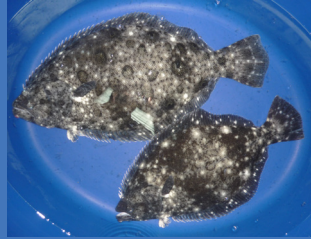


FINCyT
innovación • ciencia • tecnología



COMPENDIO METODOLÓGICO PARA LA REPRODUCCIÓN DE “LENGUADO” *Paralichthys adspersus* EN CAUTIVERIO

**Proyecto Producción de semilla del Lengüado
Paralichthys adspersus en cautiverio:
I Mejoramiento de la calidad y cantidad de desoves.
Contrato N° 051-FINCyT-PIBAP-2009**

Lili Carrera S.
Noemí Cota M.
Melissa Montes M.
2013



AUTORES

Ing. Lili Carrera Santos *

Blga. Noemí Cota Mamani

Blga. Melissa Montes Montes

(*) Correo de contacto
lcarrera@imarpe.pe

**Laboratorio de Cultivo de Peces
Dirección General de
Investigaciones en
Acuicultura.
Instituto del Mar del Perú**

Esq. Gamarra y Gral. Valle S/N
Chucuito - Callao
Perú
<http://www.imarpe.pe/imarpe/>

AÑO DE EDICIÓN.
01 - 2013

AGRADECIMIENTO

Quisiéramos expresar nuestro más sincero agradecimiento al programa FINCyT (Financiamiento para la Innovación, Ciencia y Tecnología), ejecutado por la Presidencia del Consejo de Ministros (PCM), que con fondos del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), mediante el financiamiento en la modalidad de Proyectos de Investigación Básica, Aplicada y Precompetitiva (PIBAP), contribuyó con la realización del proyecto “Producción de semilla del lenguado *Paralichthys adspersus* en cautiverio: I Mejoramiento de la calidad y cantidad de desoves”, el mismo que fue aprobado mediante Contrato N° 051-FINCyT-PIBAP-2009” y cuyo producto es el presente compendio.

Al Instituto del Mar del Perú (IMARPE) por apoyar este proyecto como entidad ejecutora y brindar todas las facilidades y el equipamiento del Centro de Investigaciones Alexander Von Humboldt para el desarrollo del presente proyecto.

A las entidades colaboradoras que formaron parte de este proyecto como son el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Baja California (CICESE) de México con la participación de la Dra. Carmen Paniagua y el Instituto de Investigación y Tecnologías Agroalimentarias (IRTA) de España con la participación de la Dra. Alicia Estévez.

Este compendio metodológico denominado “Reproducción de Lenguado *Paralichthys adspersus* en cautiverio” fue elaborado con el aporte de los profesionales que participaron inicialmente en el presente proyecto, por lo que también se hace extensivo el agradecimiento al M.Sc. Carlos Espinoza y al Ing. Christian Catcoparco.

Así mismo, a los profesionales de los diferentes laboratorios del IMARPE que de una u otra manera contribuyeron con el desarrollo del proyecto, entre ellos: Blgo. Ángel Perea del Laboratorio de Biología Reproductiva, M.Sc. Carla Aguilar y Qco. Leenin Flores del Laboratorio de Biotecnología Acuática y Tec. Cristian Santos del Laboratorio de Cultivos Marinos.

Un agradecimiento especial a la doctora María Elena Jacinto Coordinadora de Apoyo Científico, quien realizó las revisiones y brindo el sustento para la redacción del presente documento.

PRESENTACIÓN

Según la información proporcionada por la FAO (2010), la acuicultura continúa siendo el sector productivo creciente, vigoroso e importante de alimentos ricos en proteínas. La producción acuícola mundial de pescado comestible, incluidos peces de aleta, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos destinados al consumo humano, alcanzó los 52,5 millones de toneladas en el 2008. El resultado combinado del desarrollo de la acuicultura en todo el mundo y la expansión de la población mundial es que, el suministro per cápita medio anual de pescado comestible procedente de la acuicultura para el consumo, se multiplicó por diez y pasó de 0,7 kg en 1970 a 7,8 kg en 2008, lo que supone un incremento medio del 6,6 % anual.

De acuerdo a la Ley de Promoción y Desarrollo de La acuicultura N° 27460, en su reglamento menciona en el artículo N° 7, la definición de la acuicultura como el conjunto de actividades tecnológicas orientadas al cultivo o crianza de especies acuáticas que abarca su ciclo biológico completo o parcial y se realiza en un medio seleccionado y controlado, en ambientes hídricos naturales o artificiales, tanto en aguas marinas, dulces o salobres. Se incluyen las actividades de poblamiento o siembra y repoblamiento o resiembra, así como las actividades de investigación y el procesamiento primario de los productos provenientes de dicha actividad.

En tal sentido, el proceso productivo involucra la selección de los organismos reproductores para obtención de “semilla”, pasando por las diferentes etapas o fases de cultivo (reproducción, desarrollo larval, pre engorde y engorde) con la finalidad de llegar a tallas comerciales de acuerdo a las exigencias del mercado. Por lo tanto, dos son las herramientas imprescindibles para el desarrollo de proyectos comerciales en acuicultura: la biológica y la económica.

