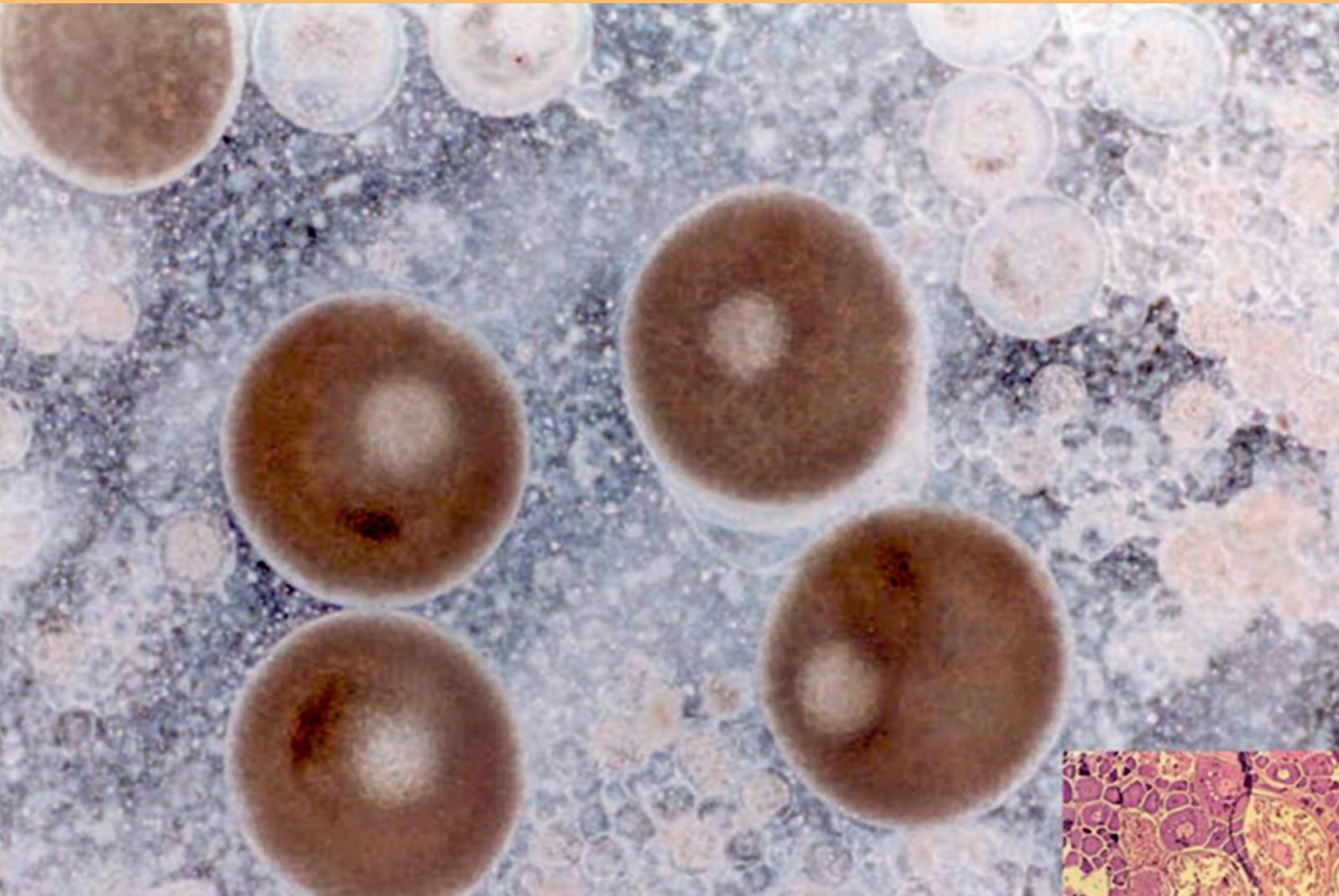




INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ
INFORME

ISSN 0378-7702

Volumen 39, Números 1-2



Enero - Junio 2012
Callao, Perú

SEGUIMIENTO EN CAUTIVERIO DE LA MADURACION GONADAL Y DESOVE DEL LENGUADO *PARALICHTHYS ADSPERSUS* (STEINDACHNER)

