

Organogénesis digestiva del parracho, *Scophthalmus rhombus* L.

I. Hachero¹, J.B. Ortiz-Delgado², B. Borrega², M. Herrera¹, J.I. Navas¹
y C. Sarasquete²

- ¹ Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía (IFAPA), Junta de Andalucía. Centro "Agua del Pino". Carretera Cartaya - Punta Umbría s/n, 21450 Cartaya, Huelva. ismael.hachero.ext@juntadeandalucia.es
- ² Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, CSIC. Campus Universitario Río San Pedro, 11510 Puerto Real, Cádiz. carmen.sarasquete@icman.csic.es

Resumen

Se estudia la ontogenia del tracto digestivo durante el desarrollo larvario de parracho, *Scophthalmus rhombus* desde la eclosión hasta el día 38, utilizando técnicas histológicas e histoquímicas. Durante la fase de alimentación exógena (4 dde –días después de la eclosión-), tanto la boca como el ano están abiertos y el tracto digestivo está diferenciado en cavidad bucofaríngea, esófago, estómago incipiente e intestinos anterior, medio y posterior. Las glándulas gástricas se diferencian alrededor de los 23 dde e incrementan en número y desarrollo progresivamente. Las células mucosas digestivas son ricas en mucosustancias neutras y/o ácidas. Además, la absorción intestinal lipídica es evidente a los 7-8 dde y las vacuolas supranucleares (micropinocitosis proteica) del intestino posterior se detectaron a los 4 dde. El páncreas exocrino presenta gránulos de zimógeno acidófilos (precursores enzimáticos) a los 2-3 dde y al mismo tiempo se identifican los gránulos de glucógeno hepáticos y el páncreas endocrino.

Abstract

Organogenesis of the digestive system of the brill, *Scophthalmus rhombus* L.

The ontogeny of the digestive tract during the larval development of *Scophthalmus rhombus* was studied using histological and histochemical techniques. At exogenous feeding (4 days after hatching –dah-), both the mouth and the anus are opened and the digestive tract was differentiated in bucofaryngeal cavity, oesophagus, incipient stomach, foregut, midgut and hindgut. The gastric glands differentiated around 23 dah. Digestive mucous cells were rich in neutral and/or acidic mucosubstances. Intestinal lipid absorption was evident from 7-8 dah and protein supranuclear vesicles (protein micropinocytosis) of the hindgut were detected at 4 dah. The exocrine pancreas shows, around 2-3 dah, acidophilic zymogen granules (enzymatic precursors) and at the same time the hepatic glycogen granules and endocrine pancreas were identified from 2 dah.

Introducción

El parracho o rémol (*Scophthalmus rhombus*, L.) es una de las especies de peces planos con las que se está trabajando en la actualidad, y que por su buena aceptación comercial, su precio y los buenos resultados de supervivencia y crecimiento obtenidos en el engorde, despierta un notable interés para la diversificación de la Acuicultura (Herrera *et al.*, 2005). Además, su adaptación a aguas cálidas aumenta el interés en su cultivo en la zona suratlántica, hasta hace poco centrada en el cultivo de dorada y lubina.

Actualmente se dispone de una tecnología de reproducción que permitirá realizar ensayos de cultivo a escala industrial. Sin embargo, las tasas de supervivencia obtenidas en los ensayos de cultivo larvario, inferiores siempre al 5%, aconsejan centrar el esfuerzo científico-técnico en esta fase. El estudio histofisiológico del sistema digestivo sentará las bases para el desarrollo de protocolos de alimentación basados en los requerimientos nutritivos de la especie. El objetivo de este trabajo es conocer el desarrollo temporal del sistema digestivo y de sus órganos y tejidos, lo cual permitirá optimizar los protocolos de alimentación larvaria, así como disponer de una base para futuros trabajos de nutrición.

