

PROYECTO ROQUER
Memoria Técnica
Grupo de Reproducción (IIM-CSIC)

INTRODUCCIÓN

La pesca recreativa afecta al tamaño de la población de las especies diana no solo de una manera directa (mortalidad selectiva del stock reproductor), sino también a través de otros mecanismos que operan a diferentes niveles de organización (individuo, población, comunidad y ecosistema). Este proyecto presta especial atención a los cambios inducidos por la pesca en la historia vital individual (por ejemplo, adelanto de la edad de maduración sexual, crecimiento más rápido y menor talla final). Todos estos cambios operan a nivel de individuo, pero tienen repercusiones (tienden a maximizar el potencial reproductivo en condiciones de sobrepesca) o se originan (por ejemplo, competencia intra o interespecífica, predación o calidad medioambiental del hábitat) en niveles de organización superior (población, comunidad y ecosistema). Todo ello nos lleva a conjeturar acerca de la capacidad de esta especie para responder estratégicamente a su explotación con una cierta plasticidad y a plantearnos diversas hipótesis.

Por una parte podrían haberse introducido **cambios en la estrategia reproductiva** de las especies como consecuencia de la explotación tales como: reducción de la edad y la talla de maduración sexual, incremento de la fecundidad a nivel poblacional, disminución del diámetro de los huevos, etc. En definitiva, una variación en el potencial reproductivo. No obstante para comprobar esta hipótesis es necesario comparar los resultados con áreas de baja explotación y alta explotación.

OBJETIVOS

Estudio de la estrategia reproductiva de las especies objetivo para cada una de las áreas de estudio. En especial los procesos de maduración y fecundidad, así como la descripción del ciclo reproductivo y el estudio del potencial reproductivo. Comparar estrategias reproductivas entre las diferentes zonas estudiadas: talla de maduración sexual, proceso de maduración gonadal, fecundidad poblacional, tamaño y viabilidad de los huevos, índices reproductivos y período de puesta.

Evaluar el efecto de la pesca sobre los cambios observados en la estrategia reproductiva de la especie. En que medida la pesca puede inducir cambios observados en parámetros reproductivos, al alterar la estructura de tallas y edades de la población, y hasta que punto los stocks resisten o pueden resistir esta presión a través de la plasticidad de los parámetros reproductivos.

METODOLOGÍA

REPRODUCCIÓN – Microscopía óptica

En el caso de los ejemplares de zonas explotadas y no explotadas se analizarán aproximadamente 40 muestras mensuales de cada sexo y por cada área de estudio. Las muestras que posteriormente se observarán al microscopio óptico serán fijadas en formol al 10% y conservadas en formol al 4%.

Se incluirán las muestras gonadales en bloques de parafina. Después de la microtomía, que permitirá obtener secciones de 3 μm se aplicarán tinciones histológicas.

Concretamente se analizarán los siguientes aspectos:

- **Observación de las estructuras ováricas y testiculares, y descripción general de las mismas.**
- **Selección de estructuras que precisen observación ultra estructural.**

REPRODUCCIÓN – Fecundidad

El análisis de fecundidad se realizará en el laboratorio. Las muestras serán fijadas en formol tamponado al 4% con la mayor rapidez posible. Dicho análisis consistirá en:

- **Selección de individuos aptos para el cálculo de la fecundidad.** Tras procesar todas las muestras según la metodología anteriormente citada, en cada corte histológico se determinará la presencia de folículos postovulatorios y de ovocitos atrésicos, con la finalidad de seleccionar los individuos apropiados para el cálculo de la fecundidad potencial. En ovarios con ovocitos atrésicos se contará el número de ovocitos de cada clase. Se usarán técnicas de análisis de imagen para este análisis.
- **Estimación de la fecundidad.** De los individuos seleccionados se extraerá una muestra de la zona media y central del ovario previamente fijado de 50 mg (incluido tejido) que serán conservadas también en formol tamponado al 4%. A partir de ella se estimará la fecundidad potencial al comienzo de la estación reproductiva, en el caso de fecundidad determinada, relacionándose con la talla y peso del individuo. La fecundidad será determinada por el método gravimétrico, con la variación de que tanto el recuento de huevos y la determinación de sus diámetros será realizado mediante técnicas de análisis de imagen, tal y como se viene realizando rutinariamente en el equipo de Pesquerías del IIM. .
- **Valoración de los procesos atrésicos prefreza y postfreza.** Se analizará a través de cortes histológicos con metodologías similares a las empleadas en la selección de individuos para el cálculo de fecundidad. Se estudiará la influencia de los procesos atrésicos en la fecundidad de la población. Se estimará la intensidad de la atresia mediante técnicas de análisis de imagen.

