

NOTA CIENTÍFICA

Desarrollo osteológico de la columna vertebral, complejo caudal y aletas medias del botete diana *Sphoeroides annulatus* (Tetraodontiformes: Tetraodontidae)

Osteological development of the vertebral column, caudal complex and median fins of the puffer fish *Sphoeroides annulatus* (Tetraodontiformes: Tetraodontidae)

L. Estela Rodríguez-Ibarra^{1*}, María Isabel Abdo-de la Parra¹, Leonardo Ibarra-Castro¹, Juan Manuel Martínez-Brown¹, Gabriela Velasco-Blanco¹ y Gabriela Aguilar-Zárte¹

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Mazatlán, Av. Sábalo Cerritos S.N., C.P. 82112, Mazatlán, Sinaloa, México

*Autor correspondiente: eibarra@ciad.mx

Abstract.- Osteological development of the vertebral column, caudal complex and median fins in larvae of the bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus*, were studied using specimens cleared and double stained for bone and cartilage. The first cartilaginous structures appeared 10 days (4.2 mm NL) after hatching and by day 28 (14.9 mm TL) most of the bone elements had already formed. *Sphoeroides annulatus* exhibited fusion of bone elements, the same as other Tetraodontiformes, one of the most evolved teleosts.

Key words: Osteology, larvae, Tetraodontidae, ontogeny

INTRODUCCIÓN

El botete diana *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842), pertenece al orden Tetraodontiformes el cual agrupa 435 especies (Nelson *et al.* 2016) que habitan la mayoría en ecosistemas marinos y algunas penetran aguas salobres y dulceacuícolas. En la región Noroeste del Pacífico mexicano, esta especie es un importante recurso pesquero, con un alto valor comercial (Komar *et al.* 2004, Chávez-Sánchez *et al.* 2008, García-Ortega 2009, Abdo-de la Parra *et al.* 2010, 2013).

Existe considerable información sobre la taxonomía y evolución de este orden, la mayoría proveniente de estudios con organismos adultos, ya que presentan una estructura osteológica inusual y diversa por su avanzada evolución dentro de los teleósteos (Tyler 1980, Brainerd & Patek 1998, Santini & Tyler 2003, Amores *et al.* 2004, Holcroft 2005, Alfaro *et al.* 2007, Yamanoue *et al.* 2007, Santini *et al.* 2013, Matsuura 2015). Sin embargo, se conoce menos respecto de las fases larvales (Fujita 1992, Britz & Johnson 2005, Konstantidinis & Johnson 2012).

Dada la importancia comercial de la especie *S. annulatus*, resulta relevante el obtener información sobre los aspectos morfológicos del desarrollo osteológico de sus estructuras, para poder detectar la incidencia de malformaciones que se puedan presentar bajo condiciones de cultivo (Gavaia *et al.* 2002, Çoban *et al.* 2009, Hernández *et al.* 2012). Por lo tanto, el presente trabajo

tuvo como objetivo describir el desarrollo de los elementos que conforman la columna vertebral, el complejo caudal y las aletas medias de *S. annulatus* durante la etapa larval, para generar una herramienta de referencia de apoyo en el cultivo de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las larvas de *S. annulatus* provinieron del desarrollo de huevos obtenidos por fertilización artificial de gametos de una pareja de reproductores en cautiverio, pertenecientes al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), en la unidad Mazatlán. El cultivo larvario se llevó a cabo en condiciones de 28,7 °C, 33,4 de salinidad y 6,5 mg L⁻¹ O₂ siguiendo los protocolos establecidos por Abdo-de la Parra *et al.* (2010) y Rodríguez-Ibarra *et al.* (2013). Diariamente se tomó un tamaño de muestra promedio de ejemplares de 13,5 (±1,4) desde el primer día hasta el día 28 después de la eclosión (DE). Los ejemplares se sacrificaron con una sobredosis del anestésico 2-fenoxietanol (Sigma Aldrich) y en cada uno se registró la longitud notocordal (LN) y la longitud estándar (LE) de acuerdo a su fase de flexión del notocordio (Kendall *et al.* 1984). Las larvas recién eclosionadas y del día 2 se midieron bajo el microscopio utilizando el objetivo 4X adaptado con un micrómetro ocular, y a partir del tercer día se utilizó un vernier digital (resolución de 0,01 ± 0,03 mm) para medir los ejemplares.