Material y Métodos

Las larvas de *S. rhombus* se obtuvieron mediante fecundación artificial del lote de reproductores del IFAPA/Centro "Agua del Pino", y se cultivaron desde que eclosionaron hasta el final del experimento (38 después de la eclosión (dde) en tanques de 1600 L (2.27 m²) circulares y de fondo plano. Las larvas se mantuvieron con fotoperiodo natural e intensidad lumínica de 500 – 1000 lux. La renovación diaria de los tanques se aumentó progresivamente desde el 100 %, en los primeros 10 días de cultivo, al 400% 40 dde. Se empleó agua filtrada a 1 µm y esterilizada con ultravioleta a más de 30 Julios cm⁻². La temperatura media de cultivo fue de 15,4 ± 1,1°C (media ± SD). El cultivo larvario se realizó en agua verde, añadiendo diariamente *Nannochloropsis sp.* a razón de 200000 células mL⁻¹. Las larvas se alimentaron con rotífero (*Brachionus plicatilis*) desde la apertura de la boca (2 dde) hasta 15 dde a una densidad de 10 presas / mL. *Artemia sp.* se introdujo 6 dde una densidad de 1 presa / mL, que se aumentó progresivamente hasta 4 presas / mL a 30 dde. Junto con el alimento vivo se suministró microencapsulado desde 15 hasta 30 dde, y pienso desde 30 dde. Para el estudio histológico, se tomaron muestras diariamente desde la eclosión hasta los 38 dde. Las muestras fueron convenientemente fijadas en formol al 4 % tamponado con fosfatos (0.1 M, pH 7.2) y procesadas para la inclusión en parafina y su posterior estudio histológico. Se llevaron a cabo cortes sagitales de 7 µm de grosor para la realización de técnicas histomorfológicas (Hematoxilina de Harris-Eosina/H-E y Hematoxilina-VOF de Gutiérrez/H-VOF) e histoquímicas (carbohidratos y proteínas).

Resultados

Las larvas de parracho presentan un crecimiento exponencial ($r^2 = 0.9161$) (Figura. 1). En la eclosión tienen una talla media de 3.80 ± 0.26 mm, y a los 38 dde alcanzan 16.22 ± 3.43 mm. La mayor mortalidad se produjo entre 9 y 20 dde (96 %), registrándose al final del período de estudio una mortalidad acumulada del 98 %.

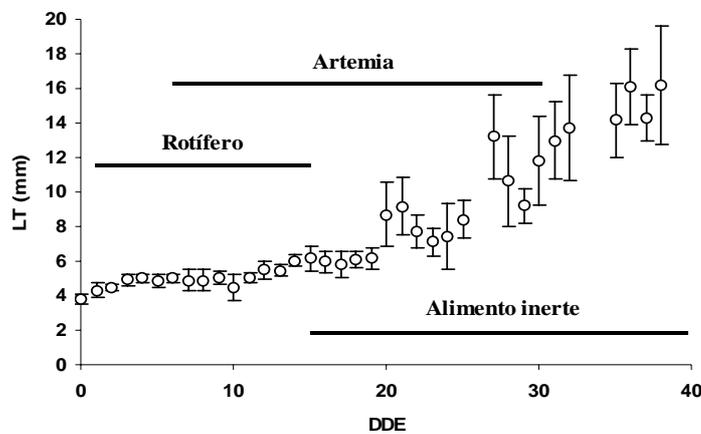


Figura 1. Crecimiento en longitud total (mm) de larvas de *Scophthalmus rhombus*. Los puntos representan media ± S.E.M. Se han marcado los principales eventos en la alimentación de las larvas.

Los principales eventos ontogénicos del sistema digestivo del parracho se describen a continuación y se muestran en la Figura 2: El *saco vitelino* en larvas recién eclosionadas y hasta el día 2 dde presenta una matriz homogénea acidófila rica en glicoconjugados neutros, glucógeno y proteínas ricas en tirosina, arginina, lisina, cisteína y cistina y una gota de grasa redondeada en posición ventro-caudal rodeadas por un epitelio escamoso (Figura. 2a). El 3 dde y a medida que el vitelo se va reabsorbiendo, la matriz vitelínica se vuelve heterogénea debido a un cambio en su estructura,

