

Aplicación de Dos Tipos de Hormonas en la Reproducción Artificial del Pargo de Mangle, *Lutjanus griseus* L.

JESÚS ROSAS. C., TOMÁS CABRERA B. Y JOSÉ MILLÁN Q.

Instituto de Investigaciones Científicas

Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente. Nueva Esparta.

Boca de Río, Apto. Postal 147(Porlamar).

Isla de Margarita, Venezuela

RESUMEN

El uso de hipófisis en la inducción al desove en peces que maduran sexualmente en cautiverio se inició en Brasil hace más de medio siglo. Esta técnica ha sido modificada notablemente, empleándose en la actualidad una gran cantidad de agentes químicos como Clomifeno, Pertisol sereno, entre otras. Este trabajo se realizó utilizando cinco hembras y diez machos de *Lutjanus griseus*, seleccionados al azar de un grupo de 200 reproductores que maduran sexualmente durante los meses de junio y agosto de cada año y se mantienen en un estanque de 10 x 50 x 0.80 m (400 m³). Los peces, según el tratamiento, se colocaron formando grupos en relación hembra:macho de 1:2 (con duplicado) en tanques rectangulares de 800 l con agua de mar filtrada y aireación constante. Dos grupos de peces fueron tratados con la hormona LH-RH en dosis de 30 ng/kg. pez para las hembras y 15 ng/kg. pez para los machos. En el caso de GCH se emplearon las dosis de 2 UI/g pez para las hembras y de 1 UI/g pez para los machos. Un quinto grupo se inyectó con 0.5 ml de suero fisiológico para hembras y de 0.25 ml para los machos. A partir de las 24 horas en cada tanque se inició el proceso de circulación continua de agua, cuya temperatura fue de 28 ± 2°C, permaneciendo la salinidad en 38 ‰. El desove con LH-RH se detectó entre las 38 y 46 horas después del tratamiento, los cuales produjeron un porcentaje de fertilización del 96 y 98%, la eclosión de las larvas fue 78 y 90% se presentó entre las 17 y 18 horas con un tamaño promedio de 2856.34 ± 137.10 µm. Además, se observó un 15 % de larvas con mal formación que murieron entre las 24 y 36 horas de haber eclosionado. Con GCH el desove se presentó en ambos grupos a las 52 y 70 horas, con un porcentaje de fertilización entre 65 y 90 %, la eclosión fue de 80 y 94 % con un 5 % de larvas mal formadas. No se detectó desove en aquellos grupos tratados solo con suero fisiológico. Para ambos casos las larvas abrieron la boca a partir de las 36 horas. Las larvas se alimentaron con una mezcla del rotífero *Brachionus plicatilis* y el copépodo *Oithona ovalis* en una relación de 8:6 rot:cop/ml. Las larvas obtenidas con GCH sobrevivieron hasta el día 25 y las nacidas en el desove con LH-RH alcanzaron la etapa de juvenil, alimentándose con zooplancton salvaje y juveniles de peces forrajeros. A los 120 días después del desove, el peso promedio es de 14.82 g.

PALABRAS CLAVES: *Lutjanus griseus*, LH-RH, GCH

Application of Two Types of Hormones in the Artificial Reproduction of the Mangrove Snapper, *Lutjanus griseus* L.

ABSTRACT

The use of hypophysis in the spawn induction of fish that sex matured in captivity started in Brazil more than 50 years ago. This technique has been highly modified, and in the actual time there are using many chemicals such as Clomifen, Perisol Sereno, etc. This research had been conducted using five females and ten males of *Lutjanus griseus*, selected from 200 spawners that reach sexual maturity from June to August every year and have been cultured in 400 m³ pond. Six groups of fish, two for treatment, each with one female and two males, were maintained in 800 l tanks with filtered seawater and air continuously. Two groups were treated with LH-RH, 30 ng/kg to female fish and 15 ng/kg to male fish. Two groups were treated with HCG, 2 IU/g to female fish and 1 IU/g to male fish. As a control two groups were treated with physiological sera, 0.5 ml for female and 0.25 ml for male. After 24 hours the water was renewed. The temperature was 28 ± 2 °C and the salinity 38‰. The fish groups treated with LH-RH spawned at 38 and 46 hours respectively after injection. The fertilization rates were 96 and 98%, and the hatch out rates were 78 and 90%, at 24 and 36 hours, respectively. The larvae average size was 2856.34 ± 137.10 µm. Fifteen percent of these larvae had malformations and died before 36 hours after hatching. The fish treated with HCG spawned at 52 and 70 hours respectively after injection. The fertilization rate were 65 and 90%, with 80 and 94% hatching rate. A 5% of the larvae had malformation and died. In the groups treated with physiological sera it was not detected spawn. First feeding occurred 36 hours after hatch out. The larvae were reared on a mixture of rotifer *Brachionus plicatilis* and the copepodite of *Oithona ovalis* (8: 6/ml). The larvae from HCG treatment diet at day 25, while the larvae from LH-RH groups reached juvenile stage, from then they have been feeding with wild zooplankton and bait fish. After 120 days from hatching the average weight was 14.8 g.

