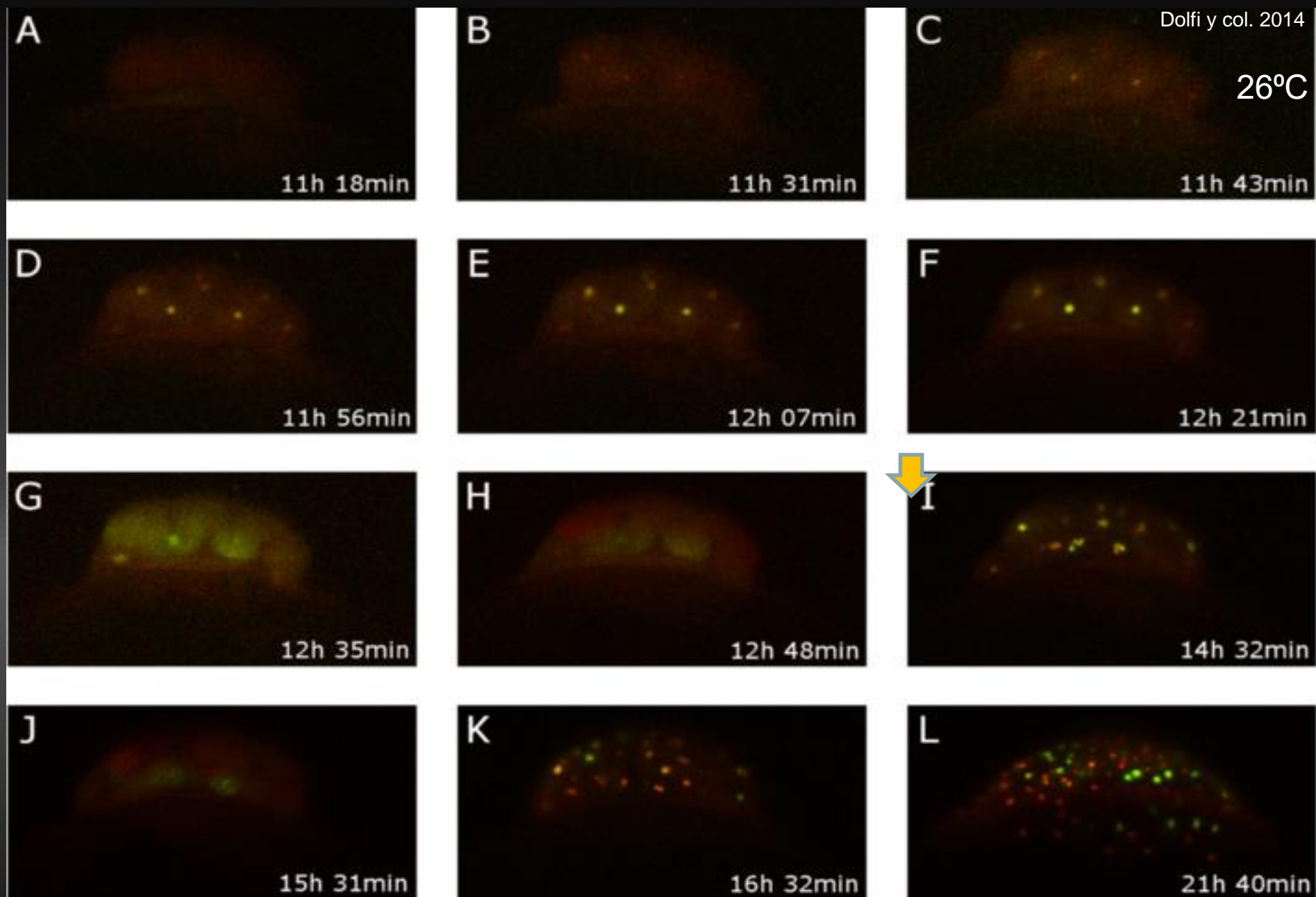


Transición G1/S



**FUCCI:**

*fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator*



A-H sincronía **señal amarilla**

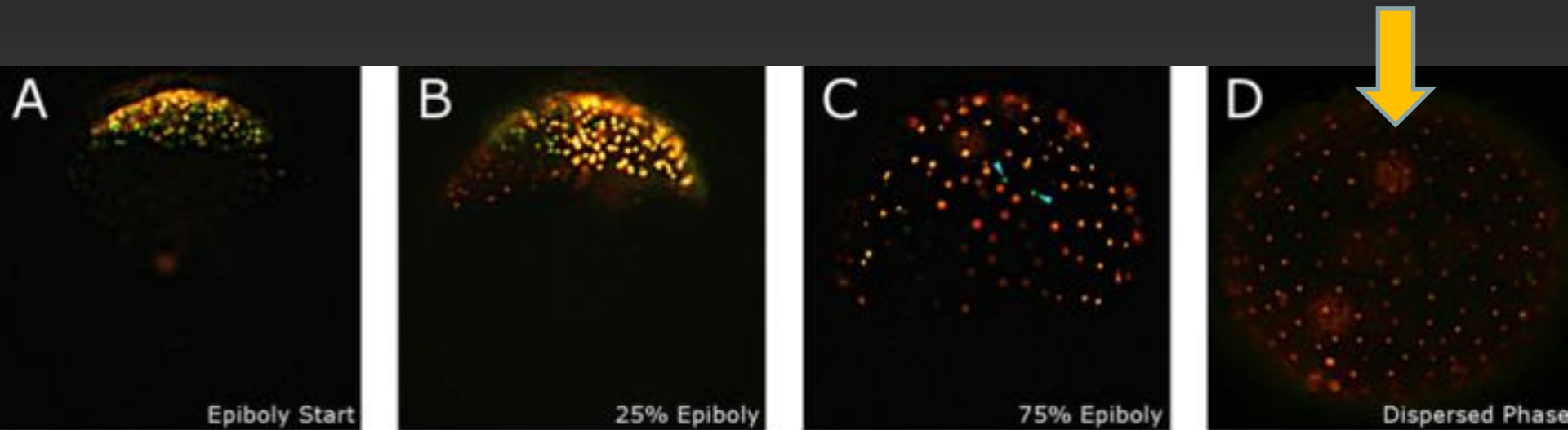
I-L asincronía **verde y roja**

No hay G1 hasta 5ta%

Hipótesis 1 válida

Sincronía hasta ciclo 4

# Reducción progresiva de fracción de células en fase S durante epibolia



100% epibolia: todas las células en  $G_1$

(Desventaja Fucci: no discrimina entre  $G_1$  y  $G_0$ )




# La pérdida de sincronía en las divisiones celulares ¿coincide con la activación del genoma cigótico?

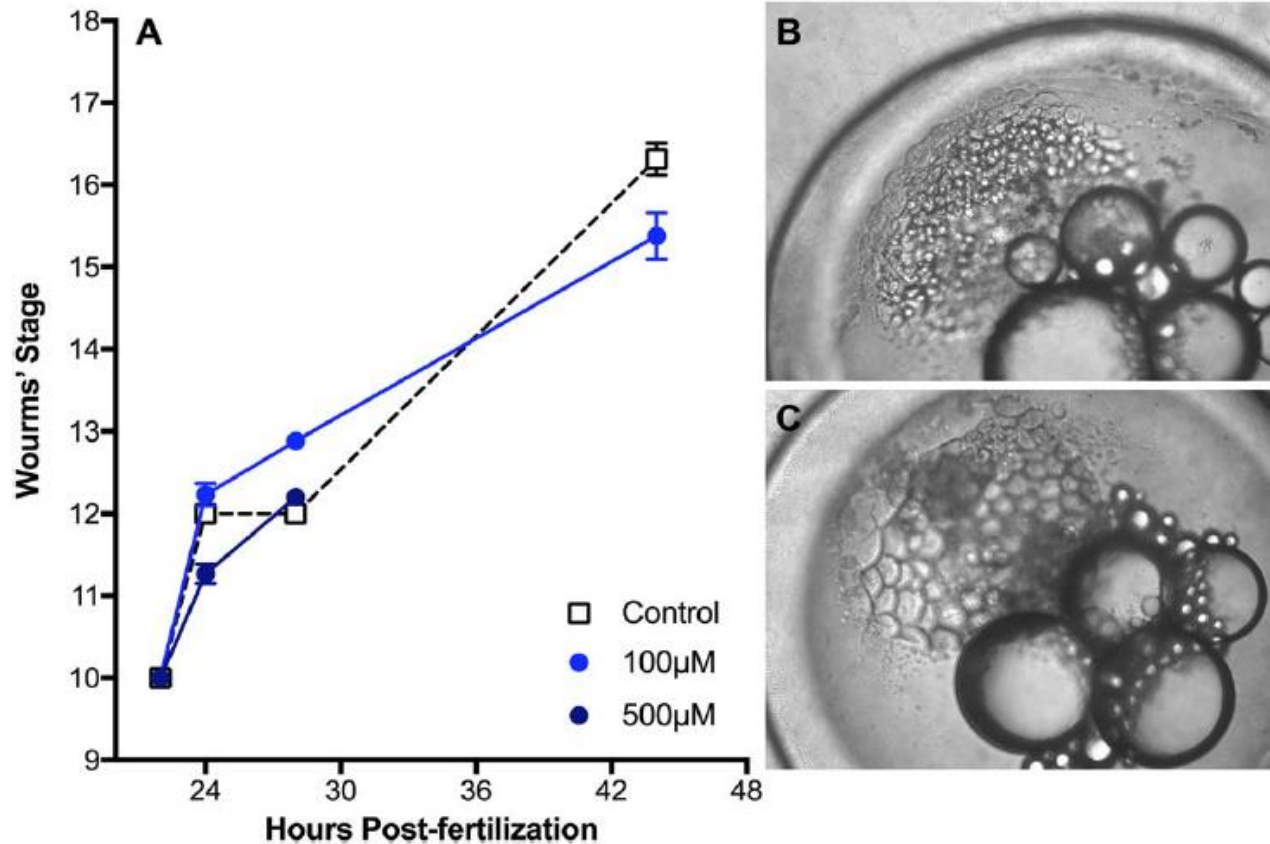
DEVELOPMENTAL DYNAMICS 246:779–801, 2017 THE AUTHORS DEVELOPMENTAL DYNAMICS PUBLISHED BY  
DOI: 10.1002/DVDY.24513

RESEARCH ARTICLE

## Embryonic Development of the Annual Killifish *Austrofundulus limnaeus*: An Emerging Model for Ecological and Evolutionary Developmental Biology Research and Instruction

Jason E. Podrabsky \*, Claire L. Riggs, Amie L. Romney, S. Cody Woll, Josiah T. Wagner, Kristin M. Culpepper, and  
Timothy G. Cleaver

Department of Biology, Portland State University, Portland, Oregon



**Fig. 8.** Mid-blastula transition. **A:** Incubation in actinomycin-D to block transcription stalls embryo development at Stage 12, the early hollow blastula stage. **B,C:** A normal Stage 12 embryo (**B**) at 24 hr postfertilization (hpf), and an abnormal embryo (**C**) at 44 hpf illustrating the loss of deep blastomeres and the lack of embryo expansion.

