

## Estudio de los ritmos de espermiación en machos de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) en cautividad

R.M. Cal (1), J.B. Peleteiro (1), M. Olmedo (1), M.C. Ferreirós (2) y C. Gómez (1).

(1) Instituto Español de Oceanografía C.O. de Vigo. Cabo Estay, Canido. Apdo.1552, Vigo. 36080 Pontevedra.

(2) Servicio Galego de Saúde, Hospital do Meixoeiro.Serv. Análisis Clínicos .Meixoeiro s/n., Vigo. 36200 Pontevedra.

**RESUMEN:** Se llevó a cabo un estudio de los ritmos de espermiación con 14 machos de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) sometidos a fotoperíodo natural y temperatura controlada de  $14\pm 1^\circ\text{C}$ . Se establecieron dos grupos A y B de siete machos cada uno escogidos al azar. Al grupo A, se le extrajo el esperma diariamente durante los 10 días que duró la experiencia y al grupo B, considerado como control, se le extrajo el esperma solamente los días primero y último de la experiencia. Con el esperma extraído a los machos del grupo A, se determinó el volumen en una escala de 0 a 3 (entre 0 y  $>1\text{ml}$ ), la viscosidad en una escala de 1 a 2, la concentración cuyos valores oscilaron entre  $320/12800\times 10^6$  esp./ml, la movilidad de 0 a 5 según la escala de Sánchez- Rodríguez (1975) y el pH cuyos valores oscilaron entre 6.9 y 7.5. Los días primero y último de la experiencia, además de los parámetros citados anteriormente, se determinaron en todos los machos de los dos grupos (A y B), la presión osmótica, la concentración de proteínas, la glucosa, el colesterol, los triglicéridos, LDH y los iones:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . Se compararon los resultados obtenidos entre los días primero y último y no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) y la comparación de los datos finales entre ambos grupos tampoco mostró diferencias significativas ( $P>0.05$ ), excepto en la movilidad ( $P<0.05$ ).

**Palabras clave:** Rodaballo, *Scophthalmus maximus*, esperma, espermatozoa, fluido seminal.

**Abstract:** Study of the sperming cycles in male turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in captivity:

A study was performed on sperming cycles in 14 turbot males (*Scophthalmus maximus* L.) subjected to a natural photoperiod and a controlled temperature of  $14\pm 1^\circ\text{C}$ . Two groups (A and B) were formed with seven males, chosen at random, in each. Sperm was extracted daily from males in group A throughout the 10 days of the experience. Sperm was extracted from males in Group B, considered as the control group, only on the first and last days of the experience. Sperm was extracted from males in group A was used to determine the volume in a scale ranging from 0 to 3 (between 0 and  $>1\text{ml}$ ), viscosity in a scale of 1 to 2, concentration with values ranging between  $320/12800\times 10^6$  esp./ml, mobility from 0 to 5 according to the scale by Sánchez-Rodríguez (1975) and pH values ranging between 6.9 and 7.5. The first and last days of the experience, apart from the parameters cited above, were determined in all males in the two groups (A and B), osmotic pressure, concentration of proteins, glucose, cholesterol, triglycerids, LDH and ions:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^+$  and  $\text{Mg}^{++}$ . Results of concentration, volume, viscosity and mobility obtained, on the first and last days were compared and no significant differences were observed ( $P>0.05$ ). When final results from the two groups were compared, no significant differences were found again ( $P>0.05$ ), except in mobility ( $P<0.05$ ).

**Key words:** Turbot, *Scophthalmus maximus*, sperm, spermatozoids, seminal fluid.

## INTRODUCCIÓN

El éxito de producción en el cultivo intensivo de peces se basa en una adecuada gestión del stock de reproductores. En especies como el rodaballo, donde la manipulación y el marcado de los ejemplares no presenta problemas, es posible conocer el comportamiento individual de los peces.

Hasta hace poco tiempo se ha prestado poca atención a la gestión del esperma en peces de cultivo, a pesar de que la disponibilidad de esperma de buena calidad y cantidad en el momento adecuado puede determinar el éxito de la reproducción en una planta de cultivos.

Se ha podido observar que la tasa de fertilización en rodaballo es muy variable (Ownes et al.,

1991; Peleteiro et al., 1993), debido tanto a las condiciones en que se realiza la fecundación como a la calidad de los gametos.