KEY WORDS: *Lutjanus griseus*, LH-RH, GCH

INTRODUCCION

La inducción al desove en los peces que maduran sexualmente en cautiverio por medio de concentrados de glándula hipófisis es una técnica de origen brasileño, la cual se ha modificado y perfeccionado, convirtiéndose en la

actualidad en la investigación de punta que ha permitido el avance de la piscicultura (Harvey y Hoar, 1980).

Posteriormente, se han usado otras hormonas, como la gonadotropina coriónica y sérica extraídas de la orina y el suero de hembra de mamíferos grávidos (Castagnolli y Cyrino, 1980), LH-RH (Crim *et al.*, 1988; Donalson y Hunter, 1985; García, 1993) GCH (Damas *et al.*, 1978; Manrique, 1988; Zanuy *et al.*, 1986; Prat *et al.*, 1987; James, 1993) mGnRH-A Buserelia (Muñoz, *et al.*, 1991) o GnRH-A (Marte *et al.*, 1988; Sorbera *et al.*, 1996), los cuales han sido estudiados como estimulantes de gametogénesis y de maduración completa en gónadas de peces.

En peces marinos la inducción a la puesta mediante el uso de hormonas ha garantizado la producción masiva de larvas (Gómez, 1983, Carrillo *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.*, 1994 ; Carrillo *et al.*, 1995; Lisaann *et al.*, 1996).

En Venezuela se efectúa actualmente un esfuerzo importante para el desarrollo de una acuicultura con objetivos comerciales (Cabrera, 1996) recibiendo mayor atención las especies de origen exótico, debido a que sus cultivos tienen una tecnología disponible y garantía de los productos en el mercado de consumo, dejando las especies ícticas autóctonas a un segundo plano. Esto debido a la carencia de recursos financieros que permitan la investigación multidisciplinaria para determinar la potencialidad de aquellas especies de significado en acuicultura y por ende de importancia comercial.

Desde 1990 se realizan esfuerzos en el cultivo del róbalo *Centropomus undecimalis*, la lisa *Mugil curema*, el lebranche *Mugil liza* y el pargo de mangle *Lutjanus griseus* (Millán, 1992), logrando en esta última especie identificar su potencialidad de cultivo (Millán *et al.*, 1992; León *et al.*, 1996) así como de inducirlo a la puesta mediante el uso de GCH (Rosas *et al.*, 1995; Rosas *et al.*, 1996; Cabrera *et al.*, 1997). El presente trabajo presenta los resultados producidos por la inducción al desove de *L. griseus* mediante las hormona Profasi (Gonadotropina Coriónica Humana) altamente purificada (HC6) y la hormona luteinizante de la hormona liberadora (LH-RH).

MATERIALES Y METODOS

Para realizar esta experiencia se seleccionó al azar cinco ejemplares hembras y diez machos de *L. griseus* procedentes de un grupo de reproductores que anualmente maduran sexualmente entre los meses de junio y agosto en los tanques de cultivo. Luego fueron anestesiados con MS 222 a fin de evaluar la madurez sexual de las hembras, mediante el método de canulación interovárica, descrito en Rodríguez (1992). La actividad espermática de los machos se evaluó tomando 0.1 ml de esperma diluida 10 veces en agua de mar a la salinidad de 38 ‰, usando para ello una cámara Neubauer. Identificados sexualmente los peces, se procedió a pesarlos en una balanza electrónica de 0,1 g de apreciación, luego se

colocaron individualmente en recipientes de 50 l con agua de mar filtrada y esterilizada mediante UV.