MONITORING GONADAL MATURATION AND SPAWNING OF FLOUNDER *PARALICHTHYS ADSPERSUS* (STEINDACHNER) IN CAPTIVITY

Angel Perea de la Matta¹

Lili Carrera²

1. Laboratorio de Biología Reproductiva LBR 429-7630 aperea@imarpe.gob.pe

2. Cultivos Marinos DIAGCAC 429-7630 lcarrera@imarpe.gob.pe

RESUMEN

PEREA A, CARRERA L. 2012. Seguimiento en cautiverio de la maduración gonadal y desove del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner). *Inf Inst Mar Perú*. 39(1-2): 82-87.- Se describe el método de observaciones *in vivo* de la madurez gonadal de *Paralichthys adspersus*. Las observaciones microscópicas de las gónadas se realizaron con muestras provenientes de las canulaciones intra-ováricas e intra-testiculares, se analizó y describió el desarrollo ovocitario y espermatogénico en individuos mantenidos en condiciones de laboratorio para determinar el estado de madurez gonadal y el momento adecuado para la inducción hormonal. Se interpreta el significado de la atresia ovocitaria en las gónadas de lenguado.

PALABRAS CLAVE: *Paralichthys adspersus*, lenguado, reproducción, cultivo.

ABSTRACT

PEREA A, CARRERA L. 2012. Monitoring gonadal maturation and spawning of flounder *Paralichthys adspersus* (Steindachner) in captivity. *Inf Inst Mar Perú*. 39(1-2): xx-yy.- This paper describes the method *in vivo* observations of gonadal maturity of *Paralichthys adspersus* (Steindachner). Microscopic observations of the gonads were made with samples from the intra-ovarian and intra-testicular cannulations analyzed and described the oocyte and spermatogenic development in individuals under laboratory conditions to determine the status of gonadal maturity and the right time to hormonal induction. It interprets the meaning of oocyte atresia in flounder gonads.

KEYWORDS: *Paralichthys adspersus*, flounder, reproduction, cultivation.

INTRODUCCIÓN

Usualmente, los estudios acerca del desarrollo ovocitario suelen considerar, sobre todo, poblaciones silvestres de peces e invertebrados de importancia comercial, con la finalidad de conocer los estados o grados de madurez gonadal y, a partir de ello, estimar la talla de primera madurez y desove, así como los cambios en el ciclo reproductivo, que indican los períodos de mayor actividad reproductiva. Toda esta información es requerida para sugerir, por ejemplo, medidas de manejo como la regulación de tallas mínimas de captura, el inicio y fin de los períodos de veda reproductiva, entre otras. Para dicho fin, normalmente se requieren de muestreos sin repetición (invasivos) con frecuencias semanales o mensuales.

El lenguado *Paralichthys adspersus*, especie nativa de la Corriente Costera de Humboldt, de alto valor comercial y objeto de una pesquería artesanal sin regulación, constituye para el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) tema de investigación que se viene ejecutando a través del proyecto "Adaptación y crianza en cautiverio del lenguado *Paralichthys adspersus* (STEINDACHNER, 1867)" desde el año 1996, cuando se inició el cultivo artificial con la finalidad de desarrollar una metodología económica de reproducción y la obtención de puestas exitosas en laboratorio.

En este trabajo se describe un método de muestreo con repetición que permitió determinar la evolución del desarrollo ovocitario y espermatogénico de *Paralichthys adspersus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Acondicionamiento y mantenimiento.- Se seleccionaron 18 reproductores considerados como adultos previamente sexados (10 hembras y 8 machos). Estos fueron estabulados en un tanque de fibra de vidrio de 6000 L, recubierto con plástico de color negro con el objeto de proporcionar una condición de oscuridad. Así mismo, sobre éste fueron instalados fluorescentes, con dispositivo de control horario automático (timer), exponiendo los peces a 7 horas de luz al día.

La alimentación de los individuos se realizó en base a pescado congelado, "pejerrey" (*Odontesthes regia regia*), a los trozos de pescado se adicionó una cápsula de suplemento vitamínico de uso veterinario. La ración alimenticia diaria

fue el 2% del peso corporal, registrándose el alimento ingerido y no consumido.

Durante toda la ejecución del experimento, los reproductores fueron estabulados en un volumen hídrico sin flujo, realizándose recambios diarios del volumen total de agua y registrándose la temperatura dos veces al día (08:30 – 15:00).