La calidad del espermatozoide normalmente se determina en función de la concentración y la movilidad de los espermatozoides y es muy variable entre especies, entre peces de la misma especie e incluso entre extracciones realizadas al mismo pez.

Uno de los factores que modifican tanto la calidad como la cantidad del espermatozoide, es la frecuencia de extracción (Suquet et al., 1992). Es de gran importancia conocer el ritmo de espermiación de los reproductores para poder determinar la frecuencia de extracción idónea y así trabajar con cierta garantía de éxito en la fecundación.

El objetivo de esta experiencia fue determinar la frecuencia de extracción óptima de espermatozoide de rodaballo en época de puesta, por medio del control de determinados parámetros que son considerados habitualmente como indicadores de calidad del mismo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los peces utilizados en esta experiencia se estabularon en un tanque de hormigón de 25m<sup>3</sup> recubierto interiormente con poliéster, iluminado con luz natural y temperatura del agua controlada (14±1°C). El stock de reproductores estaba formado por 12 hembras además de los 14 machos objeto del estudio cuyos pesos de encontraban entre 3.5 y 7.8 kg.

Los reproductores estaban marcados con nitrógeno líquido (Forés et al., 1991) por lo que podían ser reconocidos individualmente. De esta forma se realizaron dos lotes: el lote A (n=7) al que se le extrajo espermatozoide todos los días de la experiencia y el lote B (n=7), utilizado como control al que se le realizó una extracción el primer día de la experiencia (día 1) y el último (día 10).

La extracción de espermatozoide se realizó por presión abdominal, succionando el espermatozoide fluyente con una jeringa de 1ml desprovista de aguja, procurando evitar la contaminación con orina y agua de mar. Cada muestra se separó en tres fracciones: la primera diluida en formol al 1% tamponado (Chereguini et al., 1992), fué utilizada para determinar la concentración de espermatozoides, la segunda diluida en Ringer 200 (Chereguini et al., en prensa) para determinar la movilidad de los espermatozoides y la tercera que se centrifugó en frío a 12000 rpm durante 5 minutos, con el fin de separar el fluido seminal. Éste se utilizó para medir el pH y la presión osmótica. Después se congeló a -80°C para su análisis posterior.

Los parámetros determinados los días 1 y 10 de la experiencia en ambos grupos de peces fueron:

- Volumen y viscosidad
- Concentración
- Movilidad
- pH
- Presión osmótica
- Concentración de proteínas
- Glucosa
- Colesterol y triglicéridos
- LDH
- Iones : Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>.

Además con las muestras de espermatozoide recogidas de los machos del lote A, se realizó la determinación de los cuatro primeros parámetros cada día de la experiencia.

Para determinar el volumen de la muestra se utilizó una escala de 0 a 3 para indicar intervalos desde 0 a 1 ml (1 < 0.5 ml, 2 > 0.5 ml y 3 ≥ 1 ml).

En el caso de la viscosidad cada muestra se definió como no viscosa (1) o como viscosa (2). La concentración de espermatozoides expresada como nº de esp./ml, se determinó realizando los recuentos en una cámara de Thoma.

La movilidad referida al porcentaje de espermatozoides móviles, se determinó según la escala de Sánchez-Rodríguez (1975), después de haber reactivado los espermatozoides con agua del mar.

La medida del pH se realizó con un pH-metro marca CRISON, MicropH 2001.

La presión osmótica se determinó por punto de congelación en un osmómetro 3MO; la concentración de proteínas por el método de rojo de pirogalol-molibdato; la glucosa por la técnica de la hexoquinasa, el colesterol y los triglicéridos por métodos enzimáticos; la LDH por lactato-piruvato; y los iones por potenciometría directa (ISE).

La comparación de las medias de los datos obtenidos, se analizó por medio de una t de Student.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1, se representan los resultados de la concentración de espermatozoides en rodaballo en extracciones realizadas durante 10 días consecutivos en el grupo A.

La concentración de espermatozoides en esperma de rodaballo es muy variable entre peces. Los valores oscilaron entre  $3200-12800 \times 10^6$  esp./ml, excepto el macho nº5 cuya concentración durante toda la experiencia se mantuvo entre  $320-1120 \times 10^6$  esp / ml. con abundante presencia de células inmaduras. En general a lo largo de los 10 días, todos los peces de éste grupo, muestran una pauta semejante: mantienen la concentración de espermatozoides durante 4 o 5 días presentando valores muy bajos al día siguiente, para posteriormente mostrar una tendencia clara de recuperación.