Incubación con actinomicina D = detención en estadio 12

Bloqueo de expansión del blastodermo y migración de blastómeras profundas

Activación del genoma cigótico: división 7/8 (antes mov epibolia pero después de diferenciación inicial BP/CCE)

# ¿Existen diferencias a nivel molecular entre embriones con tasas de desarrollo rápido vs. lento?

Romney and Podrabsky *EvoDevo* (2017)8:6  
DOI 10.1186/s13227-017-0069-7

EvoDevo

RESEARCH

Open Access



Transcriptomic analysis of maternally provisioned cues for phenotypic plasticity in the annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*

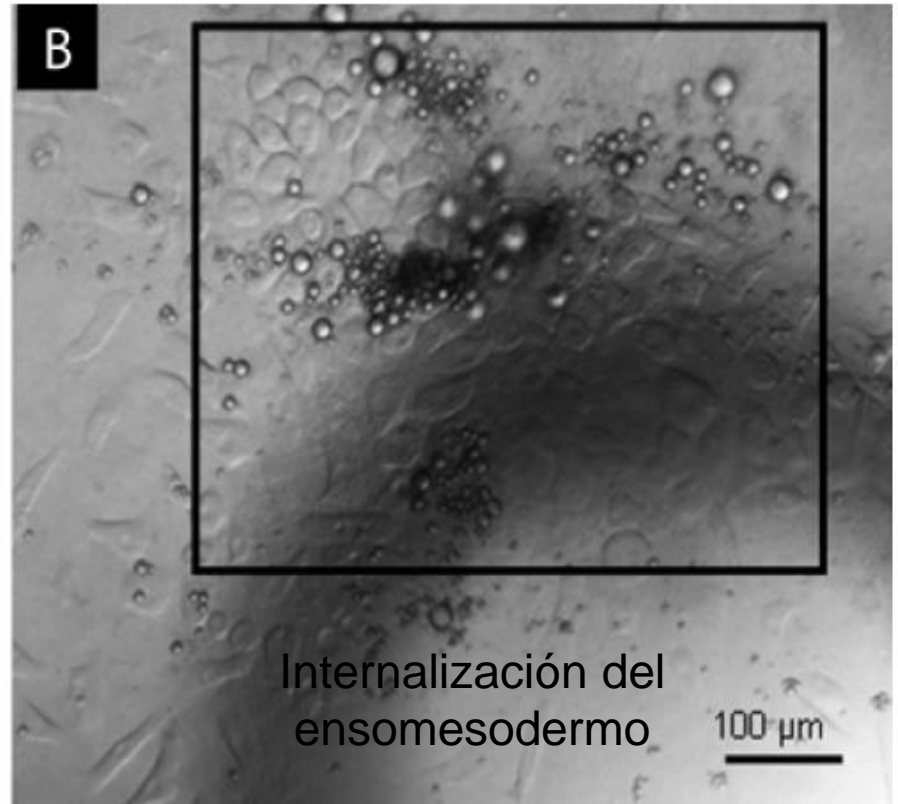
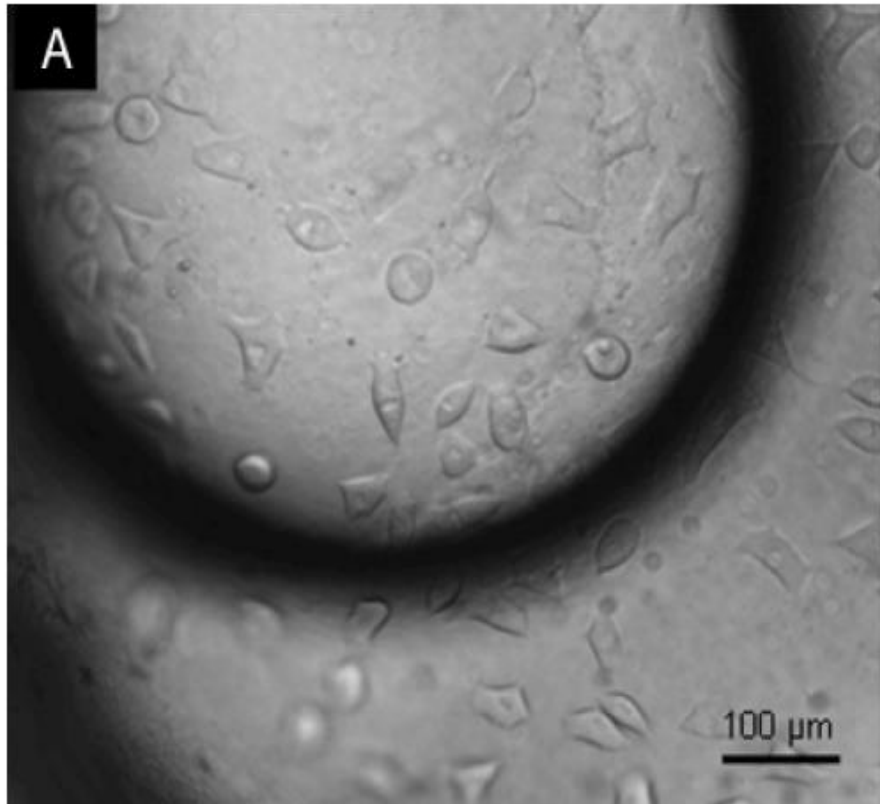
Amie L. Romney\* and Jason E. Podrabsky

Transcriptomas 1-2 células *A. limnaeus* y *D. rerio*

Esta historia continuará.....



# Fases de D/R: específicas de los peces anuales



Berois y col. 2012

## Dos grandes preguntas....

¿Cuál es la ventaja evolutiva de la fase de dispersión?

La internalización del endomesodermo:  
¿ocurre de manera similar al resto de los teleósteos no anuales?

# Fase de reagregación

DEVELOPMENTAL DYNAMICS 00:00–00, 2017  
DOI: 10.1002/DVDY.24496

RESEARCH ARTICLE

## Gastrulation in an Annual Killifish: Molecular and Cellular Events During Germ Layer Formation in *Austrolebias*

Luisa Pereiro,<sup>1</sup> Felix Loosli,<sup>2</sup> Juan Fernández,<sup>3</sup> Steffen Härtel,<sup>1,4,7</sup> Joachim Wittbrodt,<sup>5</sup> and Miguel L. Concha <sup>1,4,6\*</sup>

<sup>1</sup>Anatomy and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, Chile

<sup>2</sup>Karlsruhe Institute of Technology, Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe, Germany

<sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, Universidad de Chile, Santiago, Chile

<sup>4</sup>Biomedical Neuroscience Institute, Santiago, Chile

<sup>5</sup>Center for Organismal Studies, Heidelberg University, Heidelberg, Germany

<sup>6</sup>Center for Geroscience, Brain Health and Metabolism, Santiago, Chile

<sup>7</sup>National Center for Health Information Systems CENS, Santiago, Chile

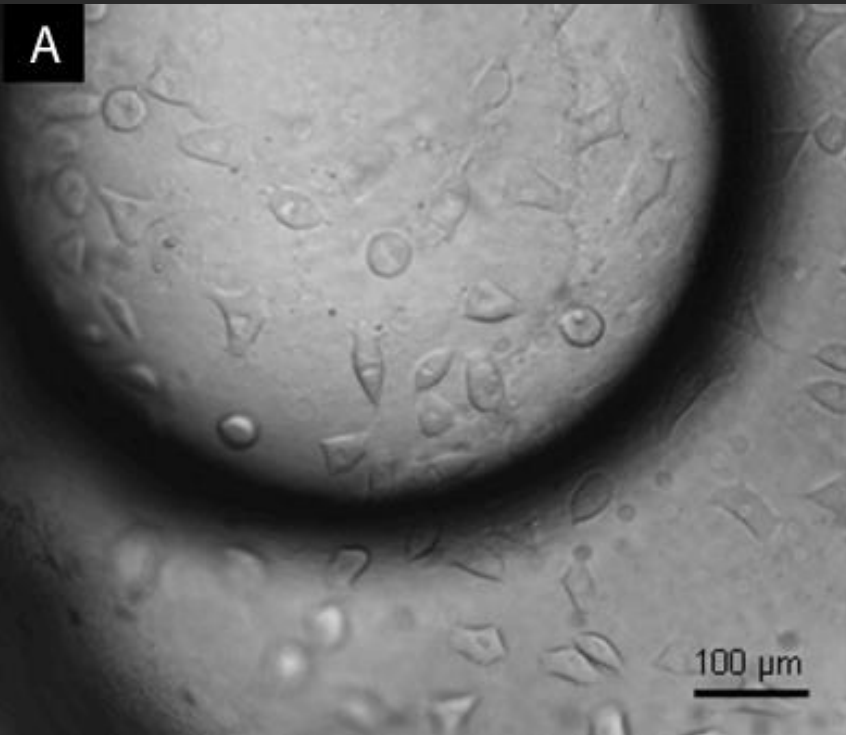
Esta historia continuará....





# Hipótesis (Wourms, 1972b)

## Posible ventaja evolutiva de la fase de dispersión



(Berois y col. 2014)

### Fase de dispersión

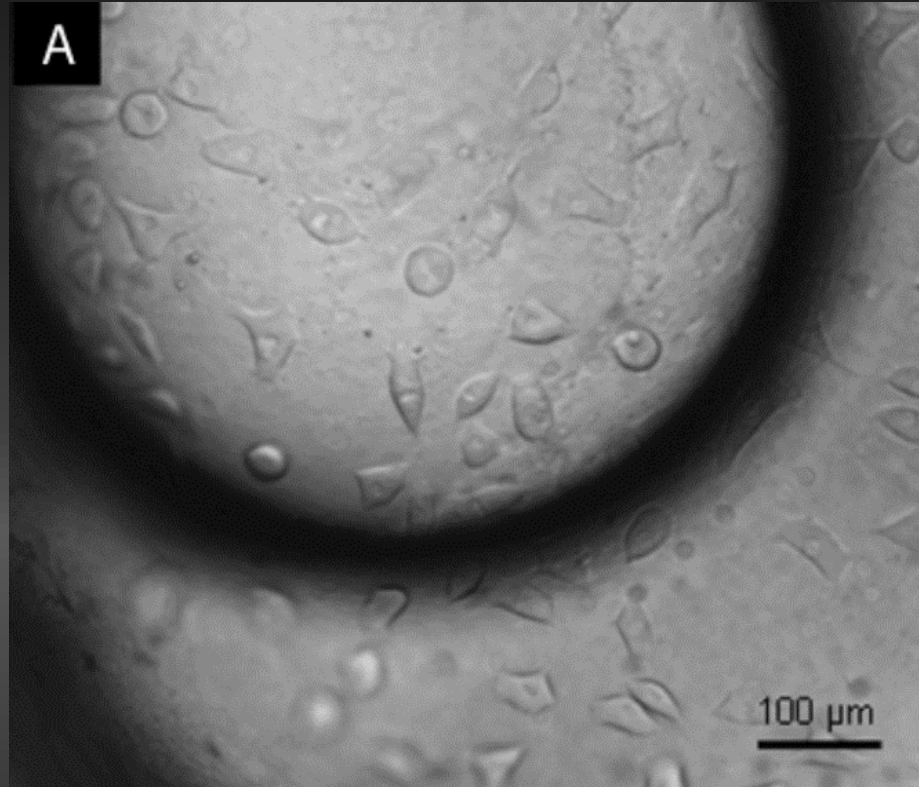
- blástula extendida en tiempo y espacio
- fase “insensible” (≠ gástrula, néurula, organogenesis)
- posible entrada en diapausa I