Se realizó un muestreo biométrico mensual, siendo los individuos anestesiados previamente en una solución de agua de mar filtrada y TRICAINÉ – S (MS-222) a una concentración de 80 mg/L. Los individuos fueron expuestos a esta solución durante 3 minutos.

La talla y el peso fueron registrados con la ayuda de un ictiómetro graduado en intervalos de 0,5 cm y una balanza electrónica de 0,01 g de precisión. La longitud total fue considerada al centímetro inferior.

La determinación del sexo se hizo usando la técnica de canulación (WATANABE y CARROLL, 2000). Se introdujo una cánula de PVC de grado médico (0,8 mm de diámetro interior x 1,4 mm de diámetro exterior), en el poro genital del pez y por succión con el uso de una jeringa, se extrajo las células sexuales para su identificación al microscopio.

Seguimiento de la madurez gonadal.- Para validar las observaciones de los distintos grados de desarrollo de los ovocitos y espermatoцитos *in vivo*, se procesaron, mediante la técnica de infiltración con parafina, gónadas de 10 individuos, que fueron analizadas microscópicamente.

A través de la cánula por succión, se tomaron muestras del lumen gonádico, correspondiente a la parte proximal de la gónada, se colocaron sobre láminas porta objeto y se observaron en un microscopio compuesto con un sistema contrastador de fase en tres niveles dife-

rentes, con la finalidad de identificar los distintos tipos de ovocitos o espermatoцитos.

En el caso de las hembras, se realizó el conteo por tipo de ovocito. Los ovocitos se catalogaron como previtelogenados, vitelogenados, maduros, maduro avanzado, hidratados y atrésicos de acuerdo a la clasificación hecha por HUNTER y GOLBERG (1980). Esto permitió determinar la frecuencia relativa de los distintos tipos de células en el ovario de cada individuo. La medición de los ovocitos se efectuó con el auxilio de un ocular micro-métrico calibrado con una regla patrón. En el caso de los machos, se elaboró una escala proximal de tres estadios dependiendo de la proporción de los tipos de células sexuales presentes en el estroma testicular (espermatoгонios, espermatoцитos y espermatozoides).

En el caso de los machos se estimó el índice de madurez, basado en una escala cualitativa a la cual se le asignó valores de 0 a 100, con intervalos de 25 de acuerdo a la proporción de cada tipo de célula sexual masculina (25: muy poco; 50: poco; 75: abundante; 100: muy abundante). El índice de madurez consistió en la suma de los valores asignados a los espermatoцитos y espermátides en cada muestreo.

Desove.- De acuerdo a los resultados del seguimiento del estado de madurez de los peces, se seleccionó hembras y machos maduros; con la finalidad de obtener puestas; identificándose a los ejemplares que desovaron.

Los huevos fueron colectados manualmente con la ayuda de una malla de 500 μ , los que fueron desinfectados y lavados con abundante agua de mar esterilizada mediante radiación ultra violeta (UV); luego, se eliminaron los huevos no viables (muertos) mientras que los viables fueron estabulados en tanques cilindro-cónicos de 250 L con agua de mar esterilizada y airea-

ción suave que permita la distribución uniforme de los huevos en la columna de agua.

La temperatura registrada en el momento del desove fue de 16,5°C. Los huevos colectados fueron observados al microscopio, identificándose el espacio perivitelínico, como indicador de que se encontraban fertilizados.

En el inicio de este estudio y en todos los casos, las células fueron fotografiadas en distintos aumentos y con diferentes contrastes de fases.

RESULTADOS

Marcaje y sexado.- La marca de los individuos fue visible por aproximadamente 6 meses, después de ese tiempo se requirió repetir el marcaje, lo cual permitió tener un registro del desarrollo gonadal de cada individuo. Al sexar el grupo de reproductores, se identificaron 14 hembras y 3 machos.

Seguimiento de la Madurez Gonadal

En hembras.- En el análisis de las muestras obtenidas por canulación (Fig. 2A y B), se pudo diferenciar *in vivo* los ovocitos con y sin vitelo, así mismo los ovocitos catalogados como previtelogenados, vitelogenados y maduros de acuerdo a la clasificación hecha por HUNTER y GOLBERG (1980). De acuerdo a la proporción de ovocitos en el ovario, se clasificó a las hembras en cinco estados de madurez gonadal: 1) Inmaduro, 2) En madurez, 3) Maduro, 4) Maduro avanzado, 5) En recuperación.