Los especímenes se fijaron en formaldehído al 10%, en buffer fosfato, y posteriormente se procesaron con la técnica de diafanización y tinción diferencial para cartílago (azul alcían) y hueso (rojo de alizarina), descrita por Potthoff (1984) con algunas modificaciones. Una vez transparentados, los ejemplares fueron examinados para determinar el estadio de desarrollo y morfología de sus estructuras cartilagineas y óseas, a través de un microscopio estereoscópico (Olympus® SZ) equipado con una cámara (Olympus® SP-350), con la que se tomaron fotos para hacer la descripción. La nomenclatura utilizada para describir los elementos osteológicos fue de acuerdo a Fujita (1992), Koumoundouros *et al.* (1997, 1999), Gavaia *et al.* (2002), Gállego (2008), Laggis *et al.* (2010) y Konstantinidis & Johnson (2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DESARROLLO DE LAS ESTRUCTURAS DE LA COLUMNA VERTEBRAL, DEL COMPLEJO CAUDAL Y ALETAS MEDIAS DURANTE EL CULTIVO LARVARIO

Se utilizaron 380 especímenes desde 1,7 mm de longitud notocordal (LN) hasta 15,8 mm de longitud total (LT); esta última corresponde a la longitud alcanzada a los 28 días después de la eclosión (DDE). Al eclosionar, las larvas de *S. annulatus* no presentaron ninguna estructura cartilaginosa (Fig. 1A). A los 10 DDE los ejemplares midieron 4,2 mm LN en promedio, se observaron 6 arcos neurales (An), mostrando mayor osificación los tres 3 más anteriores. También se han desarrollado 4 pterigióforos dorsales proximales (Pdp) y 2 pterigióforos anales proximales (Pap), los cuales se distinguen como barras cartilagineas finas. El primero de