composición química y afinidad tintorial (Figura. 2b). La gota lipídica se va reabsorbiendo progresivamente, y a los 9 dde tanto el saco como la gota han desaparecido completamente. El *tracto digestivo* se presenta, en larvas recién eclosionadas, como un conducto rectilíneo e indiferenciado, en posición dorsal a saco vitelino, sin apertura bucal ni anal. Su epitelio posee células de diferentes alturas con núcleo basal. La vejiga urinaria se presenta conectada a la porción caudal del tracto digestivo. La válvula íleo-cecal se observa a los 2 dde y a los 4 dde se produce la apertura de la boca y ano y se evidencian las tres porciones intestinales: anterior, media y posterior. El *esófago* presenta un lumen relativamente estrecho y corto y a los 3 días muestra un epitelio pseudoestratificado desprovisto de células mucosas, las cuales se visualizan a los 4 días y se hacen muy numerosas a los 10 días. Estas células contienen proteínas ricas en cisteína y tirosina, así como mucosubstancias neutras y/o glucoconjugados ácidos. El *estómago* incipiente presenta forma de saco (Figura. 2e), con epitelio cúbico simple. Las primeras glándulas gástricas aparecen a los 23 dde (Figura. 2f) y su número y complejidad incrementa significativamente a los 38 dde. El *intestino anterior* presenta pliegues intestinales desde 1 dde que aumentan en número durante el desarrollo larvario. Su epitelio está constituido por una sola capa de células cilíndricas altas con núcleo basal y ribete en cepillo apical. Intercaladas entre estas células aparecen las células mucosas caliciformes a partir de los 12- 13 dde. La mucosa del *intestino medio* es similar a la del intestino anterior y presenta, a los 7-8 dde, signos de absorción lipídica. A partir del día 4 se observan inclusiones supranucleares en los enterocitos del *intestino posterior*, las cuales contienen sustancias acidófilas proteicas ricas en los aminoácidos tirosina y cisterna (Figura 2d). El esbozo del *hígado* se hace evidente en larvas de 1 dde formando un agrupado de células basófilas indiferenciadas. A los 2 dde, el citoplasma de los hepatocitos se muestra vacuolizado y el sistema sinusoidal es evidente (Figura. 2c). La *vesícula biliar* comienza a diferenciarse en el día 3 y está desarrollada a los 7 dde (Figura. 2b). El canal colédoco o conducto biliar principal se evidencia a los 3 dde. El *páncreas* aparece en forma de células indiferenciadas el 1 dde y desde su aparición hasta el final (38 dde) es extrahepático, organizándose en acinos de células prismáticas con citoplasma basófilo que contiene gránulos de zimógeno acidófilos. Los primeros islotes de Langerhans correspondientes al páncreas endocrino aparecen alrededor del 2 dde.

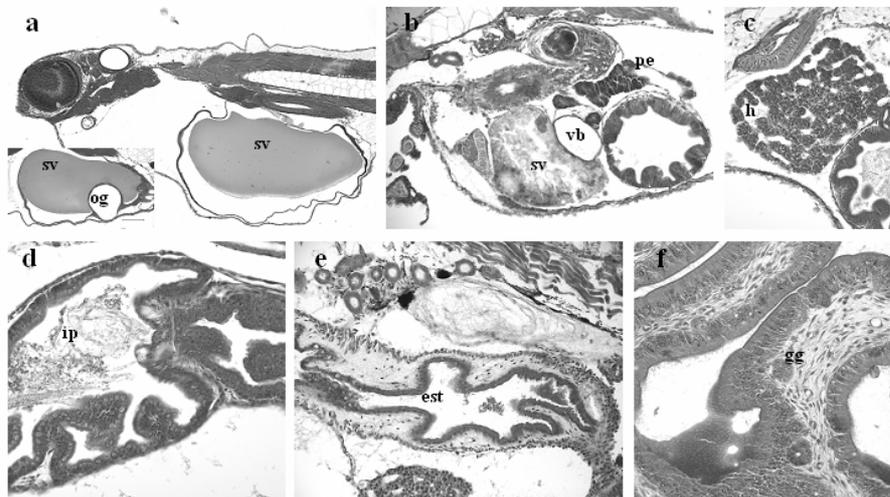


Figura 2. Microfotografías de larvas de *Scophthalmus rhombus* durante el desarrollo larvario: (a) saco vitelino (sv) y gota de grasa (og) en larvas recién eclosionadas (H&E x 400); (b) reabsorción del saco vitelino, y presencia de vesícula biliar (vb) y páncreas exocrino (pe) en larvas de 4 dde (H&E x 400); (c y d) desarrollo hepático (h) y presencia de inclusiones supranucleares proteicas en el intestino posterior de larvas de 8 dde (H&E x 1000); (e) incipiente estómago (est) a los 14 dde y (f) presencia de glándulas gástricas (gg) en la submucosa estomacal a los 28 dde (H&E x 1000).