La identificación de ovocitos en estado de hidratación, fue sencilla, los cuales son de apariencia translúcida diferenciándose claramente del resto de ovocitos. En las figuras 3 (A y B), se muestran y comparan los distintos tipos.

La identificación de los ovocitos atrésicos (Fig. 3) en muestras pro-



Figura 1.- Individuo marcado de *Paralichthys adspersus*

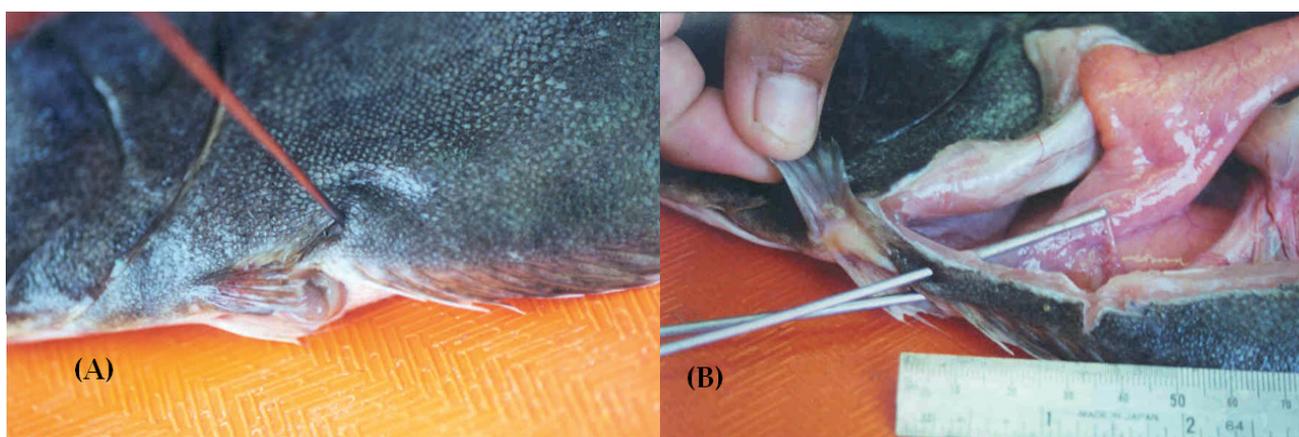


Figura 2.- (A) Vista externa de poro genital, (B) anatomía interna de la gónada y vista interior del oviducto *Paralichthys adspersus*.