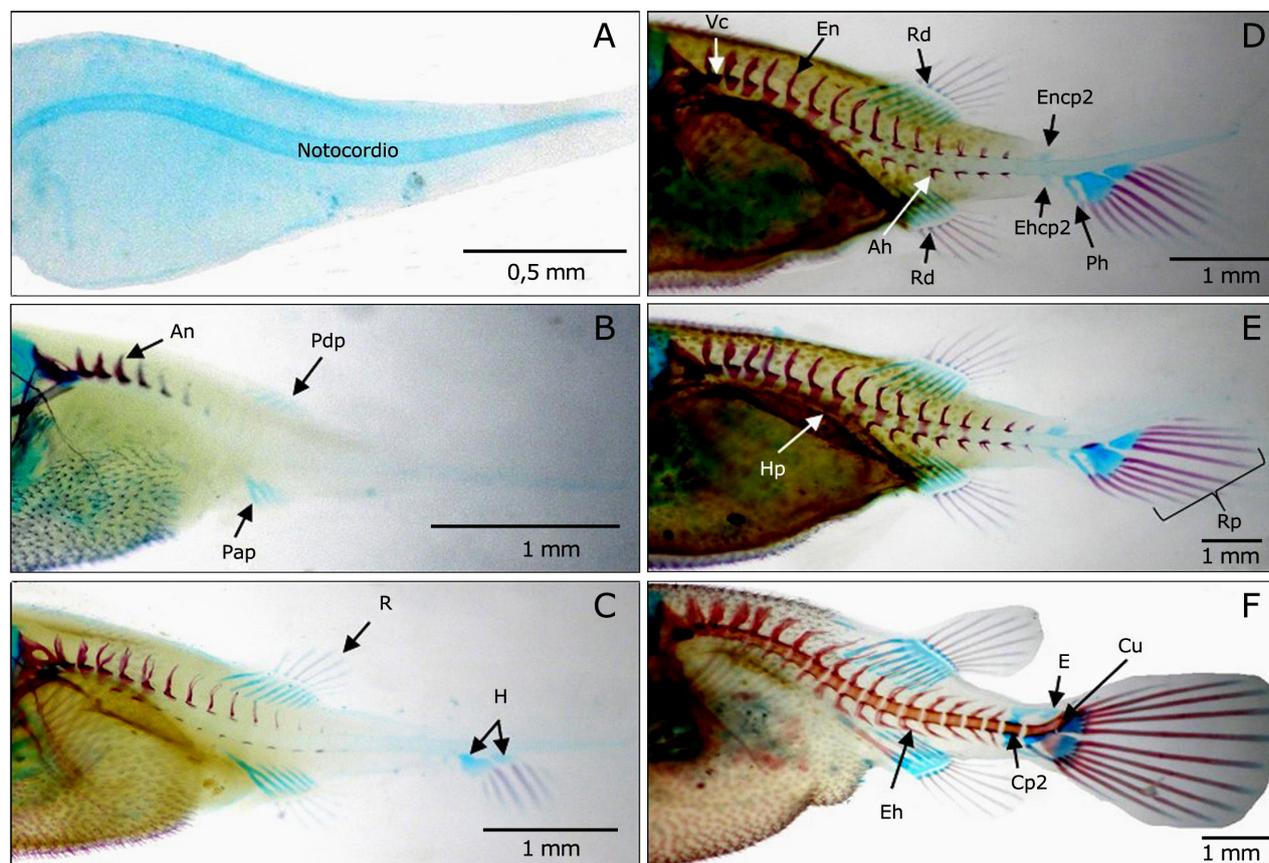


Figura 1. Diferentes etapas de desarrollo de la columna vertebral, complejo caudal y aletas medias de *Sphaeroides annulatus*. A) 1,7 mm LN, B) 4,2 mm LN, C) 6,5 mm LN, D) 9,3 mm LN, E) 11,6 mm LN y F) 14,9 mm LE (la simbología se explica en el texto) / Different development stages of the vertebral column, caudal complex and median fins of *Sphaeroides annulatus*. A) 1.7 mm NL, B) 4.2 mm NL, C) 6.5 mm NL, D) 9.3 mm NL, E) 11.6 mm TL and F) 14.9 mm SL (the symbology is explained in the text)

los Pap se bifurca desde la mitad de su longitud hacia su parte distal, es más grande al resto de los pterigióforos, los cuales disminuyen su tamaño progresivamente hacia la zona caudal (Fig. 1B). De acuerdo con el trabajo de Fujita (1992) en larvas de *Takifugu niphobles* y de Britz & Johnson (2005) en larvas de *Monotrete leirus*, reportan que las primeras estructuras esqueléticas se observaron a una LN de 2,9 y de 3,8 mm respectivamente, mientras que en *S. annulatus* fue hasta los 4,2 mm de LN.

En el día 14 después de la eclosión (DE), el notocordio se encuentra en fase de preflexión con un tamaño promedio de 6,5 mm LN, se observaron 13 arcos neurales (An) osificados, con un desarrollo progresivo en sentido céfalo caudal; los 5 más distales se aprecian poco desarrollados. Asimismo, se detectó la presencia de 8 Pdp y de todos los Pap (5), ambos en estadio cartilaginoso y 7 de los 8 radios (R) de la aleta dorsal y 5 de los 11 radios principales (Rp) de la aleta caudal. También se observaron las dos placas hipurales (H) en fase cartilaginosa (Fig. 1C). A los 19 DDE, con una longitud promedio de 9,3 mm LN, el notocordio se encuentra en fase de flexión (Fig. 1D). Se observó osificación en 6 vértebras centrales (Vc), en 7 arcos hemales (Ah) y en 15 An, siendo muy pequeños los 3 últimos. Se observaron los radios distales (Rd), estructuras cartilagosas de forma esférica, tanto en la aleta dorsal como en la anal. El desarrollo de los 9 Pdp, los 7 R anales y 5 R del H1 y 4 del H2 se ha completado. También se observó la presencia de estructuras aún en forma cartilaginosa que formarán parte del esqueleto caudal, como son la espina neural del centro preural 2 (Encp2), la espina hemal del centro preural 2 (Ehcp2) y el parahipural (Ph). Estas estructuras del complejo caudal son

descritas por Fujita (1992) y Britz & Johnson (2005) en *T. niphobles* y *M. leirus*, pero a un tamaño de larva mucho menor que en *S. annulatus* (Fig. 1D).