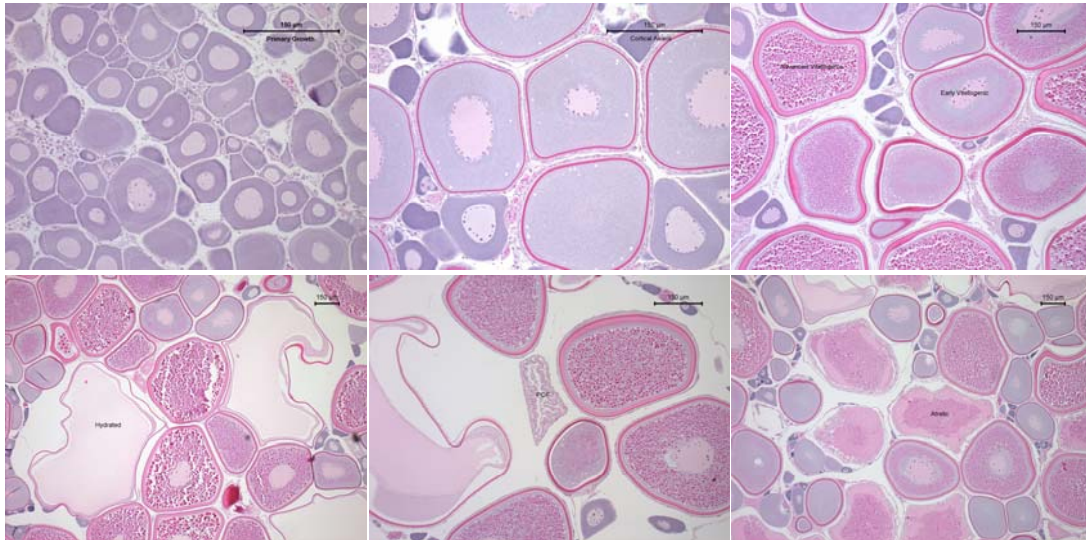
Todas las técnicas de análisis de imagen han sido desarrolladas en el equipo de Pesquerías del IIM a lo largo de varios proyectos y con el consiguiente desarrollo de rutinas que serán diseminadas entre los participantes en el proyecto, para su uso en cada laboratorio.

REPRODUCCIÓN – Ciclo anual

Se determinará el ciclo reproductivo anual de las especies objeto de estudio a partir del análisis histológico de las muestras mensuales de ovario y testículos, y a partir del análisis de distintos índices relacionados con la reproducción.

- El **estudio histológico** seguirá la metodología descrita en el anterior punto que hace referencia a la metodología que utilizaremos para la microscopía óptica. El estadio de desarrollo de los ovocitos y los ovarios se determinará siguiendo los criterios establecidos por Wallace y Selman (1981) y West (1990).
- Los **índices relacionados con la reproducción** que se analizarán a partir de los datos morfométricos de los ejemplares capturados y a partir de sus pesos eviscerados, de sus gónadas y del hígado son los siguientes: proporción sexual o sex-ratio, índice gonadosomático, índice hepatosomático y factor de condición. Los cálculos se realizarán para los dos sexos de forma separada y se calcularán en función de la talla y del mes de captura. Se analizarán estadísticamente los resultados para cada área de estudio.

A continuación se detallan los estadios de desarrollo oocíticos descritos por Wallace y Selman (1981) y West (1990) con imágenes de faneca, *Trisopterus luscus*, de aguas gallegas.