Durante toda la experiencia la presencia de células inmaduras fué nula o menor del 5%, y en ningún caso se pudo establecer relación con ningún otro parámetro, excepto en el macho nº5 en que la presencia de éstas células fué constante y desde el 15 al 60%.

Aunque aparentemente los valores de concentración de espermatozoides en los peces del grupo A son mas bajos al final que al inicio de la experiencia, sin embargo analizando los datos se observa que no existen diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

En la figura 2, se puede observar la evolución de los valores medios de la concentración de espermatozoides, el volumen, la movilidad y el pH en esperma de rodaballo extraído a lo largo de 10 los días consecutivos. Comparando los resultados, no se ha encontrado correlación entre ninguno de estos parámetros.

El volumen medio durante los diez días, se sitúa entre 0.5 y 1.0 ml. Las referencias de valores de volumen encontradas en la bibliografía, sitúan el volumen de esperma de rodaballo entre 0.2 y 2.2 ml. (Suquet et al., 1994). El volumen en especies oligospermicas como el rodaballo, no es fácil de determinar, ya que en la práctica sólo una parte de la producción de esperma puede ser recogido y una excesiva presión sobre la parte abdominal del pez, puede producirle lesiones graves.

Los valores de movilidad estuvieron entre el 40 y 60 % de espermatozoides móviles los que parecen valores bajos comparados con los reportados por Suquet et al., 1994. La movilidad, es un parámetro bastante conflictivo ya que la determinación al microscopio óptico es bastante subjetivo.

Los valores del pH se encontraron entre 6.9 y 7.5. La movilidad y el pH se correlacionan en un 77%. Valores del pH ligeramente bajos se corresponden con una movilidad baja en muchas especies de peces y también en el rodaballo (Suquet et al., 1992).

En la tabla I, se pueden observar los valores medios obtenidos en los muestreos inicial (n=14) y final en ambos grupos de peces A (n=7) y B (n=7). En general se observa una gran variación en los valores de la mayoría de los parámetros considerados.

Los valores de concentración, movilidad y volumen, están de acuerdo con los rangos aportados por Suquet et al. (1994). Se compararon los valores de cada uno de estos tres parámetros del primer día de la experiencia con los del último día y no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

Cuando se analizaron los valores medios finales de volumen y concentración de espermatozoides entre los dos grupos de peces A y B, no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Sin embargo en el análisis de los valores de movilidad de ambos grupos, se mostraron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

El fluido seminal es una solución bioquímica compleja, cuya principal función es actuar de soporte para los espermatozoides, aportándoles nutrientes y estabilizadores que eviten su activación prematura. Este fluido en el rodaballo, representa el 60% del total del volumen del esperma (Suquet et al., 1994). La composición del fluido seminal en el rodaballo, ha sido dada a conocer por Suquet et al., (1993).

Se puede observar que tanto la presión osmótica como el pH, presentan valores medios muy regulares, sin embargo los valores de los componentes orgánicos como la concentración de proteínas (864/2350 mg/dl), la glucosa (2/19 mg/dl), los triglicéridos (30/88 mg/dl) y el colesterol (17/112 mg/dl), son muy variables.

Observando los datos del principio y del final de la experiencia, los valores de la concentración de proteínas disminuye tanto en el grupo A como en el grupo B, sin embargo los valores de glucosa se incrementan.

En cuanto a la composición iónica, observando los valores medios del primero y último día, la concentración tanto de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  disminuyen ligeramente, el  $\text{Cl}^-$  se mantiene y el calcio aumenta considerablemente. Los datos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  son similares a los aportados por Suquet et al. (1993).