En el día 24 DE, se registró en los ejemplares una LN promedio de 11,6 mm y el notocordio aún en estado de flexión. Se observó osificación en los 16 An, 8 hemapófisis (Hp), 8 Ah y los 11 Rp. Los 2 H y el Ph aún se encuentran en estado cartilaginoso (Fig. 1E). A los 28 DDE los organismos tuvieron una talla promedio de 14,9 mm LE (Fig. 1F) y el notocordio en fase de posflexión. Se observó la presencia del centro preural 2 (Cp2), el centro ural (Cu), las 8 espinas hemales (Eh), las 16 espinas neurales (En) y el epural (E), el cual se encuentra libre a diferencia del Ph que está adherido a Cu y a H1. El epural es el último elemento que aparece en el complejo caudal al igual que especies como *Monotrete suvattii* (Konstantinidis & Johnson 2012). A esta talla la mayoría de las estructuras de la columna vertebral y del complejo caudal de *S. annulatus* ya se encuentran osificadas con excepción de Pdp, Pap, Rd, H2, Encp2, Ehcp2, E y parte de H1.

La columna vertebral de las larvas de *S. annulatus* se divide en dos regiones, la abdominal con 8 vértebras y la caudal con 10, incluido el centro ural. Cada vértebra abdominal está equipada con un arco y espina neural y las 5 más anteriores poseen hemapófisis en su parte ventral (Fig. 2). De acuerdo a lo reportado por Watson (1996) en relación con el número de vértebras totales de la familia Tetraodontidae, *S. annulatus* se encuentra dentro del intervalo (17 a 19). Asimismo, las vértebras caudales poseen arcos y espinas neurales y ventrales, a

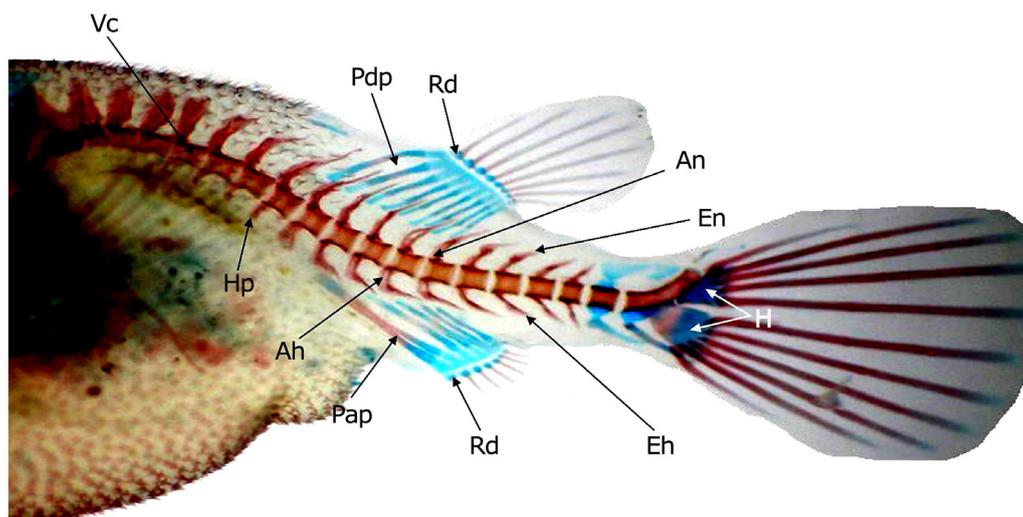


Figura 2. Estructuras osteológicas que componen la columna vertebral, complejo caudal y aletas medias de *S. annulatus* (la simbología se explica en el texto) / Osteological structures forming vertebral column, caudal complex and median fins of *S. annulatus* (the symbology is explained in the text)

excepción del complejo caudal que está constituido por los elementos esqueléticos antes mencionados y que se muestran en la Figura 3. El bajo número de vértebras que presentan los Tetraodontiformes en comparación con otras especies, es una característica primitiva de este grupo, así como la fusión de los hipurales que se consolidaron por un proceso evolutivo en dos placas en especies de la familia Tetraodontidae, o bien como en la Diodontidae que solo tienen una placa hipural o Molidae que simplemente no existe ningún hueso hipural (Tyler 1970, 1980; Johnson & Britz 2005, Konstantidinis & Johnson 2012).

Por tanto, se concluye que, el conocimiento del desarrollo osteológico de la columna vertebral, del complejo caudal y aletas medias de las larvas de *S. annulatus*, es una herramienta útil para el estudio de los procesos detallados de la ontogenia de la especie y los resultados aportan información básica para futuros estudios en nutrición y larvicultura, para evaluar posibles factores que puedan incidir sobre desarrollo de los organismos.