Clasificación de los diferentes estados de desarrollo de los oocitos observados en faneca: crecimiento primario (primary growth stage), alveolos corticales (cortical alveoli stage), vitelogénesis (vitellogenic stage), hidratados (hydrated oocyte), folículos postovulatorios (postovulatory follicle), atresi (atretic oocytes).

Crecimiento primario. Es la fase inicial, desde la formación del ovocito a partir de las vesículas germinales. Aunque en esta fase el oocito crece considerablemente el tamaño es muy pequeño en comparación con el ovario. Comprende las siguientes fases:

Nucleolo-cromatina: cada ovocito se rodea inicialmente de unas células prefoliculares de forma escamosas y se agrupan de forma anidada. Los ovocitos tienen un núcleo muy grande, rodeado de una delgada capa de citoplasma. El núcleo contiene un nucleolo único, también muy grande.

Estado perinucleolar: A medida que el ovocito crece, el núcleo (vesícula germinal) también aumenta de tamaño y aparecen múltiples nucleolos, generalmente en la periferia. El citoplasma se tiñe uniformemente, aunque en su estado más avanzado pueden observarse vacuolas en el citoplasma. Al final de este estado, en la superficie del ovocito se extienden numerosos *microvilli* al mismo tiempo que los materiales precursores del corion se empiezan a acumular en manchas. Ovocitos en este estado están presentes en los ovarios de todas las hembras, y constituyen su totalidad en las hembras juveniles. Los ovocitos pueden permanecer durante años en este estado en el ovario.

Alvéolos corticales. Este estado se caracteriza por la aparición de vesículas o alveolos en el citoplasma. Con la preparación convencional de H&E estas estructuras se observan como esferas huecas, pero se pueden teñir con otros colorantes (azul Alcian, azul de toluidina, PAS, tetróxido de osmio). Las vesículas aumentan de tamaño y número hasta formar varias filas en la periferia del citoplasma, dando origen a los alveolos corticales. Estas vesículas liberan su contenido en el espacio perivitelino dentro de las membranas del huevo durante la fertilización. No constituyen vitelo en sentido estricto, ya que su

función no será la de alimentar al embrión y por tanto el término equivalente de 'vesículas de vitelo' que aparece a veces en la bibliografía es confuso e incorrecto, debiendo ser reemplazado por el término 'alveolos corticales'. La aparición de estas estructuras significa que ese ovocito ha comenzado el proceso de maduración y el pez ha entrado en la fase adulta.

El corion (zona radiata, membrana vitelina, zona pelúcida) aparece normalmente en este estado y algunos autores utilizan la presencia de ambas estructuras (alveolos corticales y córion) para definir este estado. Sin embargo el momento en el que el córion aparece varía según las especies.

La aparición de estas estructuras significa que ese ovocito ha comenzado el proceso de maduración y por tanto, en condiciones normales, continuará el desarrollo dentro de ese ciclo reproductivo.

Vitelogénesis. Se caracteriza por la aparición de esferas o glóbulos llenos de vitelo. Al principio los gránulos son de pequeño tamaño y se hacen mayores al avanzar este estado. Las esferas de vitelo pueden mantener su integridad a lo largo de toda la fase de crecimiento del ovocito, fusionándose al final formando una masa fluida continua, que le da a los ovocitos su típico aspecto transparente. Lo normal es que esto no ocurra hasta el final de la fase de crecimiento del ovocito. Aunque en la mayoría de los teleósteos estudiados los alvéolos corticales aparecen antes de la fase de acumulación de vitelo, existen excepciones (ej. *Dicentrarchus labrax*), en que se forman después.

A menudo este estado se subdivide por conveniencia en fases sucesivas -vitelogenénesis primaria, secundaria y terciaria, aunque esta terminología no es muy consistente.

A medida que se desarrolla, las células de la pared folicular se multiplican y se estratifican, distinguiéndose una capa continua (la granulosa) y las distintas capas exteriores de la cubierta del folículo (la teca). Por tanto los ovocitos vitelogénicos están rodeados de dos capas de células principales: una exterior (la teca) y otra interior (la granulosa), que están separadas por una membrana basal. La teca contiene fibroblastos, fibras de colágeno, capilares y en algunas especies, células especializadas secretoras de esteroides.