### Blastómeras profundas:

- indiferenciadas totipotentes
- (estrés ambiental – pérdida de algunas células no afecta embrión)

Embriones evitan posibles daños provocados por el ambiente  
“*escapando*” en el tiempo

# Fase dispersa = ¿blástula? (100% epibolia)



Esta pregunta la discutiremos en la instancia de Seminarios:

- Considerar:
- la definición de gastrulación en peces teleósteos
  - los argumentos planteados por Pereiro y col. 2017

...las blastómeras profundas en etapa  
100% de epibolia

*¿son células totipotentes?*



# Ensayos de microinyección: caracterización de CGPs

3'UTR ARNm *nanos D. rerio* -GFP (0,3 ng)  
ARNm Histona H2B-RFP (0,3 ng)

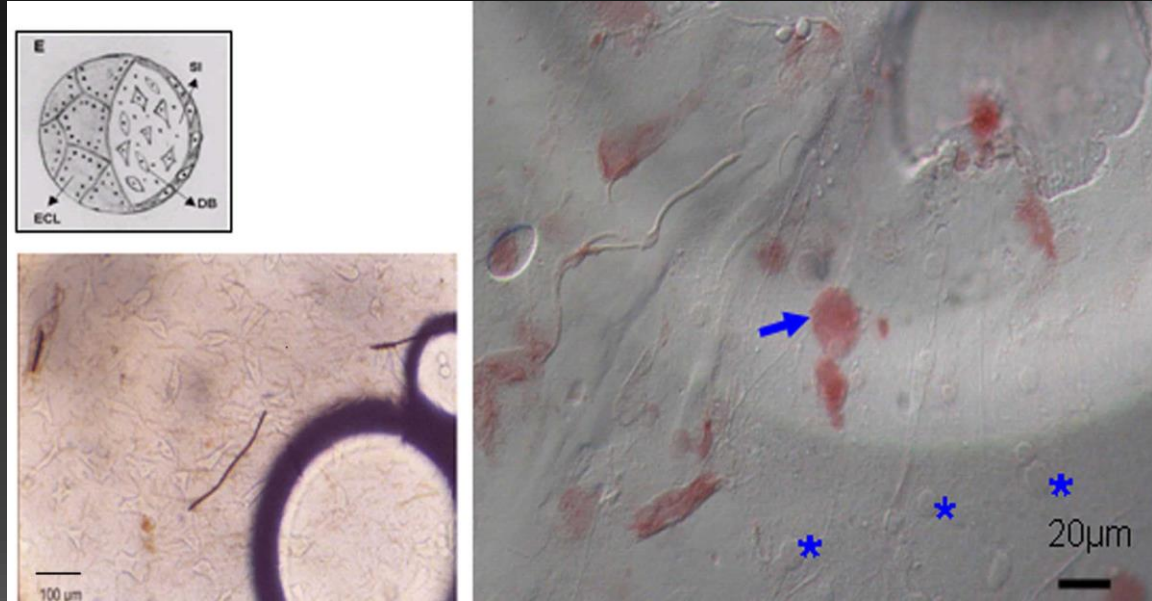
3'UTR ARNm *vasa D. rerio*-GFP (0,3 ng)  
ARNm Histona H2B-RFP (0,3 ng)



# Fase dispersión total (100% epibolia)

## Inmunodetección de células Vasa-positivas

(Arezo y col. 2016)



## Microinyección de

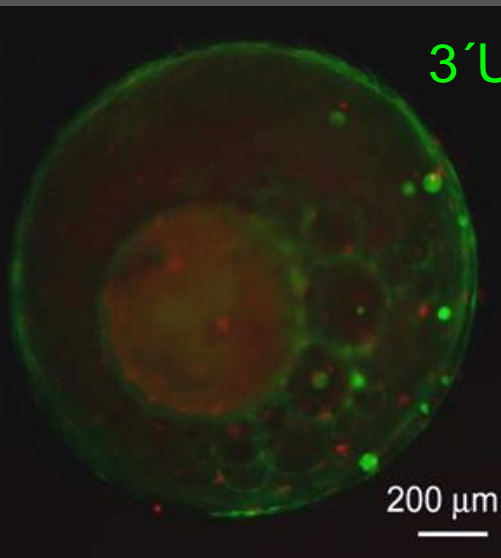
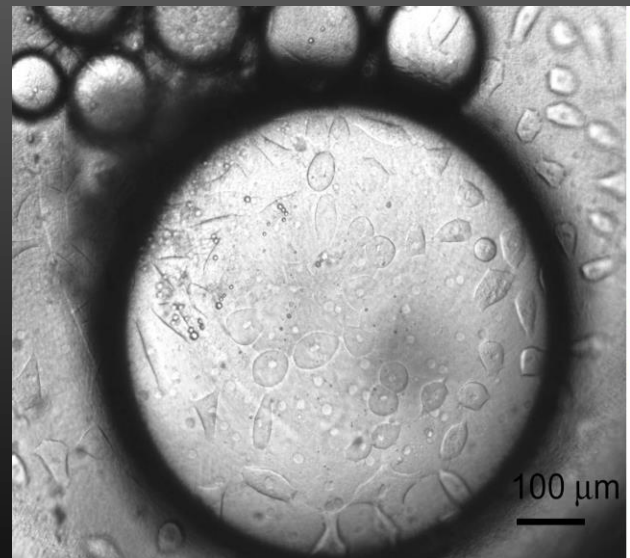
3'UTR vasa - GFP / H2B - RFP

(Arezo, 2012)

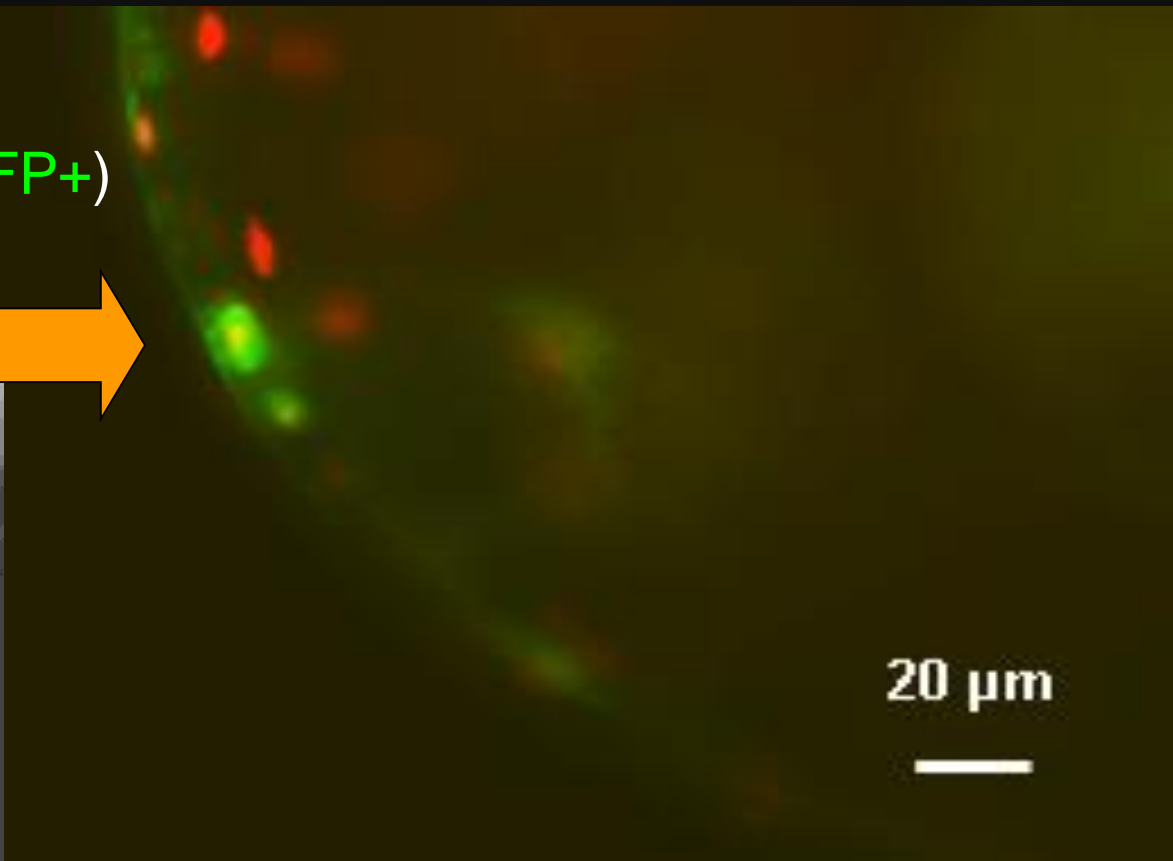
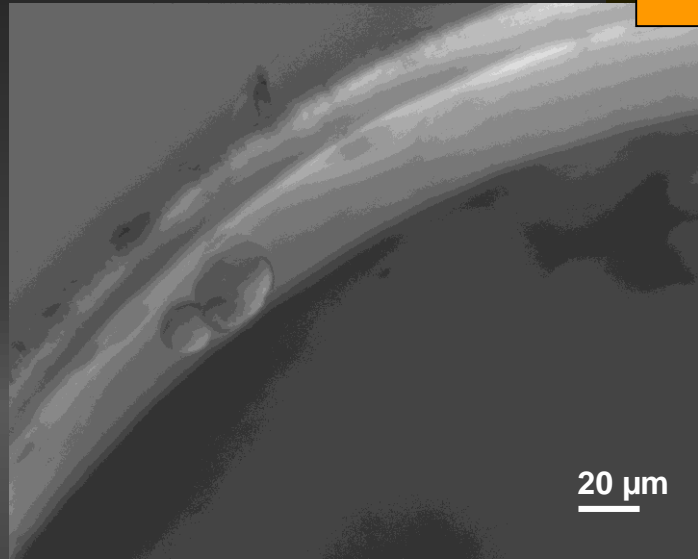
Mecanismo de regulación:

- Degradación gradual (cél. somáticas) y estabilización (CGP)
- Conservación (7 especies)

(Kopruner y col. 2001; Wolke y col. 2002; Herpin y col. 2007)



Fase dispersa:  
CGPs determinadas (GFP+)



(Arezo, 2012)

...las blastómeras profundas en etapa  
100% de epibolia no son totipotentes.....