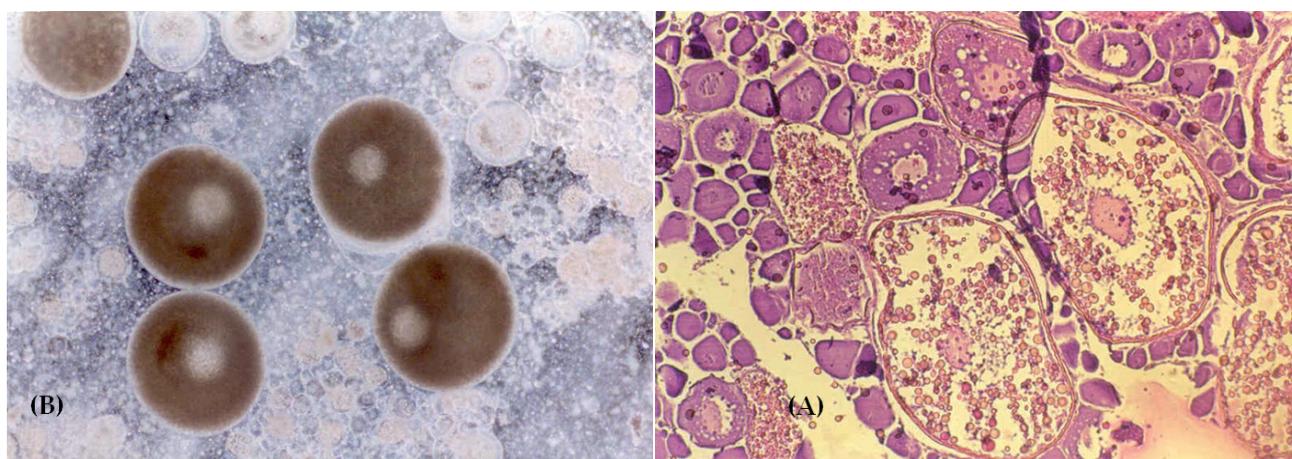


Figura 3.- (A) microscopía obtenida por infiltración con parafina (40 X) de ovario maduro de lenguado. Se observa ovocito maduro, ovocito atrésico y previtelogenado. (B) microscópica in vivo con contraste de fase de ovario maduro de lenguado. Se observa ovocito maduro, maduro avanzado y ovocitos previtelogenados (40 X).

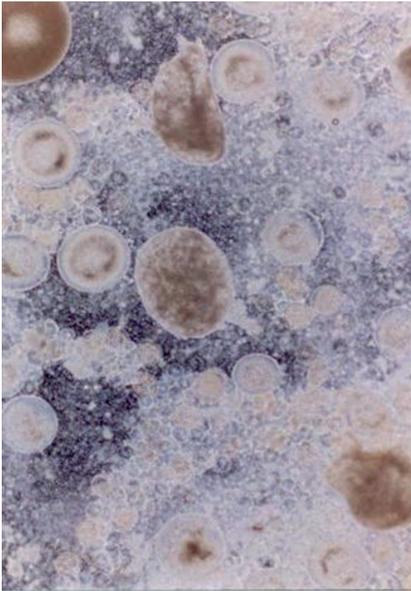


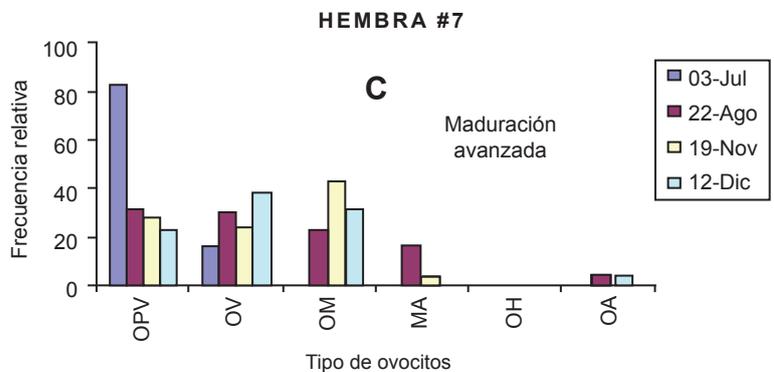
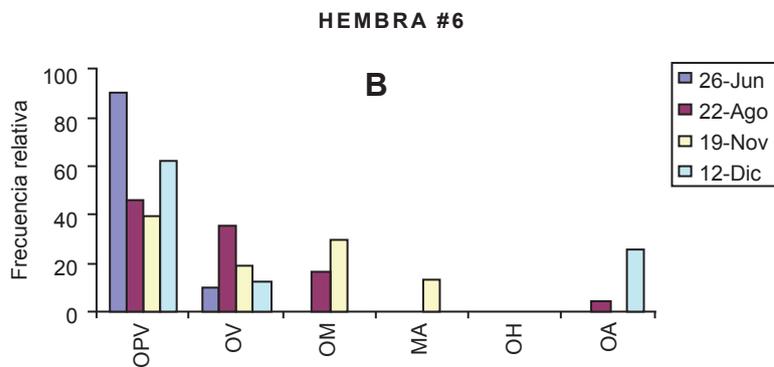
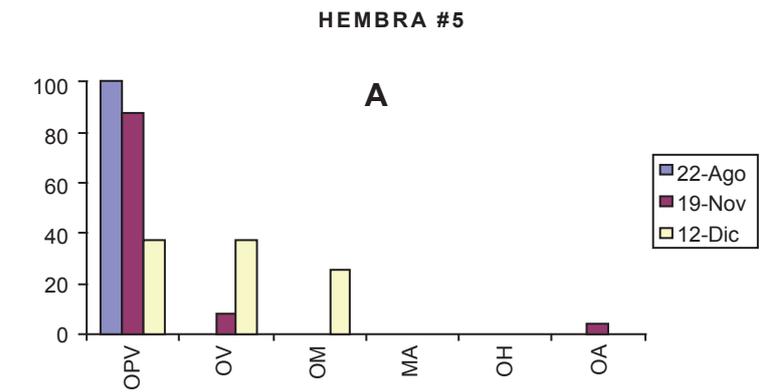
Figura 4.- Vista in vivo de ovocito atrésico (40X).