Maduración. Cuando el ovocito ha completado su desarrollo, la estimulación hormonal desencadena la maduración del ovocito, tras la cual este será liberado en el lumen del ovario. El inicio de este estado está marcado por la migración del núcleo hacia la periferia del citoplasma y la fusión de su membrana. Se produce entonces la primera división meiótica, por la cual una de las células haploides se quedaría con la práctica totalidad del material citoplasmático, mientras que la otra, denominado primer cuerpo polar, degenerará. Las fotografías de esta estructura son raras en la bibliografía sobre peces. La liberación del segundo cuerpo polar, tras la segunda división meiótica, ocurre tras la ovulación.

En algunas especies durante el proceso de maduración la coalescencia de los glóbulos de vitelo ocurre simultáneamente a la migración de núcleo. En muchas especies de teleósteos al final de la maduración se produce el fenómeno conocido como hidratación, que consiste en la incorporación rápida de agua, produciendo un nuevo incremento en el tamaño del ovocito. Este proceso es muy marcado en las especies de peces marinos que producen huevos flotantes. Sirve por un lado para facilitar la expulsión de los ovocitos por el aumento de la presión interna del ovario, y por otro lado para favorecer la flotabilidad de los huevos en el agua de mar. El inicio de la hidratación es indicativo de la puesta inminente en un plazo de horas (Fulton, 1898).

Al final de la maduración se produce la ovulación, ésta ocurre con la ruptura del folículo que contenía el ovocito, que es liberado así en el lumen del ovario. Los folículos postovulatorios que resultan de este proceso se identifican fácilmente cuando son recientes, pero degeneran más o menos rápidamente dependiendo de la temperatura (del orden de horas a 20 °C al orden de meses a 0°C). Los folículos postovulatorios antiguos no se distinguen fácilmente de los ovocitos en atresia (degeneración).

Hay que señalar que la ovulación y las puestas son dos procesos totalmente separados, controlados por distintos mecanismos. Es por este motivo que en ausencia de observaciones directas es muy difícil conocer exactamente el número de huevos realmente puestos (fecundidad real) y generalmente solo podemos llegar a conocer el número de huevos que van a ser ovulados (fecundidad potencial).

Atresia. La atresia folicular, o simplemente atresia, es un proceso degenerativo por el cual ovocitos en varios estados de desarrollo son reabsorbidos en el ovario. Hacia el final de la puesta, la atresia es muy común y es necesario aprender a distinguir entre este tipo de ovocitos y los normales. La atresia se produce sobre los ovocitos que tras la puesta no han ovulado, pero puede afectar a los que están en desarrollo, incluso al inicio de la vitelogénesis. La atresia folicular ocurre de forma similar en todas las especies de peces. Las células de la granulosa invaden el citoplasma del ovocito y digieren el vitelo. Estas células fagocíticas de la granulosa finalmente degeneran. El mecanismo de atresia es muy importante en diversas especies para regular el número de huevos que van a ser liberados. Por este fenómeno se reduce el número de huevos (fecundidad) y se recupera la energía acumulada en el ovocito.

Es importante aclarar una serie de conceptos que hacen referencia al estudio de la estrategia reproductiva elegida por cada una de las especies.

De acuerdo con la distribución de tamaños de los ovocitos en el ovario, se han identificado los siguientes tipos de desarrollo (Wallace y Selman 1981):

Ovarios con desarrollo sincrónico: todos los ovocitos se desarrollan, maduran y se ovulan al unísono, sin que haya reemplazamiento a partir de estados previos de desarrollo. Este tipo de desarrollo es el que corresponde a las especies semelpáridas. La distribución de tallas de los ovocitos de uno de estos ovarios es unimodal. Ejemplos de este tipo de desarrollo son los salmones, los cefalópodos y el capelín.