## BIBLIOGRAFIA

- Chereguini, O., C. Fernández-Pato, I. Rasines. 1992. Adaptación de la técnica de crioconservación de esperma para el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y besugo (*Pagellus bogaraveo*). Inf. Téc. Ins. Esp. Oceanogr. n° 117.
- Chereguini, O., R.M. Cal., C. Dreanno, B. Ogier de Baulny, M. Suquet, and G. Maisse. 1997 Short term storage and cryopreservation of turbot sperm. Aquat. Living Resour. En prensa.
- Forés, R., J. Iglesias, M. Olmedo, F.J. Sánchez, J.B. Peleteiro, 1991. Induction of spawning in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a sudden change in photoperiod. Aquacult. Eng. 9, 357-366.
- Omnes M.H., Y. Normant, M. Suquet, C. Fauvel, 1991. Analysis of turbot (*Scophthalmus maximus*) broodstock pilot escale production. In: Aquaculture and the Environment. N. de Pauw, J. Joyce eds. Eur. Aquac. Soc. Spec. Publ., 14, 245-246.
- Peleteiro J.B., P. Lavens, G. Rodríguez-Ojea, J. Iglesias, 1993. Relationship between egg quality of various turbot (*Scophthalmus maximus* L.) broodstocks and its fatty acid content. Symposium on mass rearing of juvenile fish. Bergen. Noruega.
- Suquet M., M. H. Omnes, Y. Normant, C. Fauvel, 1992b. Assesment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture, 101, 177-185.
- Suquet, M., G. Dorange, M.H. Omnes, Y. Normant, A. Le Roux, C. Fauvel, 1993. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). J. Fish. Biol., 42, 509-516.
- Suquet, M., R. Billard, J. Cosson, G. Dorange, L. Chauvaud, C. Mugnier and C. Fauvel. 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. Aquat. Living Resour., 1994.

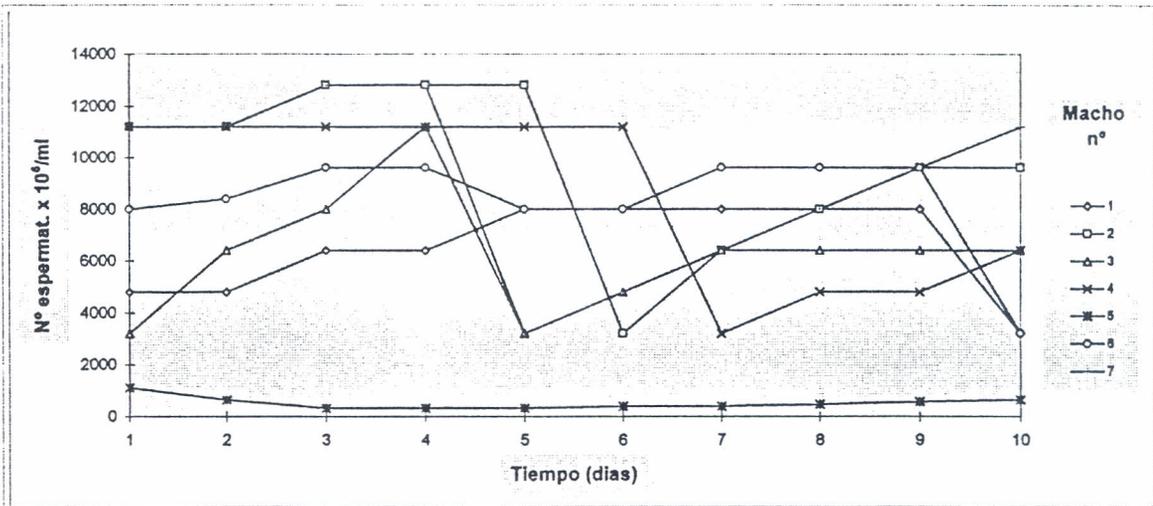


Figura 1  
CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN ESPERMA DE RODABALLO DURANTE DIEZ DÍAS CONSECUTIVOS