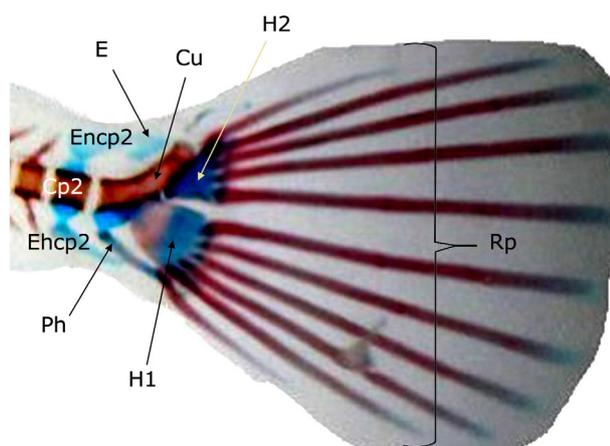


Figura 3. Complejo caudal de *S. annulatus* (la simbología se explica en el texto) / Caudal complex of *S. annulatus* (the symbology is explained in the text)

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a V. Williams de Calvario por la traducción del resumen y la asistencia técnica del personal de la planta piloto de peces marinos.

LITERATURA CITADA

- Abdo-de la Parra MI, A García-Ortega, I Martínez-Rodríguez, B González-Rodríguez, G Velasco-Blanco, C Hernández & N Duncan. 2010.** An intensive hatchery rearing protocol for larvae of the bullseye puffer, *Sphoeroides annulatus* (Jenyns). *Aquaculture Research* 41(10): 554-560.
- Abdo-de la Parra MI, LE Rodríguez-Ibarra, N García-Aguilar, G Velasco- Blanco & L Ibarra-Castro. 2013.** Biotecnología para la producción masiva de juveniles del botete diana *Sphoeroides annulatus*: inducción hormonal y cultivo larvario. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 48(3): 409-420.
- Alfaro ME, F Santini & CD Brock. 2007.** Do reefs drive diversification in marine teleosts? Evidence from the pufferfish and their allies (Order Tetraodontiformes). *Evolution* 61(9): 2104-2126.
- Amores A, T Suzuki, Y-L Yan, J Pomeroy, A Singer, C Amemiya & JH Postlethwait. 2004.** Developmental roles of pufferfish *hox* clusters and genome evolution in ray-fin fish. *Genome Research* 14(1): 1-10.
- Brainerd EL & SN Patek. 1998.** Vertebral column morphology, C-start curvature, and the evolution of mechanical defenses in Tetraodontiform fishes. *Copeia* 4: 971-984.
- Britz R & GD Johnson. 2005.** Leis' conundrum: Homology of the clavus of the ocean sunfishes. 1. Ontogeny of the median fins and axial skeleton of *Monotretus leurus* (Teleostei, Tetraodontiformes, Tetraodontidae). *Journal of Morphology* 266(1): 1-10.
- Chávez-Sánchez MC, LS Álvarez-Lajonchère, MI Abdo-de la Parra & N García-Aguilar. 2008.** Advances in the culture of the Mexican bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*, Jenyns (1842). *Aquaculture Research* 39: 718-730.
- Çoban D, C Suzer, HO Kamaci, Ş Saka & K Firat. 2009.** Early osteological development of the fins in the hatchery-reared red porgy, *Pagrus pagrus* (L. 1758). *Journal of Applied Ichthyology* 25: 26-32.
- Fujita K. 1992.** Development of the caudal skeleton in the tetraodontid fish, *Takifugu niphobles*. *Japanese Journal of Ichthyology* 38(4): 438-440.
- Gállego L. 2008.** Los cordados. Funciones de control voluntario, 303 pp. Fundación Laboratorio de Biología Animal, Vigo.
- García-Ortega A. 2009.** Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) and bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), new species for marine aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry* 35(1): 69-80.
- Gavaia PJ, MT Dinis & ML Cancela. 2002.** Osteological development and abnormalities of vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 211: 305-323.