# ¿podrían ser células pluripotentes?

Wagner and Podrabsky *EvoDevo* 2015, 6:2  
<http://www.evodevojournal.com/content/6/1/2>



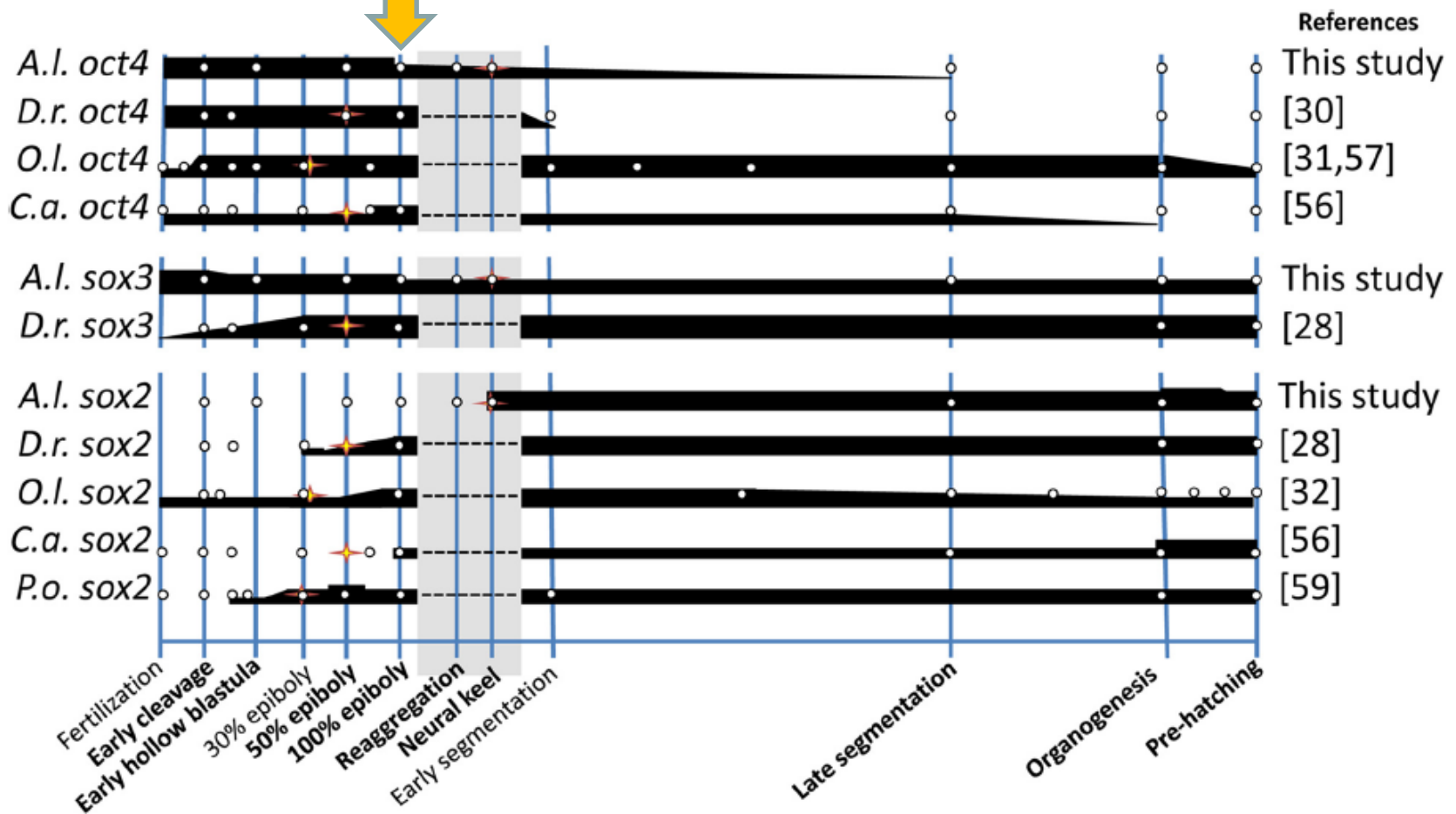
**EvoDevo**

**RESEARCH**

**Open Access**

Gene expression patterns that support novel developmental stress buffering in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*

Josiah T Wagner\* and Jason E Podrabsky



**Figure 3** Gene expression patterns of *oct4*, *sox3*, and *sox2* during development in *A. limnaeus* and other teleost fishes. All data points (white dots) are inferred from available qPCR data. Thickness of the black bars represents relative expression levels within each species. The stage with the first visible evidence of embryogenesis is indicated with a star for all species. Developmental stages that are absent in species other than *A. limnaeus* are indicated with a gray box. For data from this study, late segmentation and organogenesis stages would correspond to the DII and 9 dpd stages, respectively. Similar developmental stages were categorized based on previously reported characterizations [14,15,58,59]. *D.r.*, *Danio rerio*; *O.l.*, *Oryzias latipes*; *C.a.*, *Carassius auratus*; *P.o.*, *Paralichthys olivaceus*.

Son pluripotentes

...otro experimento que apoya la hipótesis de  
Wourms.....

RESEARCH ARTICLE

**Extreme Tolerance and  
Developmental Buffering of  
UV-C Induced DNA Damage in  
Embryos of the Annual Killifish  
*Austrofundulus limnaeus***

JOSIAH T. WAGNER\*

AND JASON E. PODRABSKY

Department of Biology, Portland State University, Portland, Oregon



2015

Embriones *A. limnaeus* en fase dispersa muy alta tolerancia a  
daño en el ADN inducido por UV

## *Particularidad 5*



Alta tolerancia embrionaria al estrés ambiental extremo  
(hipoxia severa y anoxia, radiación, etc.)



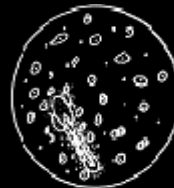
# Diapausas

Fecundación

Eclosión



I diapausa



II diapausa



III diapausa



larva

**Diapausa I**  
dispersión

**Diapausa II**  
somite medio

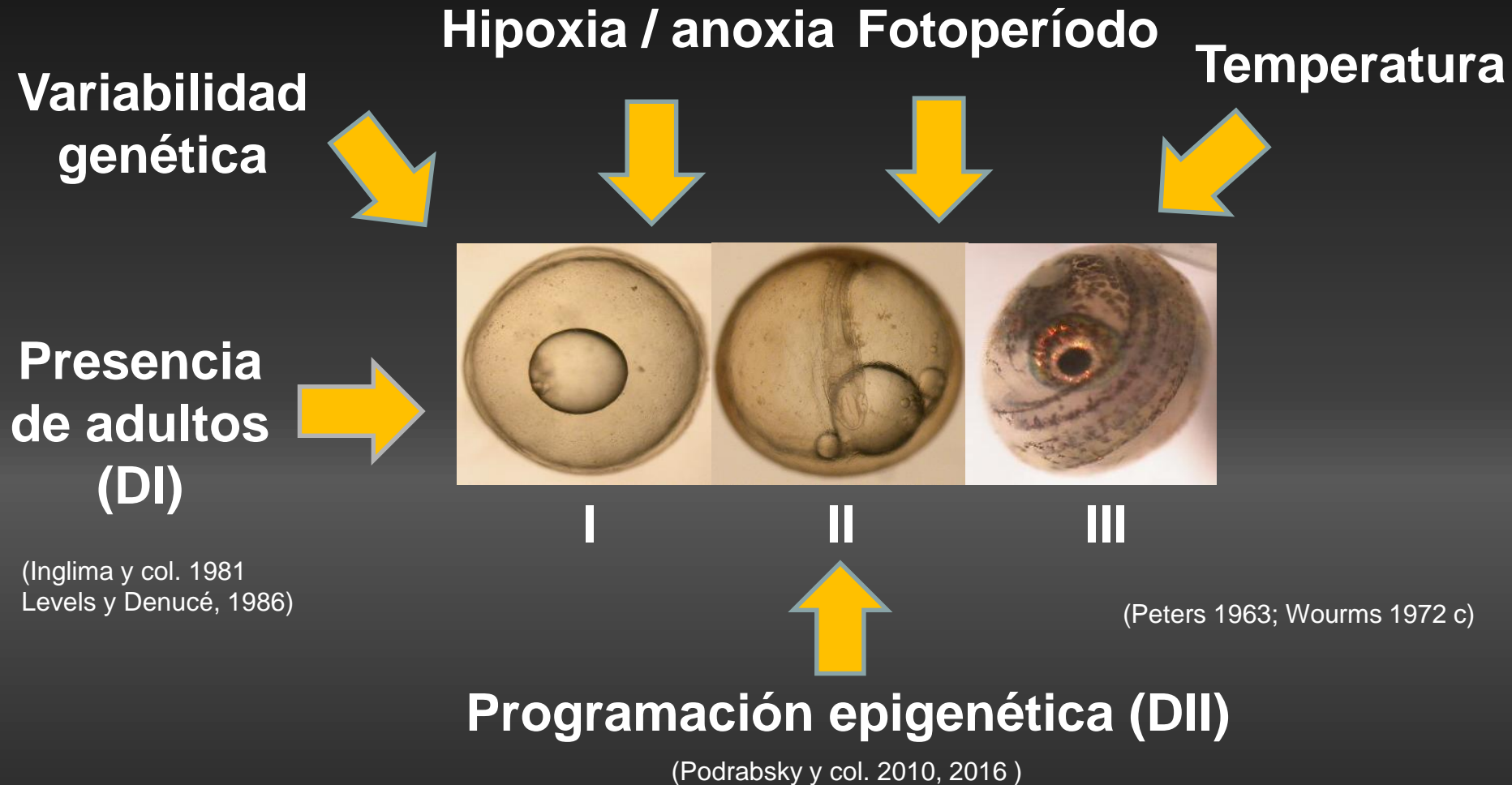
**Diapausa III**  
pre eclosión



(De la Piedra, no publicado)

Innovación evolutiva: adaptación a ambientes efímeros / extremos

# Diapausas



- fisiológicamente diferentes (Peters 1963; Wourms 1972 c)
- claves ambientales anulan influencia maternal (Podrabsky y col. 2010, 2016)

# Concepto de trayectorias alternativas

(asociado a particularidad 2 = diapausas)