cesadas mediante la técnica de infiltración con parafina y con muestras *in vivo* (Fig. 4) ha sido sencilla, pudiendo distinguirse las siguientes características de dichos ovocitos catalogados como tipo ∞:

- encogimiento y distorsión del folículo entero, plegamiento y disolución de la zona pelúcida.
- desorganización y licuefacción del vitelo y del ooplasma
- hipertrofia y carácter fagocítico de las células foliculares.

Los ovarios maduros que no presentaron ovocitos atrésicos (Fig. 3B), presentarían, en general, una mayor probabilidad de un desove exitoso.

Como ejemplo de los resultados del seguimiento de la madurez gonadal, mediante el estudio de la evolución del desarrollo ovocitario de agosto a diciembre 2001 (Fig. 5), los casos A (hembra N° 5) y C (hembra N° 7) muestran una progresiva maduración de las gónadas, indicada por la presencia de ovocitos maduros (OM) y maduros avanzados (MA). En el caso B (hembra N° 6) la evolución no fue positiva debido al notorio incremento, en el último mes, de atresia ovocitaria tipo ∞. Lo cual estaría indicando que existió



Leyenda

- OPV : Ovocitos pre-vitelogenados
- OV : Ovocitos vitelogenados
- OM : Ovocitos maduros
- MA : Ovocitos maduros avanzados
- OH : Ovocitos hidratados
- OA : Ovocitos atrésicos

Figura 5.- Desarrollo ovocitario del *Paralichthys adspersus*. A y C. Hembras maduras B. Hembra en recuperación.

algún factor perturbador (intrínseco o extrínseco) que provocó un retroceso en el proceso de maduración de este individuo.

En machos.- La catalogación del estado de madurez en los machos ha sido sólo cualitativa, se revisó *in vivo* y de acuerdo a la proporción visual en el campo del microscopio compuesto, tomándose en cuenta la predominancia de las células sexuales que pudieron ser identificadas: espermatogonios, espermatocitos o espermatozoides (Fig. 6). Con estas consideraciones, se pudo clasificar a los machos en los siguientes estados de madurez: 1) Inactivo, 2) Maduro, 3) Maduro avanzado.

Desove.- Los huevos tuvieron un diámetro promedio de 0,85 mm. La fecundidad estimada fue de 90.982, calculándose un porcentaje de viabilidad del 60%, siendo incubados a una densidad de 100 huevos/L. Los huevos no viables de característico color blanquecino, perdieron la capacidad de flotación, depositándose en el fondo del tanque, por lo que fueron eliminados fácilmente. Los ejemplares que desovaron fueron una hembra con peso de 1508 g y dos machos de 973,4 y 869,6 g.

DISCUSIÓN

Identificación y cuantificación de ovocitos in vivo

El previo estudio del desarrollo ovocitario con las técnicas histológicas tradicionales (infiltración con parafina), fue fundamental para la identificación de los distintos tipos de ovocitos in vivo. Las láminas obtenidas con muestras comerciales, y teñidas con Hematoxilina-Eosina (H-E) fueron medidas y fotografiadas, lo cual facilitó esta tarea.

En todos los casos, con la ayuda del contrastador de fases del microscopio con el que se observaron las muestras in vivo, pudo diferenciarse perfectamente el núcleo del citoplasma, las gotas de aceite típicas en los ovocitos previtelogenados, el inicio de la vitelogénesis y la vitelogénesis avanzada