- Hernández DR, JR Casciotta, JJ Santinón, S Sánchez & HA Domitrovic. 2012.** Desarrollo ontogénico de la columna vertebral y del esqueleto caudal en larvas de *Rhamdia quelen* en condiciones de larvicultura intensiva. *International Journal of Morphology* 30(4): 1520-1525.
- Holcroft NI. 2005.** A molecular analysis of the interrelationships of tetraodontiform fishes (Acanthomorpha: Tetraodontiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 525-544.
- Johnson GD & R Britz. 2005.** Leis' conundrum: Homology of the clavus of the ocean sunfishes. 2. Ontogeny of the median fins and axial skeleton of *Ranzania laevis* (Teleostei, Tetraodontiformes, Molidae). *Journal of Morphology* 266(1): 11-21.
- Kendall AW, EH Ahlstrom & HG Moser. 1984.** Early life history stages of fishes and their characters. In: Moser HG, WJ Richards, DM Cohen, MP Fahay, AW Kendall & SL Richardson (eds). *Ontogeny and systematics of fishes*, pp. 11-22. American Society of Ichthyologists and Herpetologists / Allen Press, Lawrence.
- Komar C, JF Turnbull, A Roque, E Fajer & NJ Duncan. 2004.** Effect of water treatment and aeration on the percentage hatch of demersal, adhesive eggs of the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*). *Aquaculture* 229: 147-158.
- Konstantinidis P & D Johnson. 2012.** A comparative ontogenetic study of the tetraodontiform caudal complex. *Acta Zoologica* 93(1): 98-114.
- Koumoundouros G, F Gagliardi, P Divanach, C Boglione, S Cataudella & M Kentouri. 1997.** Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture* 149: 215-226.
- Koumoundouros G, P Divanach & M Kentouri. 1999.** Osteological development of the vertebral column and of the caudal complex in *Dentex dentex*. *Journal of Fish Biology* 54: 424-436.
- Laggis A, DG Sfakianakis, P Divanach & M Kentouri. 2010.** Ontogeny of the body skeleton in *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *Italian Journal of Zoology* 77(3): 303-315.
- Matsuura K. 2015.** Taxonomy and systematics of tetraodontiform fishes: a review focusing primarily on progress in the period from 1980 to 2014. *Ichthyological Research* 62(1): 72-113.
- Nelson JS, TC Grande & VH Wilson. 2016.** *Fishes of the world*, 707 pp. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Potthoff T. 1984.** Clearing and staining techniques. In: Moser HG, WJ Richards, DM Cohen, MP Fahay, AW Kendall Jr & SL Richardson (eds). *Ontogeny and systematics of fishes*, Special Publication 1: 35-37. American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Allen Press, Lawrence.
- Rodríguez-Ibarra LE, MI Abdo-de la Parra, G Velasco-Blanco, BT González-Rodríguez, VP Domínguez-Jiménez, N García-Aguilar & L Ibarra-Castro. 2013.** Efecto de la eliminación de la capa adherente de los huevos utilizando enzima proteolítica proteasa y jugo de piña en la larvicultura del botete diana *Sphoeroides annulatus*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 48(2): 379-385.
- Santini F & JC Tyler. 2003.** A phylogeny of the families of fossil and extant tetraodontiform fishes (Acanthomorpha, Tetraodontiformes), Upper Cretaceous to Recent. *Zoological Journal of the Linnean Society* 139: 565-617.
- Santini F, L Sorenson & ME Alfaro. 2013.** A new phylogeny of tetraodontiform fishes (Tetraodontiformes, Acanthomorpha) based on 22 loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 177-187.
- Tyler JC. 1970.** The progressive reduction in number of elements supporting the caudal fin of fishes and of the order Plectognathi. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 122(1): 1-85.
- Tyler JC. 1980.** Osteology, phylogeny, and higher classification of the fishes of the order Plectognathi (Tetraodontiformes). NOAA Technical Report NMFS Circular 434: 1-422.
- Watson W. 1996.** Tetraodontiformes. In Moser HG (ed). *The early stages of fishes in the California Current Region*. CalCOFI Atlas 33: 1415-1439. Allen Press, Lawrence.
- Yamanoue Y, M Miya, K Matsuura, N Yagishita, K Mabuchi, H Sakai, M Katoh & M Nishida. 2007.** Phylogenetic position of tetraodontiform fishes within the higher teleosts: Bayesian inferences based on 44 whole mitochondrial genome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 89-101.

Recibido el 14 de febrero de 2019 y aceptado el 21 de agosto de 2019

Editor Asociado: Mauricio Landaeta D.