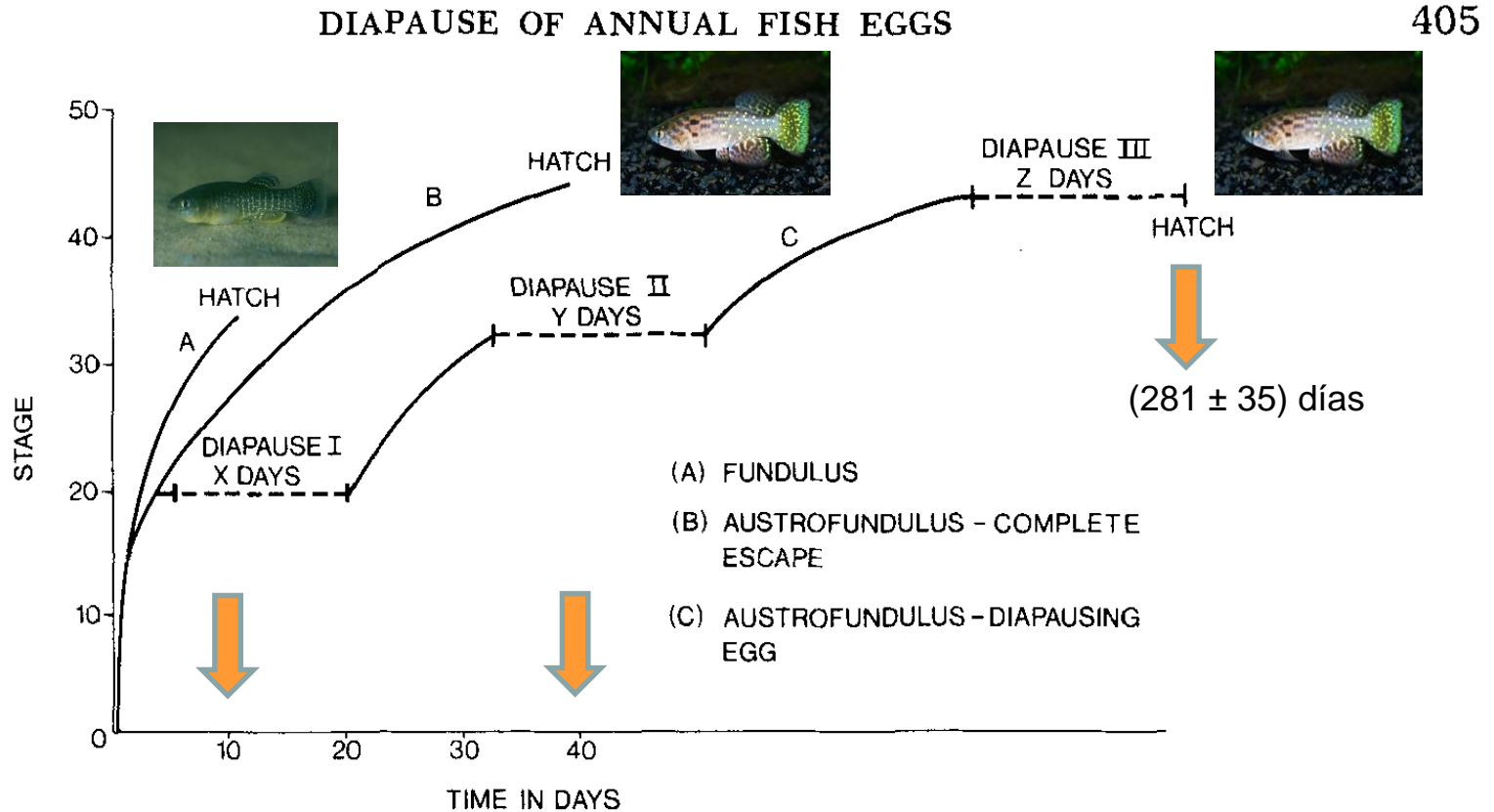
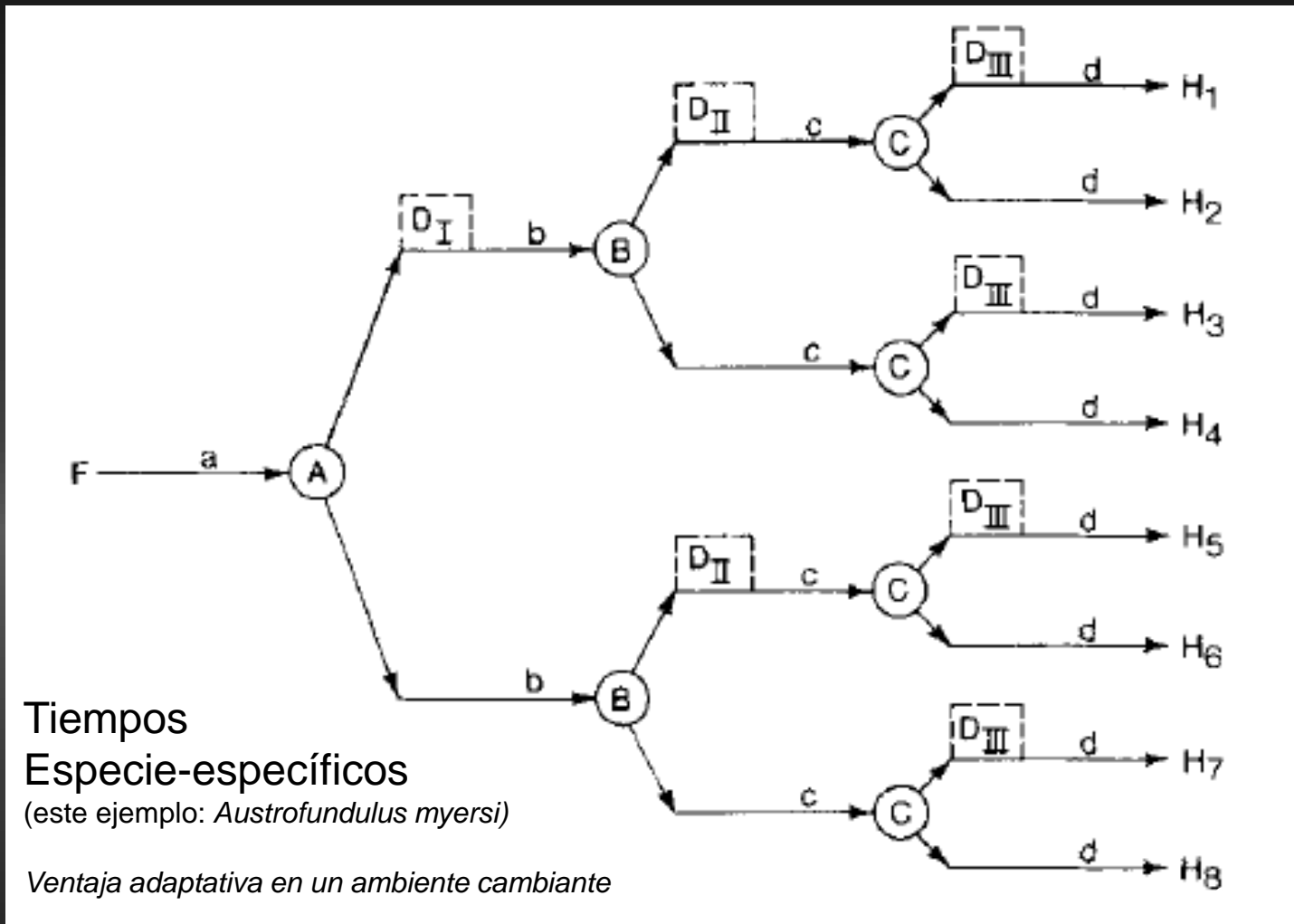


Fig. 7 The developmental rate of *Fundulus* and *Austrofundulus*. A. *Fundulus* at 20°C, based on Armstrong and Child ('65). B. *Austrofundulus* at 25°C, an "escape" egg which develops continuously from fertilization to hatching. C. *Austrofundulus* at 25°C, a diapausing egg. The duration of diapause is indicated by dashes. Diapause I is usually facultative. Diapause II and III are obligate.

# Efecto multiplicador

(Wourms, 1972 c)



(281 ± 35) días \*



40 días

Estrategia “**bet hedging**” no apostar la eclosión de los embriones a un mismo momento (Furness y col. 2015)



# Diapausas

Disminución de la tasa metabólica

Actividades vitales: se reducen o interrumpen

Síntesis proteica ↓

Actividad de bombas iónicas ↓

Estabilización de macromoléculas

**Son características generales de la dormancias**

# Hit Pause: Developmental Arrest in Annual Killifishes and Their Close Relatives

Karen L.M. Martin<sup>1</sup> and Jason E. Podrabsky <sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Pepperdine University, Malibu, California

<sup>2</sup>Department of Biology, Portland State University, Portland, Oregon

Esta historia continuará....

# Diapausa II / algunos datos sobre DIII

Portland State UNIVERSITY Podrabsky Laboratory

myPSU | Contact | Quick Menu ▾

Welcome | What is a killifish? | Our Research | Our Team | Publications | Facilities | Courses | Photo Galleries

**Our model organism**  
We study the species *Austrofundulus limnaeus* because of their unique development, ability to enter embryonic diapause, and tolerance to extreme environmental conditions. Click below to learn more about our model species.  
[Read More](#)

**Our model organism**  
We study the species *Austrofundulus limnaeus*...

**Research in the lab**  
We investigate cellular metabolism during...

**Publications**  
Our lab was featured on the cover for the July...

**Welcome to the Podrabsky Laboratory**  
We are a cellular and molecular laboratory within the Center for Life in Extreme Environments (CLEE) at Portland State University.  
Learn more about the [research at CLEE](#)  
Visit the [Department of Biology website](#).

[f](#) [t](#) Connect with PSU Biology!

Referente desde 1999

RESEARCH ARTICLE

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

# Vertebrate diapause preserves organisms long term through Polycomb complex members

Chi-Kuo Hu<sup>1</sup>, Wei Wang<sup>2,3\*</sup>, Julie Brind'Amour<sup>4\*</sup>, Param Priya Singh<sup>1</sup>, G. Adam Reeves<sup>1,5</sup>, Matthew C. Lorincz<sup>4</sup>, Alejandro Sánchez Alvarado<sup>2,3</sup>, Anne Brunet<sup>1,6†</sup>

Diapause is a state of suspended development that helps organisms survive extreme environments. How diapause protects living organisms is largely unknown. Using the African turquoise killifish (*Nothobranchius furzeri*), we show that diapause preserves complex organisms for extremely long periods of time without trade-offs for subsequent adult growth, fertility, and life span. Transcriptome analyses indicate that diapause is an active state, with dynamic regulation of metabolism and organ development genes. The most up-regulated genes in diapause include Polycomb complex members. The chromatin mark regulated by Polycomb, H3K27me3, is maintained at key developmental genes in diapause, and the Polycomb member CBX7 mediates repression of metabolism and muscle genes in diapause. CBX7 is functionally required for muscle preservation and diapause maintenance. Thus, vertebrate diapause is a state of suspended life that is actively maintained by specific chromatin regulators, and this has implications for long-term organism preservation.