Ovarios con desarrollo sincrónico por grupos: hay al menos dos grupos de tamaños de ovocitos presentes al mismo tiempo, siendo normalmente el grupo más avanzado el más homogéneo (unimodal). A medida que progresa el desarrollo de este último grupo se establece una distancia clara entre las distribuciones de tamaños de ambos grupos. El grupo de ovocitos de mayor tamaño corresponde a los huevos que potencialmente serán liberados en durante ese ciclo reproductivo. Este tipo de desarrollo de presenta en especies boreales: bacalao, platija, limanda, fletán, etc.

Ovarios con desarrollo asincrónico: hay presencia simultánea de ovocitos en todos los estados de desarrollo. La distribución de tallas de los ovocitos en un ovario de este tipo es continua, excepto en el momento de la puesta en que se destacan por su tamaño los ovocitos hidratados, o bien puede presentar modas sucesivas pero sin separación entre ellas. El ejemplo típico son los clupeidos (sardina y anchoa) y en general es propio de las especies de las zonas templadas. (Hay que puntualizar que el hecho de que el periodo reproductivo sea largo no necesariamente implica múltiples puestas para cada hembra, sino que puede ocurrir también si existe una asincronía poblacional en el proceso de maduración individual).

La fecundidad es el eslabón principal entre las estimaciones cuantitativas de huevos y larvas y la estimación del tamaño del stock reproductor.

Es necesario distinguir entre fecundidad parcial, fecundidad real, fecundidad potencial y la fecundidad en la vida (Murua and Saborido-Rey, 2003). La fecundidad en la vida es el número de huevos que una hembra logra poner a lo largo de todas las estaciones reproductivas de su vida. La fecundidad potencial es el número de huevos que en una estación determinado están preparados para desarrollarse y ser liberados. La fecundidad real es el número real de huevos que son liberados en una estación reproductiva ya que una parte de los que constituyen la fecundidad potencial (a veces muchos) no llegan a ser puestos y se quedan en el ovario para ser después reabsorbidos, por tanto, la fecundidad real es igual o inferior a la potencial. Existen especies que liberan los huevos en tandas o “batches”, la fecundidad parcial es el número de huevos producidos en cada tanda. Así la suma de las fecundidades parciales es la fecundidad real.

Estos últimos conceptos nos llevan a establecer dos tipos de fecundidad:

Fecundidad determinada.- La fecundidad es determinada si el número de huevos que va a ser puesto queda fijado en un momento dado y no hay adición de nuevos ovocitos vitelogénicos una vez que se ha iniciado la puesta. En peces con este tipo de fecundidad, el conjunto de oocitos vitelados que se encuentran en el ovario al comienzo de la época de puesta se consideran equivalentes a la fecundidad potencial anual, esto es, el número de oocitos vitelados que maduran en un año (sin tener en cuenta pérdidas por atresia). Por tanto, el número de huevos vitelados presentes en el ovario decrece con cada puesta puesto que no son remplazados durante la estación reproductiva. Es típica de especies con desarrollo sincrónico.

Fecundidad indeterminada.- La fecundidad es indeterminada cuando hay un aporte continuo de ovocitos vitelogénicos mientras dura la puesta. La fecundidad potencial anual no está fijada de antes del comienzo de la época de puesta. Esto es, oocitos previtelogénicos pueden desarrollarse y ser reclutados al conjunto de oocitos vitelados en cualquier momento de la estación reproductiva. Este tipo de fecundidad se asocia con la maduración de tipo asincrónico. Para poder comparar la fecundidad entre individuos, stocks o especies, se utiliza la fecundidad relativa, que es el número de huevos por unidad de peso. Otros índices, denominados fecundidad específica, sirven para caracterizar el potencial reproductivo a nivel poblacional e incluyen, dependiendo de la especie, factores tales como la fecundidad individual, inicio de la madurez sexual, proporción de sexos, y periodicidad y frecuencia de las puestas a lo largo del ciclo biológico individual.

BIBLIOGRAFÍA

- Murua, H. and Saborido-Rey, F. 2003. Female reproductive strategies of marine fish species of the north atlantic. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, 33: 23-31.
- Wallace R.A. & Selman K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist*, 21: 325-343.
- West G. 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 41: 199-222.