La experiencia de inducción al desove con la hormona LH-RH, se diseñó, en función de seleccionar al azar una hembra para cada dos macho (1:2), a la cual con inyectadoras tipo insulina se inyectó formando un ángulo de 45° por encima de la línea lateral en dirección a la tercera espina dorsal una dosis de 30 ng/kg. pez (con réplica). A los machos se les inyectó una dosis de 15 ng/kg. pez. Los peces tratados con Profasi, recibieron similar tratamiento a los anteriores, siendo la dosis de 2 UI/g pez para las hembras y de 1 UI/g pez para los machos. A un quinto grupo de peces se les inyectó 0.5 ml de suero fisiológico a los ejemplares hembras y 0.25 ml a los machos. Cada tratamiento fue realizado con una réplica.

Los peces inyectados separados por grupos se colocaron en tanques de 800 l de capacidad con agua filtrada y esterilizada mediante luz ultravioleta y aireación continua. A partir de las 24 horas se revisó el agua de cada tanque donde se ubicaron los reproductores, mediante el uso de un tamiz de 250 µm de apertura de malla que se pasaba a nivel superficial del agua de cada tanque. Paralelamente se registró la temperatura, mediante un termómetro de 0.1°C de apreciación y la salinidad con un salinómetro de 0.1 mg de apreciación.

Cuando ocurrió el desove, se detuvo el flujo de agua y la aireación, y con un tamiz rectangular de 450 µm se procedió a colectar los huevos flotantes. Los huevos se colocaron en recipientes de plásticos de 5 l de capacidad para cuantificar la cantidad de huevos desovados en cada grupo de peces y el porcentajes de fertilización, igualmente se tomaron alicuotas de 50 huevos para medir su diámetro y el de la gota de aceite. Posteriormente los huevos se lavaron con agua de mar con oxitetraxiclina a 25 ppm. Durante 5 minutos con abundante agua de mar filtrada y esterilizada, colocando posteriormente los huevos fértiles, de acuerdo a su tratamiento, en recipientes cónicos de vidrio de 14 l de capacidad con flujo continuo de agua. Después de ocurrir la eclosión de las larvas, estas se trasladaron a unos tanques de 1,800 l, la cantidad de larvas fue de 70 a 80 larvas/l, según el tratamiento. A partir de los 60 días se tomaron 50 larvas por tratamiento para medir su longitud, siguiendo la metodología descrita en Damas *et al.*, (1979). En cada tanque de desove se procedió a colectar, mediante sifoneo, los huevos no fertilizados y/o muertos que se depositan en el fondo, con la finalidad de contarlos y establecer la totalidad de huevos desovados y fertilizados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las hembras de *L. griseus* que fueron canuladas mediante el método interovárico (Rodríguez, 1992) y posteriormente tratadas con la hormona LH-RH presentaron un tamaño promedio de 456.17 ± 21.45 µm y las seleccionadas para ser inducidas con GCH, sus ovocitos antes de la inducción tenían un tamaño promedio de 460.25 ± 18.56 µm. Damas *et al.* (1978) no indican resultados

sobre el tamaño de los ovocitos en *L. griseus* antes de la inducción al desove empleando GCH. En relación a los machos tratados con ambas hormonas, sus espermias al ser activada presentaron una motilidad de hasta el 90%, cesando sus movimientos en un lapso de 3 a 5 minutos.

En los peces tratados con LH-RH los huevos son pelágicos y transparentes y tenían un tamaño de $770.55 \pm 19.72 \mu\text{m}$ presentando entre una y tres gotas de aceite cada una de un tamaño promedio de $153.46 \pm 14.43 \mu\text{m}$. Los huevos con más de una gota de aceite no fueron viables. Los huevos obtenidos luego de la inducción con Profasi (GCH) poseían características similares con un diámetro promedio de $748.60 \pm 18.35 \mu\text{m}$ y la gota de aceite de $142.50 \pm 13.43 \mu\text{m}$, el número de gotas de aceite fue igual cuando se realizó la inducción con LH-RH. El diámetro de ambos grupos de huevos, así como el de la gota de aceite se encuentran entre los rangos señalados por Damas *et al.* (1978) lo que significa que en *L. griseus* sus huevos fértiles poseen características similares aún con la distancia geográfica que los separa.