Hu *et al.*, *Science* **367**, 870–874 (2020) 21 February 2020



Anne Brunet



Stanford  
University



Dorn, A. Fishbase



# Mechanisms of animal diapause: recent developments from nematodes, crustaceans, insects, and fish

Steven C. Hand,<sup>1\*</sup> David L. Denlinger,<sup>2\*</sup> Jason E. Podrabsky,<sup>3\*</sup> and Richard Roy<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana; <sup>2</sup>Departments of Entomology and Evolution, Ecology and Organismal Biology, Ohio State University, Columbus, Ohio; <sup>3</sup>Department of Biology, Portland State University, Portland, Oregon; and <sup>4</sup>Department of Biology, McGill University, Montréal, Québec, Canada

Submitted 5 June 2015; accepted in final form 11 March 2016



Datos peces anuales DII en *A. limnaeus* (Podrabsky Lab)

Regulación diapausas: distintos mecanismos, algunos compartidos

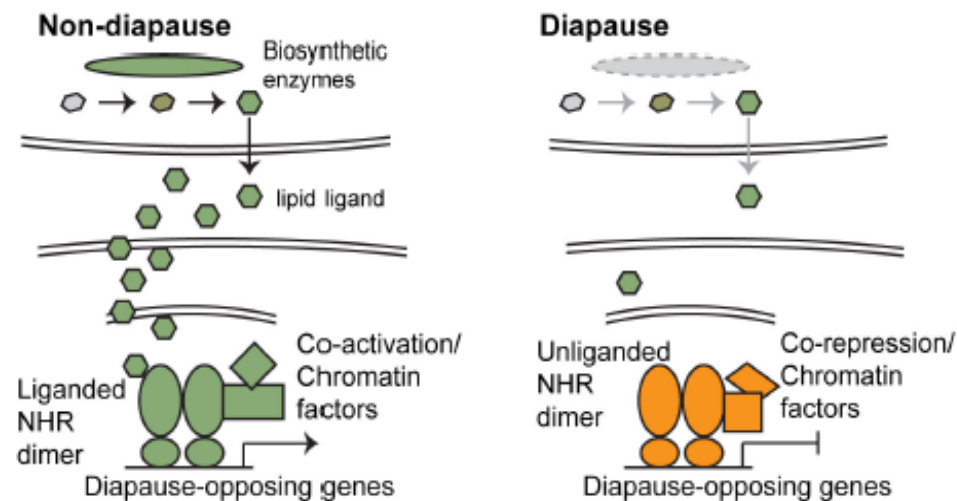
- mecanismos epigenéticos (pequeños ARNs, modificación histonas)
- Preservación integridad de proteínas: actividad tipo chaperonas
- **vía de señalización insulina/IGF** regulada a la baja = detención en G1  
**rol central control fisiología celular en depresión metabólica**



# Hormonal Regulation of Diapause and Development in Nematodes, Insects, and Fishes

Xantha Karp\*

Department of Biology, Central Michigan University, Mount Pleasant, MI, United States



**FIGURE 2 |** The regulation of diapause by nuclear hormone receptor signaling (NHR). In favorable environments (left), enzymes that catalyze the production of the lipid ligands are present, and these ligands are produced. Because the ligands can freely pass through the plasma and nuclear membrane, they are able to bind to their target NHRs. Ligand-bound NHRs function as transcriptional activators and turn on expression of genes that promote non-dauer development. In unfavorable environments (right), expression of the required enzymes is reduced and little ligand is present. Unliganded NHRs bind to corepressors and repress transcription of target genes, thus promoting diapause. Orange components promote diapause and green components promote non-diapause development. Note that in some insect species, NHR signaling functions opposite to what is described here, in that NHR signaling promotes diapause. See text for additional details.



# Temperature-dependent vitamin D signaling regulates developmental trajectory associated with diapause in an annual killifish

Amie L. T. Romney<sup>a,b</sup>, Erin M. Davis<sup>a</sup>, Meranda M. Corona<sup>a</sup>, Josiah T. Wagner<sup>c</sup>, and Jason E. Podrabsky<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Department of Biology, Portland State University, Portland, OR 97207; <sup>b</sup>School of Veterinary Medicine, Anatomy, Physiology, and Cell Biology, University of California, Davis, CA 95616; and <sup>c</sup>Knight Cancer Early Detection Advanced Research Center, Oregon Health and Science University, Portland, OR 97201

Edited by David M. Kingsley, Stanford University, Stanford, CA, and approved October 10, 2018 (received for review March 16, 2018)

Esta historia continuará....

*Nuestro organismo de estudio...*



# *Austrolebias* (Cyprinodontiformes)

cuencas Paraná-Plata / Patos-Merín / Amazonas

Loureiro, de Sá, 2016; Costa y col., 2017

Volcan y col. 2017 Alonso y col. 2018



## *Austrolebias charrua*

Tamaño genoma inusualmente grande

(García y col. 2014)

Distribución: Departamento de Rocha “Bañados del Este” y sur de Brasil

Dimensiones: 4,7 – 4,17 cm

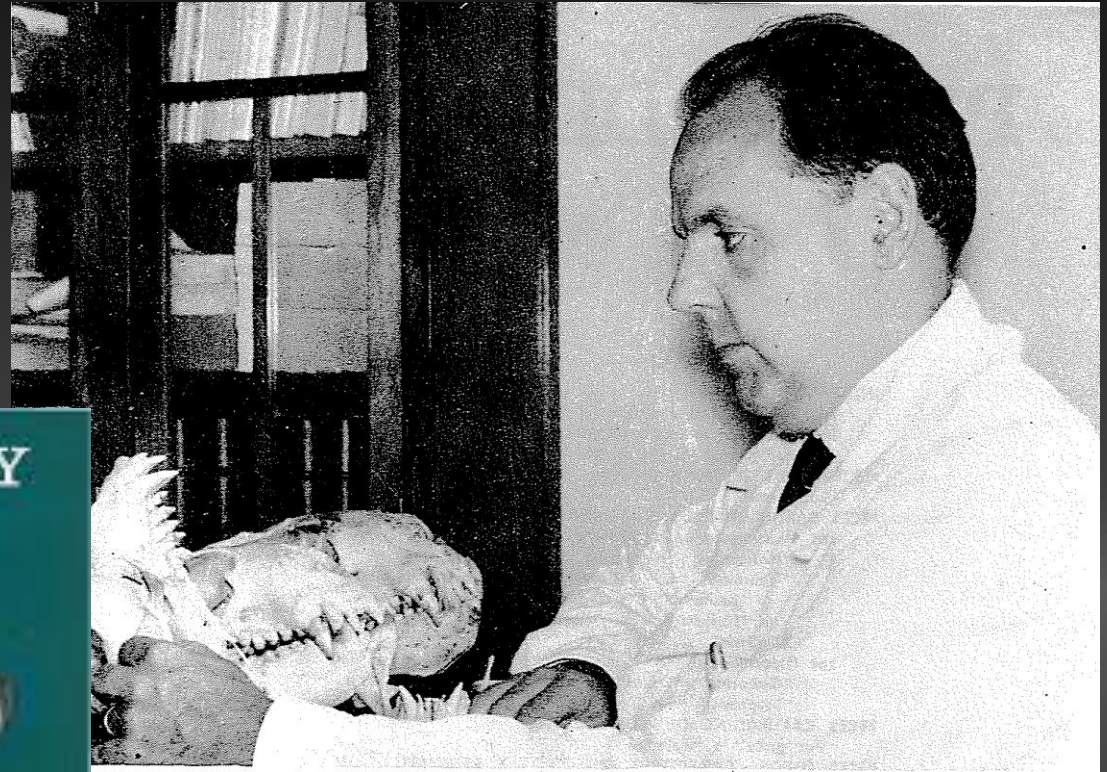
Hábitat: agua dulce

Interés: acuarístico / investigación

Posible biomarcador

(Papa y col 2019)

# Un poco de historia...



1918 - 2006

Eco-etología y taxonomía de peces anuales



# Grupo interdisciplinario: Proyecto CSIC1999-2000

## Genética Evolutiva



Responsable:  
Dra. Graciela García



## Biología Reproductiva y del Desarrollo



Responsable:  
Dra. Nibia Berois



## Sistemática



Responsable:  
Dr. Marcelo Loureiro

# *Austrolebias* en el laboratorio

- biogeografía de las especies del este de Uruguay
- infraestructura de acuarios
- mantenimiento
- reproducción
- cultivo de embriones
- desarrollo embrionario





# Investigadores nacionales



## Genética Evolutiva



Responsable:  
Dra. Graciela García



## Neurobiología



Dra. Anabel Fernández



Mag. Gabriela Casanova



## Envejecimiento



Dra. Verónica Gutiérrez



## Etología



Dra. Bettina Tassino

## Sistemática Filogeografía



Dr. Marcelo Loureiro

## Ecología



Dr. Matías Arim

Singularidades de los peces anuales: enfoque interdisciplinario

# Equipo de investigación

Biología de la reproducción y desarrollo en peces anuales



## *“Análisis de los mecanismos subyacentes a la diapausa en peces anuales”*

Responsable: MJ Arezo



Nibia Berois



Nicolás Papa



Hellen Schlieb



Daniel Blanco

## Colaboraciones nacionales



Cora Chalar  
Bioquímica



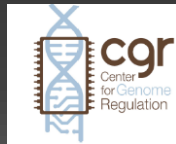
José Sotelo Silveira  
Dpto. Genómica IIBCE  
Biología Celular FC

Expresión génica  
transcriptómica  
proteómica  
PCR/inmunodetección

Historia de vida  
eco-evo-devo



# Colaboraciones internacionales



**Dres. Miguel Allende y Luisa Pereiro**  
Departamento de Biología  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile



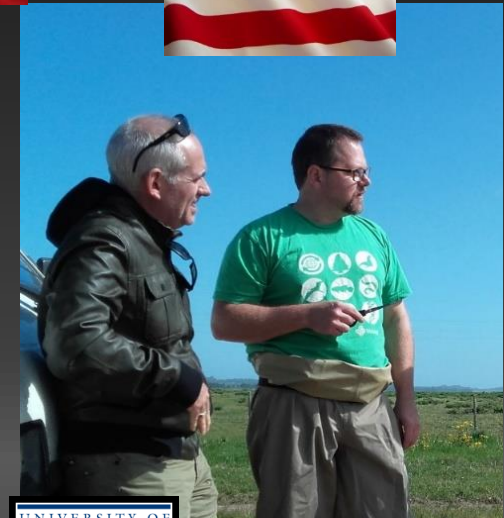
**Dr. Germán Reig**



**Dr. Matej Polacik**  
Institute of Vertebrate Biology  
República Checa

*Austrolebias charrua*

Genoma  
Transcriptomas  
Historia de vida  
Moléculas de adhesión





**Dr. Jason Podrabsky**  
Departamento de Biología  
Portland State University

**Dr. Rafael de Sá**  
Departamento de Biología  
University of Richmond

*... ¿qué claves moleculares están involucradas en la diapausa I?*



# Annual Killifish Adaptations to Ephemeral Environments: Diapause I in Two *Austrolebias* Species

María José Arezo <sup>1\*</sup> Nicolás G. Papa,<sup>1</sup> Nibia Berois <sup>1</sup> Graciela Clivio,<sup>1</sup> Jimena Montagne,<sup>1</sup> and Soledad De la Piedra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay. Depto. de Biología Celular y Molecular