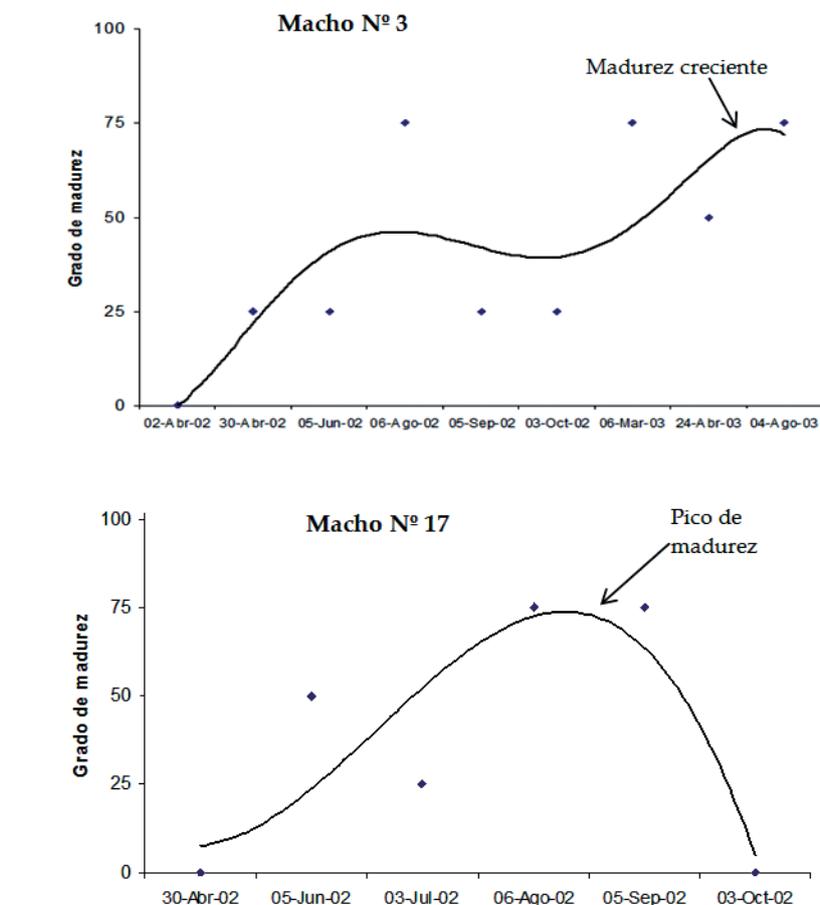


Figura 6.- Índice de madurez en machos de *Paralichthys adspersus*. (Sup.) macho en madurez creciente, (Inf.) registro de pico de madurez.

como se aprecia en la figura 3B. En los ovocitos con estado avanzado de madurez, las células se observan muy opacas con la gota oleosa excéntrica característica de ese estado de desarrollo, sin poder visualizar el núcleo. En el caso de las células atrésicas (Fig. 4), la estructura de los gránulos de vitelo se muestra bastante distinta a la de los ovocitos viables, notándose una clara degradación. Así mismo, los folículos de estas células no son homogéneos.

Identificación de células sexuales masculinas in vivo

Debido al tamaño de este tipo de células (20 μ), las visualizaciones se realizaron a 100 y 400X de aumento. En todos los casos y de acuerdo al aumento del lente objetivo utilizado, fue indispensable el uso de los contrastadores de fases.

Normalmente, los estudios hechos en machos a este nivel se han realizado mediante el uso de técnicas convencionales de infiltración con parafina coloreadas con H-E, donde se pueden realizar observaciones detalladas de la espermiogénesis y su disposición celular intra-testicular. En nuestro caso, y de acuerdo a los objetivos planteados, las observaciones directas en machos no tuvieron la misma resolución que las obtenidas por métodos convencionales, sin embargo, las ayudas ópticas (contrastes de fases) permitieron reconocer algunos de éstos tipos celulares.

El proceso de reproducción se ve afectado por factores a los que están sometidos los reproductores, entre ellos el tipo de dieta es un factor de gran influencia en este proceso (Navas et al. 1993). Siendo muchos los factores desencade-

antes de la maduración y desove, incluyendo los extrínsecos e intrínsecos, este trabajo pretende sólo describir cómo el conocimiento del desarrollo ovocitario in vivo puede realizarse de una manera rápida y no onerosa, constituyendo además, una herramienta valiosa en el desarrollo de cultivos de peces como el "lenguado" *Paralichthys adspersus*.

Atresia ovocitaria

La atresia, sobre todo de ovocitos maduros, ha sido estudiada en diferentes grupos de peces. Sin embargo, existe una considerable variación en los eventos asociados con la atresia en diversas especies. En este sentido, la información obtenida en el desarrollo ovocitario de la anchoveta (*Engraulis ringens*) y de la merluza (*Merluccius gayi peruanus*), muestra claramente éstas diferencias, indicadas por la mayor incidencia de atresia ovocitaria tipo α y β en el recurso merluza en comparación con la anchoveta. Por consiguiente, se debe tomar en consideración que cada especie tiene tasas propias de atresia.