De las larvas que eclosionaron procedentes de los reproductores tratados con la hormona LH-RH, un 15% presentaron malformaciones tales como aleta caudal incompleta o formando bandas esféricas o notocordio con ondulaciones. Igualmente se observaron hasta nueve proyecciones parecidas a espinas a nivel de la parte anterior de la futura boca, a nivel medio y en la parte lateral, las cuales disminuyeron a medida que transcurría el tiempo de desarrollo larvario, muriendo entre las 24 y 36 hora.

Las larvas procedente del tratamiento con GCH, presentaron similares síntomas, pero en un grado menor, 5%, muriendo en igual tiempo. Sin embargo esta larvas eran mas susceptibles al manipuleo, presentando mortalidades al momento de aumentar el intercambio de agua 1 a 2 horas después de agregar el alimento, o al colocar el fluido de aire cuando este era suspendido para sifonear el fondo. Sin embargo las larvas carecieron de proyecciones, y su tracto digestivo presentaba contenidos alimenticios similares formados por las microalgas *Tetraselmis chunii*, *Brachionus plicatilis* y el copépodo *Oithona ovalis*. Observaciones similares fueron señaladas por Cabrera *et al.* (1997)

Las larvas presentan movimientos desorientados y lentos, permaneciendo en la mayoría de los casos con el saco vitelino orientado hacia el fondo de los tanques. A partir de las 36 horas de nacidas, a la temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ y salinidad de 38 ‰ las larvas tienden a ser gregarias, nadando en espiral y en cardumen. Al quinto día se presentó una mortalidad entre el 65 y 70%, posiblemente relacionada con el proceso de llenado de aire de la vejiga natatoria o a que se aumentan los requerimiento nutricionales de la larva.

La renovación diaria del agua vario entre 120 y 250%. Para ello fue necesario un monitoreo cada cinco hora del alimento suministrado, manteniendo siempre los rotíferos y copépodos 6:8 piezas/ml y la microalgas a 25,000

cel./ml. Es de destacar que los rotíferos y copépodos fueron enriquecidos con una mezcla de Topal, Microfeast, *Spirulina maxima* y aceite de hígado de bacalao (Tabla 1), por espacio de seis horas.

Al sexto día las larvas ingestan copepoditos del copépodo *Oithona ovalis* y del rotífero *Brachionus plicatilis*. Los rotíferos ingeridos son de fácil cuantificación debido a la presencia de su mastax en el tracto digestivo, llegando a contabilizar hasta 10 mastax. Los copépodos se observaron cuando las larvas se sacrificaron en presencia únicamente de copepoditos como alimento, igualmente se ha observado en su tracto digestivo la presencia de la microalga *Tetraselmis chuii*, pero sin presentar ninguna degradación mecánica o química.

Tabla 1. Mezcla utilizada en el enriquecimiento de rotíferos y copépodos

Producto	Peso (mg)	Vol. (ml)
Topal	360	
Microfeast	360	
<i>S. maxima</i>	360	
Aceite Hígado De Bacalao		1

La concentración de alimento (rotíferos y copépodos) se mantuvo en similares concentraciones para ambos grupos de larvas, sin embargo la mayor mortalidad siempre ocurrió en las larvas obtenidas a partir de la GCH, las cuales sobrevivieron hasta el día 25. No así, las obtenidas con LH-RH de la cual se obtuvieron las larvas hasta el estado de juvenil. Las larvas fueron alimentadas a partir de día 35 con adultos de *Artemia*, enriquecidos con la dieta formulada y señalada para los copépodos y rotíferos. Este tipo de zooplancton se mantuvo hasta el día 60 cuando se inició la alimentación con zooplancton salvaje *Metamysidosis insularis*, que ha sido utilizado anteriormente en la alimentación de paguara *Chaetodipterus faber* y sargo rayado *Archosargus rhomboidalis* (Cabrera *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 1993). A llegar a la etapa juvenil el peso promedio fue de 2.80 ± 1.25 g; longitud total de 5.27 ± 0.86 cm y longitud estándar de 4.47 ± 0.70 cm se alimentaron con peces forrajeros *Ciprinodon dearborni*.