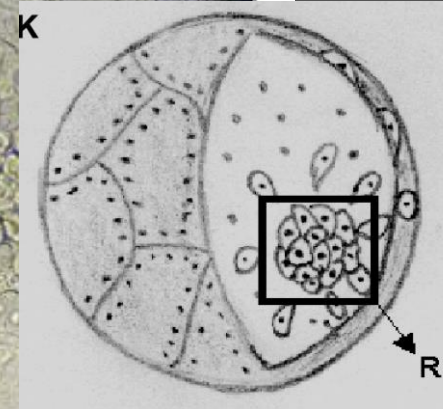
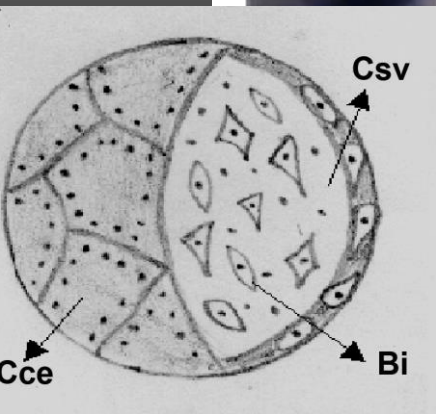
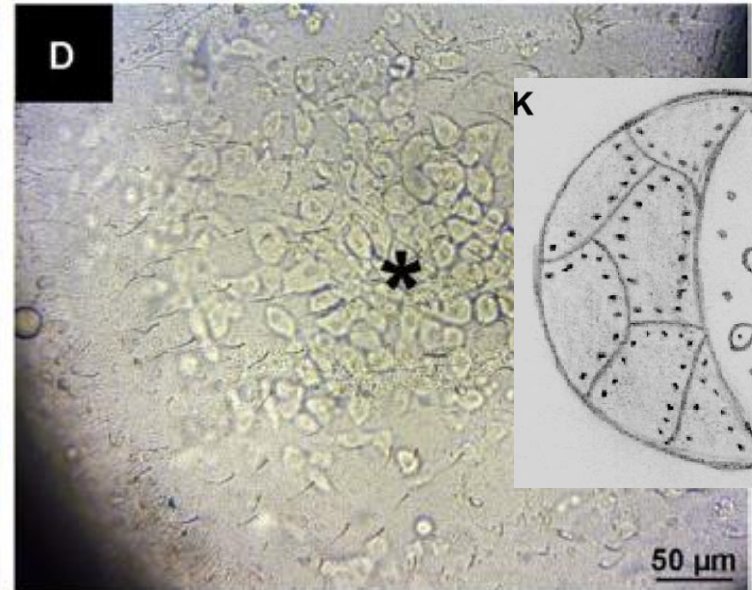
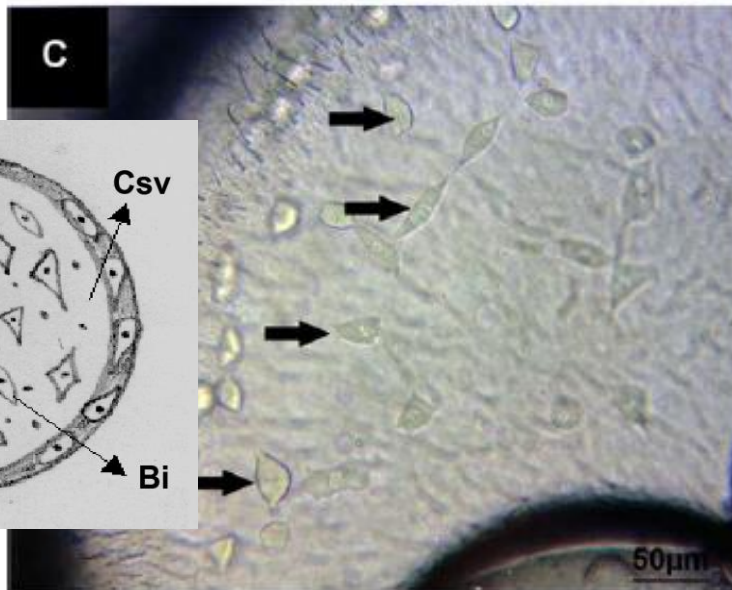
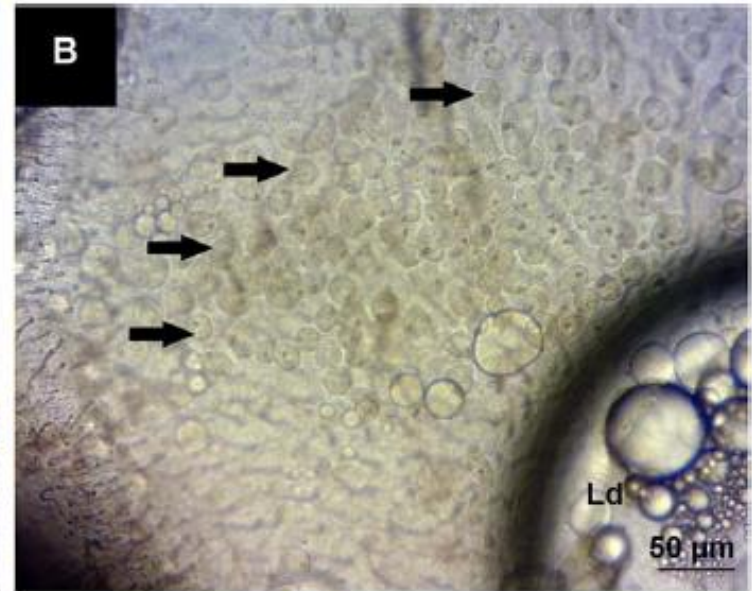
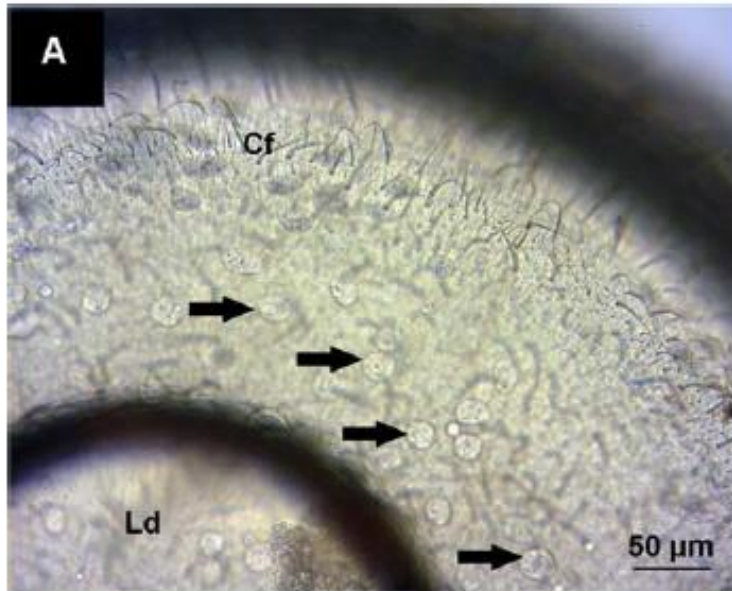
<sup>2</sup>Independent researcher, Viña del Mar, Chile

- Estandarizar un protocolo de inducción de diapausa I
- Caracterización morfológica de la diapausa I

Diapausa I

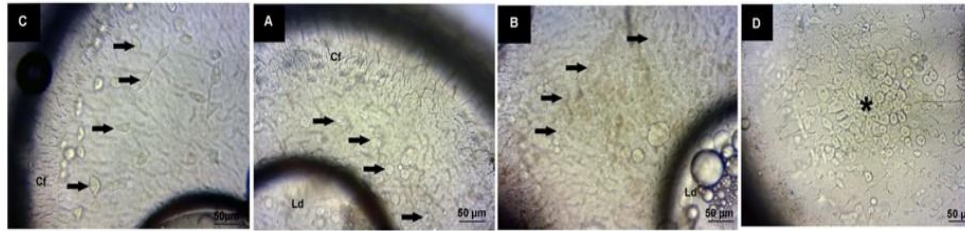
fenotipo A

fenotipo B





(Papa y col. en preparación)



Epibolia      Diapausa IA      Diapausa IB      Reagregado

## Aproximación transcriptómica

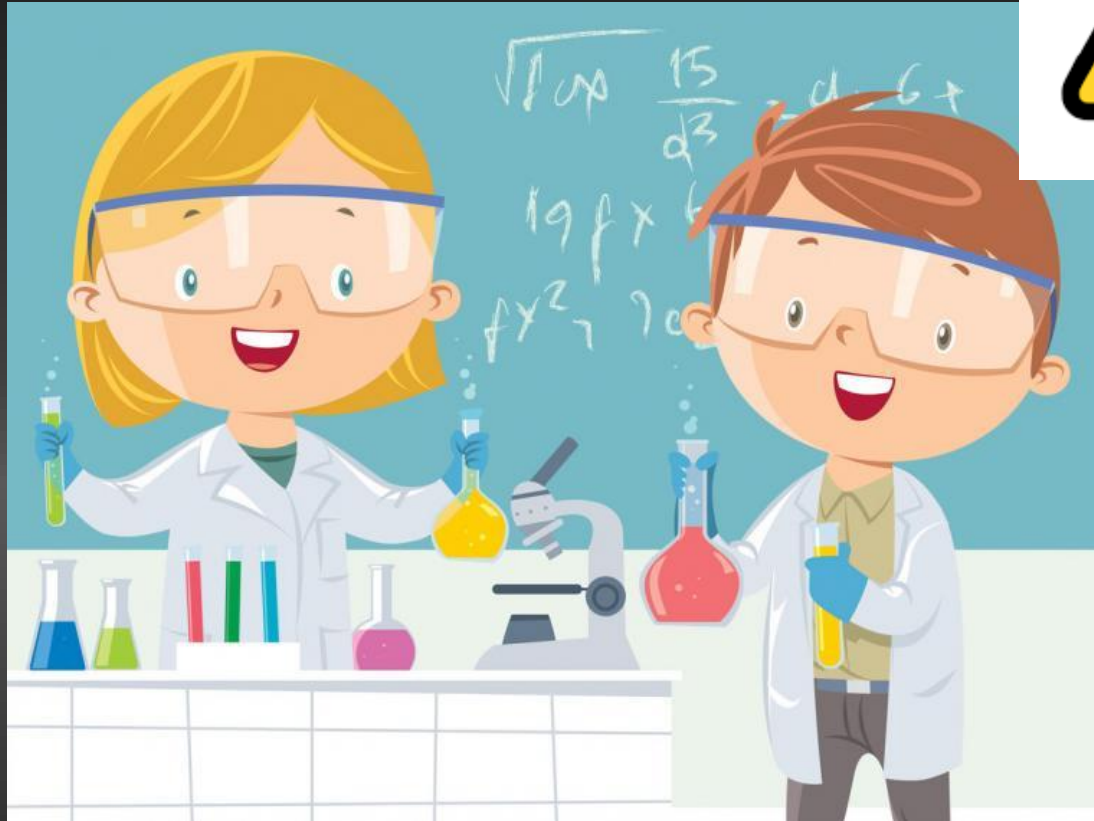
1) Expresión diferencial DI

2) Expresión diferencial  
Embriones activos vs. diapausa

3) Comparación entre diferenciales

- i) Aislamiento de ARN triplicados biológicos
- ii) Secuenciación: Novaseq de 40 millones de lecturas por muestra y fragmentos de 100 nucleótidos pareados





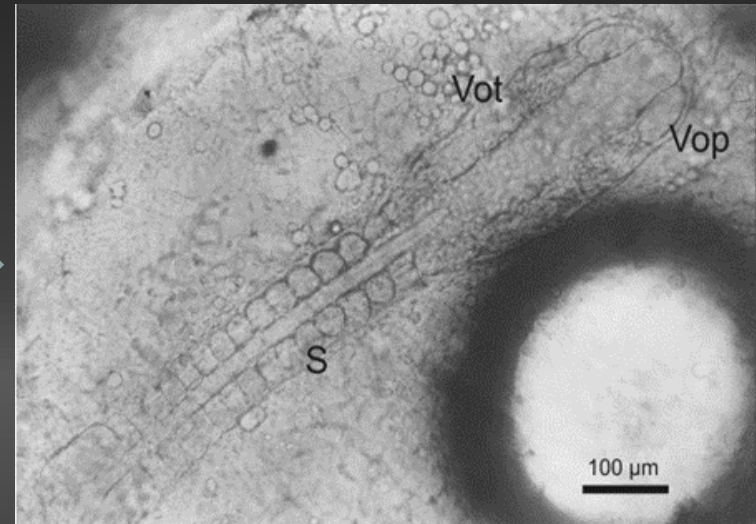
....datos obtenidos en el laboratorio ...