Discusión

La organogénesis digestiva del parracho, *Scophthalmus rhombus* presenta un patrón similar al de otras especies de teleósteos en general y peces planos en particular (Zambonino *et al.*, 2007), con una localización común de los distintos órganos, así como características tisulares y celulares similares, siendo una de las principales diferencias, la variabilidad temporal inter-específica en la aparición y desarrollo de los distintos eventos ontogénicos en general y digestivos en particular. Estas diferencias pueden ser debidas a factores genéticos y zootécnicos o ambientales (tamaño y composición de vitelo, temperatura y tiempo de incubación, etc.) que afectan al desarrollo larvario. Entre las características notables destaca la aparición de glándulas gástricas alrededor de los 23 dde, mientras que en otras especies su desarrollo es temprano o posterior. En otro pleuronectiforme como el lenguado senegalés, *S. senegalensis* aparecen a los 27 dde, mientras que en espáridos como la hurta, *Pagrus auriga* y sargo, *Diplodus sargus* aparecen antes (16 y 22 dde respectivamente) y después de los 40 dde en la dorada, *Sparus aurata* (Sarasquete *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 1999; Sanchez-Amaya *et al.*, 2006; Darías *et al.*, 2007; Zambonino *et al.*, 2007).

Como conclusión, la organogénesis digestiva del parracho, *Scophthalmus rhombus* está concentrada especialmente durante el primer mes de vida, exhibiendo un incremento de tamaño y complejidad estructural de los distintos órganos, a partir de este periodo. Esta especie presenta un desarrollo ontogénico similar al de otros pleuronéctidos, con diferencias temporales en la aparición, desarrollo y funcionalidad de los distintos órganos y tejidos, lo cual debería ser tenido en cuenta a la hora de diseñar dietas adecuadas y compatibles con el grado de maduración orgánica y tisular, y poder cubrir así los requerimientos nutritivos necesarios, acordes con la fisiología digestiva de la especie, para conseguir un adecuado desarrollo y óptimo crecimiento larvario y juvenil.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos DIVERAQUA y REDAQUAb del IFAPA (Interreg IIIA: SP5.E36 y SP5.E27/02) y parcialmente por el CSIC (AGL2005-02478 y AGL2006-13777-CO3-O2/ACU). Los autores agradecen a J.F. Ferrer, J.M. Márquez y M. Rosano de DAP S.A, y a A. Rodiles y A. Naranjo del IFAPA-Agua del Pino-, por su inestimable ayuda. Gracias especiales a I. Viaña del ICMAN.CSIC por su valiosa asistencia técnica.

Bibliografía

- Darias, M.J., J.B. Ortiz Delgado, C. Sarasquete, M. Martínez Rodríguez y M. Yúfera. 2007. Larval organogenesis of *Pagrus pagrus* L., 1758 with special attention to the digestive system development. *Histol. Histopathol.* 22: 753-758.
- Herrera, M., I. Hachero, M.A. Prado, J.M. Marquez y J.I. Navas. 2005. Resultados preliminares sobre aclimatación y mantenimiento en cautividad de reproductores de lenguado (*Solea senegalensis*), parracho (*Scophthalmus rhombus*) y acedía (*Dicologlossa cuneata*). IX Congreso Nacional Acuicultura, 291
- Ribeiro, L., C. Sarasquete y M.T. Dinis. (1999). Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture*, 171: 291-306.
- Sarasquete, M.C., A. Polo y M. Yúfera. 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 130: 79– 92.
- Sanchez Amaya, M.I., J.B. Ortiz Delgado, A. Garcia López, S. Cardenas y C. Sarasquete. 2006. Larval ontogeny of redbanded seabream *Pagrus auriga* Valenciennes, 1843 with special reference to the digestive system. A histological and histochemical approach. *Aquaculture*, 263: 259-279.
- Zambonino, J.L. E. Gisbert, C. Sarasquete, I. Navarro, J. Gutiérrez y C.L. Cahu. 2007. En: Feeding and Digestive Functions of Fish. J.E.O. Cyrino, D. Bureau y B.G. Kapoor (eds). Science Publishers, Inc, Enfield, USA (in press).