CARRILLO y ZANUY (1987), mediante canulaciones intraováricas, mostraron que si la proporción de atresia ovocitaria no es elevada (menor del 10%) en hembras seleccionadas de "rodaballo", se puede proceder al tratamiento de inducción con una alta probabilidad de obtener una mayor cantidad de ovocitos viables. En el caso del "lenguado" *P. adspersus*, ha sido sencillo identificar los ovocitos atrésicos tipo α en muestras procesadas mediante la técnica de infiltración con parafina; lo cual permitió su identificación *in vivo*, con la ayuda del sistema de contraste de fases en un microscopio compuesto. En esta especie no se ha encontrado estu-

dios referidos al diagnóstico de la atresia ovocitaria in vivo como un indicador del estado o momento reproductivo. Por esta razón, se estima que los resultados presentados son de suma utilidad para el conocimiento de la biología reproductiva de este recurso y su reproducción en cautiverio. Así mismo, es importante dar a conocer algunas consideraciones previas que permitan entender el significado e importancia de la atresia ovocitaria y su aplicación en la reproducción artificial de los peces.

El seguimiento del desarrollo ovocitario de cada hembra marcada, identificando y contabilizando los tipos de ovocitos, constituye una herramienta valiosa para conocer el estado de madurez gonadal de los reproductores sin sacrificarlos. Así mismo, la presencia o ausencia de atresia ovocitaria es un buen indicador del estado en el que se encuentra un espécimen en cautiverio. Si la atresia ovocitaria se incrementa notoriamente, es evidente que este individuo no tiene las condiciones para la maduración y menos para ser inducido hormonalmente a desovar; pudiendo inferirse que se presenta algún factor perturbador, ya sea intrínseco (enfermedad, problema hormonal) o extrínseco (calidad de agua, hipoxia, etc.) que lo estaría afectando. De manera que, la técnica de canulación, se convierte en una herramienta de diagnóstico útil para este tipo de trabajos, por proporcionar información sobre las respuestas de maduración y en consecuencia de la condición reproductiva de cada individuo. Un ejemplar no madurará ni desovará si no tiene las condiciones adecuadas para hacerlo, en relación con lo cual, si bien la atresia ovocitaria no resuelve el problema de conocer la causa de la falta de maduración y desove, sí es capaz de detectar e indicar que algún problema en el

tanque de cultivo o en el individuo estaría provocando la reabsorción de los ovocitos y la consecuente falta de progreso en la maduración afectando la fecundidad.

En el caso de los machos, a pesar de que los espermatoцитos y espermatozoides son células muy pequeñas y numerosas (menores de 20 μ) y la observación acerca de su madurez sólo fue cualitativa, estas observaciones fueron muy útiles para conocer el estado de madurez de dichos individuos e igualmente poder inducirlos hormonalmente a la expulsión con éxito.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento al Blgo. Victor Yépez por la revisión de este trabajo.

REFERENCIAS

- BROWNING H. 1973. The evolutionary history of the corpus luteum. *Biol. Reprod.* 8:128-157.
- CARRILLO M, ZANUY S. 1987. Manipulación de la reproducción de los teleósteos y calidad de las puestas. Instituto de acuicultura de Torre de la Sal, C. S. I. C., Castellón, España.
- HUNTER J, GOLDBERG S. 1980. Spawning incidence and batch fecundity in northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull. U.S.* 77: 641-652.
- NAVAS J, THRUSH M, RAMOS J, ZANUY S, CARRILLO M, BROMAGE N. 1993. Calidad de puesta y niveles plasmáticos de vitelogenina en reproductores de Lubina (*Dicentrarchus labrax*) mantenidos con diferentes dietas. *Actas IV Congreso Nac. Acuicultura:* 19-24.
- SAIDAPUR S. 1978. Follicular atresia in the ovaries of nonmammalian vertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 5:225-244.
- WATANABE W, CARROLL P. 2000. Recent progress in controlled reproduction of southern flounder *Paralichthys lethostigma*. *UJNR. Technical Report N° 28:* 141-148.