# Un ejemplo...ocurrencia de la diapausa I



cultivados a 25°C



*Austrolebias nigripinnis* (Peters, 1963)

*Austrofundulus myersi*, *Nothobranchius* (Wourms, 1972a)

*Aphyosemion*, *Cynopoecilus melanotaenia* (Wourms, 1972c)

*Austrolebias viarius* y *charrua* (Arezo y col. 2005, 2017)

*Austrofundulus limnaeus* (Wagner y Podrabsky, 2015)

rara o ausente



## First observations of annualism in *Millerichthys robustus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)

Omar Domínguez-Castanedo\*, Miguel Ángel Mosqueda-Cabrera\*  
and Stefano Valdesalici\*\*

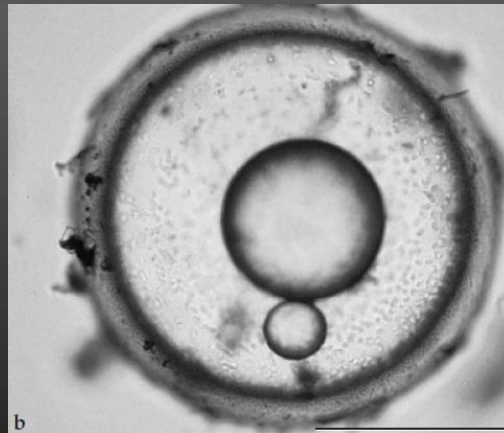


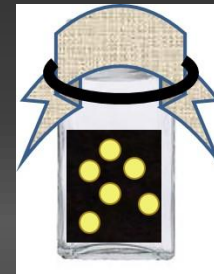
Fig. 1. *Millerichthys robustus*: a, male; b, female. Scale bars 10 mm.

Embriones colectados del charco = 100% en DI

# Monitoreo de la diapausa I en la naturaleza



*Austrolebias charrua*



**Experimento piloto chequeo del dispositivo:**

evaluar la dinámica del desarrollo ciclo completo

Dispositivos en el charco durante 78 días:

- re-localizables
- viabilidad embrionaria: 50% (rango teleósteos 33 to 93%, Fossum, 1988)
- **embriones viables en DI**



THE NATURAL HISTORY OF MODEL ORGANISMS

# *Nothobranchius furzeri*, an 'instant' fish from an ephemeral habitat

**Abstract** The turquoise killifish, *Nothobranchius furzeri*, is a promising vertebrate model in ageing research and an emerging model organism in genomics, regenerative medicine, developmental biology and ecotoxicology. Its lifestyle is adapted to the ephemeral nature of shallow pools on the African savannah. Its rapid and short life cycle commences when rains fill the pool: fish hatch, grow rapidly and mature in as few as two weeks. They reproduce daily until the pool dries out. Its embryos then become inactive, encased in the dry mud and protected from the harsh environment until the rains return. This invertebrate-like life cycle (short life cycle and long developmental arrest) combined with a vertebrate body plan provide the ideal attributes for a laboratory animal.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.41548.001>

MARTIN REICHARD\* AND MATEJ POLAČIK

2019



Embriones  
+ humedad  
- oxígeno

DII a DIII

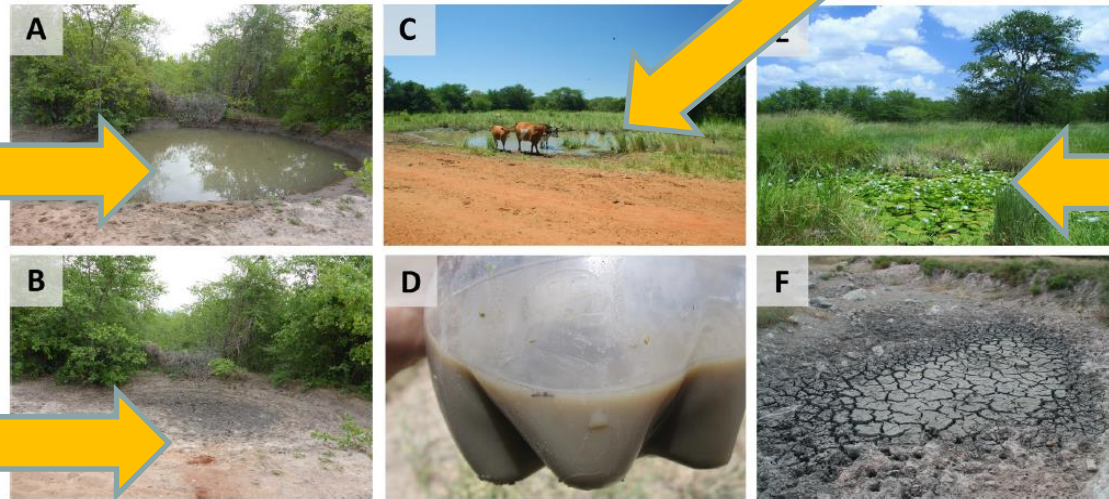
(primeras lluvias)

Embriones  
en DI  
(anoxia)

Embriones  
en DIII

(eclosión: lluvias)

Embriones  
en DII  
(+ oxigenado  
DI a DII)



**Figure 2. Turquoise killifish habitats.** (A) A structurally simple habitat one week after filling with water. (B) The same habitat three weeks after filling, fully desiccated. (C) Domestic cattle that commonly visits killifish habitats. (D) Turbid water from a structurally simple killifish habitat discoloured by dissolved fine sediment particles. (E) A structurally complex habitat with abundant aquatic vegetation. (F) Desiccated pool sediment, with typical deep cracks. Image credits: Milan Vrtílek (2A, 2B), Martin Reichard (2C, 2E, 2F), Matej Polačik (2D).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.41548.003>





Dr. Matej Polacik  
Institute of Vertebrate Biology  
República Checa

Entrada y salida de embriones en diapausa  
en la naturaleza: **control ambiental**  
(≠ datos de laboratorio)

Variabilidad en avance del desarrollo:  
**habitat heterogeneo**  
(no control intrínseco)

Reichard y Polacik, 2019

*Austrolebias bellottii* y *charrua*  
(Polacik y col. no publicado, Arezo y col. no publicado)



Charco con agua:  
embriones en diapausa I

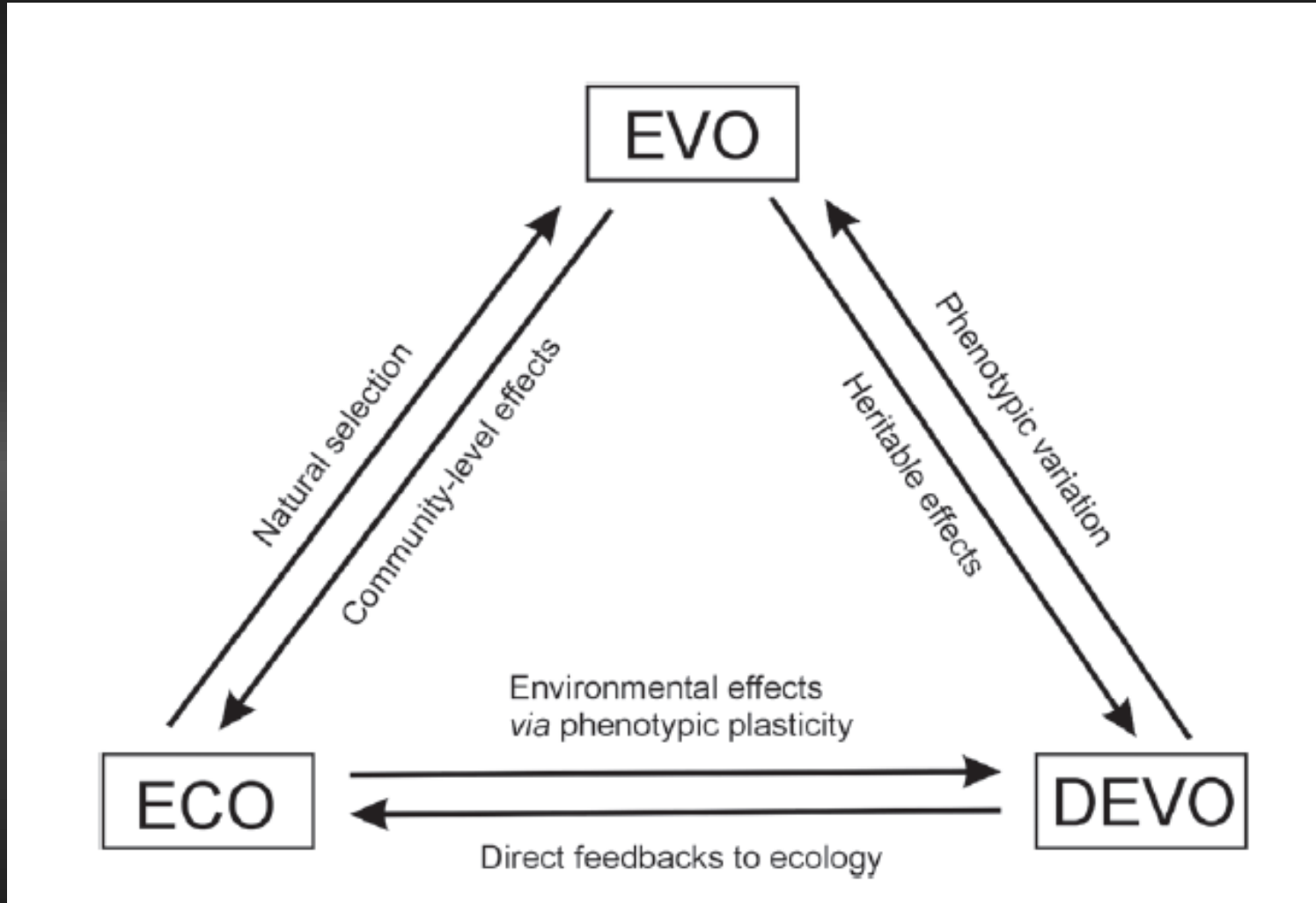
# Medición de variables ambientales en el sustrato del charco

## Sensores de temperatura y humedad

(Colaboración con el Dr. Jason Podrabsky)



# Relevancia ecológica: cambios genoma - cambios adaptativos





Muchas gracias por su atención