El peso promedio de los juveniles a los 120 días de nacidos fue de 14.82 ± 4.71 g, presentando una longitud total de 9.5 ± 1.05 cm y longitud estándar de 7.93 ± 0.60 cm.

LITERATURA CITADA

- Cabrera B.,T., C.J. Rosas y Q.J.. Millán. 1997. Reproducción y desarrollo larvario del pargo dientón (*Lutjanus griseus* L. 1758) (Pisces:

- Lutjanidae) cultivado en cautiverio. *Caribbean Journal of Science* 33(3-4):239 - 245.
- Carrillo, M., N. Bromage, S. Zanuy, R. Serrano y J. Ramos. 1991b. Egg quality and fecundity in the sea bass (*Discentrarchus labrax*) and the effects of photoperiodically-induced advances and delay on spawning time. Pages 256-261 In: A. Scott, P. Sumpter, D. Kime y M. Rolfe (Eds.) *Proceeding of the international Symposium on the reproductive Physiology of Fish. Fish. Symp.*
- Crim, L., N. Sherwood and C. Wilson. 1988b. Sustained hormone release. II. Effectiveness of LHRH-analogue (LHRHa) administration by either single injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. *Aquaculture* 74:87 - 95
- Damas, M., N. Borrero, Millares y E. González. 1978. Desarrollo embrionario y prelarval del caballero (*Lutjanus griseus* Linné, 1758). *Rev. Cub. Inv. Pesq.* 3(4) :56 - 63
- Donaldson, E. and G. Hunter. 1985. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. Pages 351-403 In: W.S.Harvey, D.J. Randall y E.M.Donaldson. (Eds.) *Fish Physiology* vol.9b. Academic Press, New York.
- García, L. 1993. Sustained production of milt in rabbitfish, *Siganus guttatus* Bloch, by weekly injection of luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa). *Aquaculture* 113:261 - 267.
- Harvey, B. y W. Hoar. 1980. Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces. Ottawa, Ont., CIID. 48p.
- León R., J. Millán y S.L. León. 1996. Cultivo experimental del pargo dientón (*Lutjanus griseus*) en estanques. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente* 35(1&2):9 - 15.
- Millán Q., J. 1992. Policultivo de peces marinos. Isla de Margarita. Venezuela. Trab. de Ascenso para prof. Titular. Universidad de Oriente. Núcleo de Nueva Esparta. Instituto de Investigaciones Científicas. 97 p.
- Millán Q., J.; C. Amundaray y A. Gómez. 1992. Cultivo experimental del pargo dientón *Lutjanus griseus* (Pisces: Lutjanidae) en estanques. Mem. VII Simp. Lat. Acui. II Encuentro Venez. Acui. Barquisimeto. Venezuela. p. 191-200.
- Muñoz, D., P. Cruz y W. Vásquez. 1991. Reproducción inducida de la cachama blanca *Piaractus brachypomum* con mGnRH-A. *Aquaculture* 5(3) :130 - 145
- Prat, F., S. Zanuy y M. Carrillo. 1987. Effects of LH-RH analog alone or combined with pimozyde on plasma sex steroids, egg quality and spawning of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) *General and Comparative*

Endocrinology 66:21 - 2.

- Sorbera, L., C. Costadinos, S. Zanuy, M. Carrillo y Y. Zohar. 1996. Sustained administration of GnRH α increases mil volume without altering sperm counts in the sea bass. *The Journal of Experimental Zoology* 276:361.
- Zanuy, S., M. Carrillo y F. Ruiz. 1986. Delayed gametogenesis and spawning of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) kept under different photoperiod and temperature regimes. *Fish Physiology and Biochemistry* 2:1 - 4.
- Zanuy, S., N. Bromage, M. Carrillo, F. Prat. y R. Serrano. 1991b. Endogenous circannual rhythms and the control of reproduction in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Page 175 in: A. P. Scott, J.P.Sumpster, D.E.Kime and M.S.Rolfe (eds.) Proceedings of the fourth international symposium on the reproductive physiology of fish. Fish. Symp. 91. Sheffield, England.