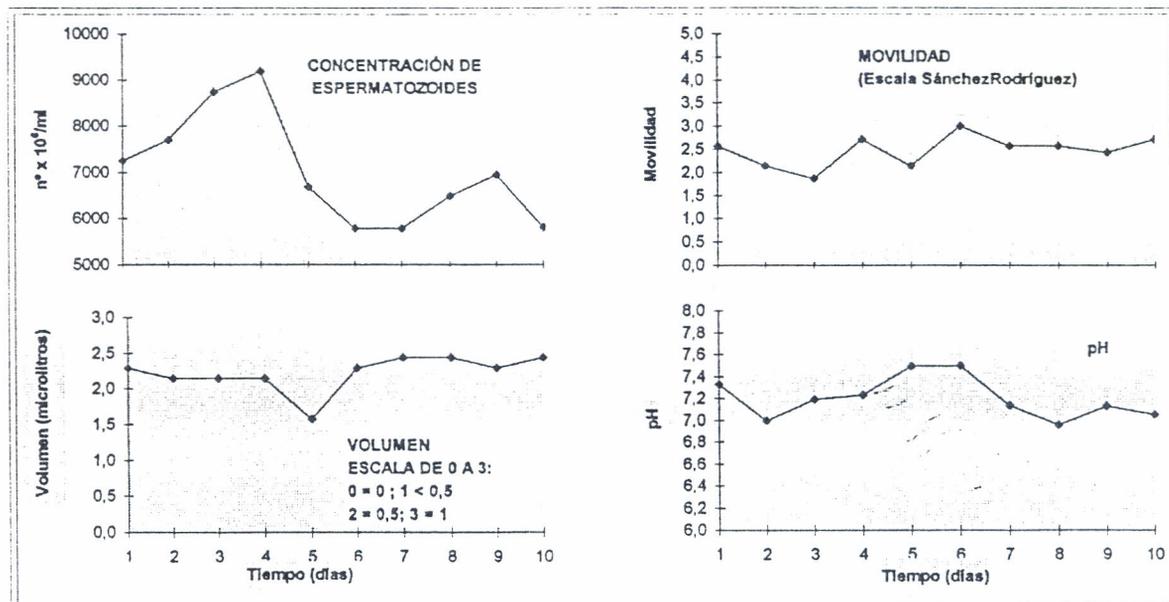


Figura 2  
VALORES MEDIOS DE CONCENTRACIÓN, VOLUMEN, MOVILIDAD Y pH DE ESPERMA DE RODABALLO DURANTE DIEZ DÍAS CONSECUTIVOS

## COMPARACIÓN DE ALGUNOS PARÁMETROS DE ESPERMA DE RODABALLO OBTENIDO EN DOS FRECUENCIAS DE EXTRACCIÓN

**Grupo A:** Peces a los que se les ha extraído esperma los días 0, 5 y 9 de la experiencia

**Grupo B:** Peces a los que se les ha extraído esperma todos los días desde 0 a 9 de la experiencia

		Volumen	Viscosidad	Concentración	Movilidad	pH	Osmolalidad	Proteínas	Glucosa	Colesterol	Triglicéridos	Sodio	Potasio	Cloro	Calcio
DIA 1 n= 14	Media	2,29	1,71	7245,71	2,57	7,33	319,83	1776,00	2,50	60,89	47,56	158,83	6,95	144,83	15,33
	Desv. Típica.	0,7263	0,4688	4063,9460	1,0894	0,0866	8,0998	559,7012	1,5667	35,1700	27,2539	5,8284	1,0211	5,7658	5,8672
	CV	0,32	0,27	0,56	0,42	0,01	0,03	0,32	0,63	0,58	0,57	0,04	0,15	0,04	0,38
DIA 10 GRUPO A n=7	Media	2,43	1,14	5834,29	2,71	7,05	371,29	401,00	8,50	28,67	30,33	104,33	4,98	148,50	61,58
	Desv. Típica.	0,7868	0,3780	3786,3212	0,9512	0,1041	97,1798	193,3794	6,4730	9,3524	20,0964	26,1202	2,4871	7,0358	14,4306
	CV	0,32	0,33	0,65	0,35	0,01	0,26	0,48	0,76	0,33	0,66	0,25	0,50	0,05	0,23
DIA 10 GRUPO B n=7	Media	2,29	1,57	6400,00	1,29	6,92	360,33	943,00	5,87	48,33	42,67	123,17	5,57	141,33	44,00
	Desv. Típica.	0,7559	0,5345	2612,7891	1,2536	0,2786	39,3429	259,5904	2,2509	21,6395	23,0622	43,4806	1,0838	23,5768	20,0898
	CV	0,33	0,34	0,41	0,97	0,04	0,11	0,28	0,40	0,45	0,54	0,35	0,19	0,17	0,46

Volumen = expresa volumen en microlitros en la escala: 0 = 0; 1 < 0.5 ; 2 = 0.5 ; 3 = 1 microlitros.

Viscosidad = expresado como 1 ó 2 si el esperma es fluido o denso respectivamente.

Concentración = expresa la cantidad de espermatozoides / ml x 10<sup>9</sup>

Movilidad = expresa el % de espermatozoides móviles, según escala Sánchez Rodríguez (1995)

Osmolalidad = mOsmoles/Kg

Glucosa = mg /dl

Colesterol = mg /dl

Triglicéridos = mg /dl

Concentración de proteínas = mg /dl

Na<sup>+</sup> , K<sup>+</sup> , Cl<sup>-</sup> , Ca<sup>++</sup> = mmoles/l