Por lo tanto, el desarrollo del presente compendio metodológico tiene la finalidad de recoger las experiencias realizadas en el proyecto: **“Producción de semilla del lenguado *Paralichthys adspersus* en cautiverio: I Mejoramiento de la calidad y cantidad de desoves”- Contrato N° 051-FINCyT-PIBAP-2009**”, donde se describen los procedimientos relacionados a la reproducción de esta especie en condiciones de cautiverio.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC%:	Alimento consumido en porcentaje.
AA:	Alimento administrado.
ANC:	Alimento no consumido.
B:	Biomasa.
FCA:	Factor de conversión alimenticia.
RGR:	Tasa de crecimiento relativo.
SGR:	Tasa de crecimiento específico.
BWi:	Peso total inicial en gramos.
BWf:	Peso total final en gramos.
Tf	Tiempo final en días.
Ti:	Tiempo inicial en días.
%G:	Porcentaje de lípidos totales en la muestra.
V2:	Peso del vial con los lípidos totales seco (g).
V1:	Peso del vial vacío (g).
W:	Peso de la muestra (g).
Ci:	Peso del metilester i (mg).
Cs:	Peso del estándar (mg).
Ai:	Área del pico del componente i.
As:	Área del pico del estándar.
PF:	Porcentaje de Fecundación.
PE:	Porcentaje de Eclosión.
N:	Promedio del número de espermatozoides.
EV:	Espermatozoides viables.
ENV:	Espermatozoides no viables.
CE:	Concentración espermática.
% Viab.:	Viabilidad Espermática.

LISTA DE FIGURAS

- Figura N° 1: Zonas de captura donde se colectaron los peces para el proyecto.
- Figura N° 2: Materiales para colecta.
- Figura N° 3: Captura con atarraya.
- Figura N° 4: Ejemplar capturado.
- Figura N° 5: Juveniles de lisas.
- Figura N° 6: Anchoqueta en trozos.
- Figura N° 7: Ración de alimento semi-húmedo.
- Figura N° 8: Alimentación con alimento semi-húmedo.
- Figura N° 9: Escáner e identificador electrónico.
- Figura N° 10: Colocación del identificador electrónico.
- Figura N° 11: Lectura del identificador electrónico.
- Figura N° 12: Canulación.
- Figura N° 13: Presión abdominal.
- Figura N° 14: a) Tanque de cultivo y de recepción de peces (2m³) y b) Tanque de 2m³ con los peces.
- Figura N° 15: Lectura del identificador electrónico.
- Figura N° 16: Medición del peso.
- Figura N° 17: Medición de la longitud total.
- Figura N° 18: Desinfección de las petequias con povidona.
- Figura N° 19: Poro genital de la hembra.
- Figura N° 20: Biopsia ovárica.
- Figura N° 21: Muestra de ovocitos en la cánula.
- Figura N° 22: Muestra de ovocitos en la lámina.
- Figura N° 23: Mesa de trabajo con láminas portaobjetos.
- Figura N° 24: Muestra de ovocitos.
- Figura N° 25: Análisis de las láminas.
- Figura N° 26: Inyección de Hormona.
- Figura N° 27: Pistola con pellets hormonales.
- Figura N° 28: Inyección de pellets hormonales.
- Figura N° 29: Muestras de huevos y larvas.
- Figura N° 30: Muestras de huevos y larvas en el homegenizador.
- Figura N° 31: Filtrado de la muestra.
- Figura N° 32: Lípidos totales.
- Figura N° 33: Transmetilación.
- Figura N° 34: Viales con tapa de teflón.
- Figura N° 35: Cromatógrafo de gases.
- Figura N° 36: Cromatograma.
- Figura N° 37: Colecta de huevos.
- Figura N° 38: Tamiz de 500 µm con huevos.
- Figura N° 39: Separación de huevo flotantes y no flotantes.
- Figura N° 40: Muestreo en Placa de 96 pocillos.

LISTA DE FIGURAS



- Figura N° 41: Muestra para extracción de lípidos.
- Figura N° 42: Extracción de muestra de semen.
- Figura N° 43: Diluciones en la cámara de cultivo celular.
- Figura N° 44: Disposición de cuadrículas de la cámara de Neubauer para determinación de concentración (verde) y motilidad espermática (rojo).
- Figura N° 45: Análisis de motilidad espermática en el microscopio.
- Figura N° 46: Kit de viabilidad espermática.
- Figura N° 47: Evaluación de viabilidad espermática con el Kit LIVE/DEAD® en el Microscopio de Epifluorescencia.
- Figura N° 48: Espermatozoides viables y no viables.
- Figura N° 49: Preparación de lámina portaobjeto (frotis con Eo-Nig).
- Figura N° 50: Evaluación de viabilidad con Eo-Nig en el microscopio.
- Figura N° 51: Espermatozoides teñidos con Eo-Nig.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iii
PRESENTACIÓN.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
CAPTURA DE EJEMPLARES.....	1
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/CE.....	2
ALIMENTACIÓN.....	5
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/A.....	6
MARCAJE Y SEXADO.....	11
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/MS.....	12
MUESTREO BIOMÉTRICO.....	15
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/MB.....	16
BIOPSIA OVÁRICA.....	20
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/BO.....	21
SEGUIMIENTO DE MADUREZ GONADAL DE HEMBRAS.....	24
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/SMGH.....	25
INDUCCIÓN HORMONAL.....	29
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/IH.....	30
DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES DE HUEVOS Y LARVAS.....	33
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/DLTHL.....	34
DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE HUEVOS Y LARVAS.....	37
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/DAGHL.....	38
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE PUESTAS.....	41
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/ECP.....	42
EXTRACCIÓN DE MUESTRA E EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE SEMEN.....	46
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/EMECS.....	47
VARIABILIDAD ESPERMÁTICA TINCIÓN LIVE/DEAD SPERM VIABILITY KIT.....	51
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/VETL/D.....	52
VIABILIDAD ESPERMÁTICA TINCIÓN EOSINA/NIGROSINA.....	56
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/VETE/N.....	57

CAPTURA DE EJEMPLARES

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/CE

	INSTRUCTIVO		Revisión: 00
	CAPTURA DE EJEMPLARES		Fecha: Enero, 2013 Página: 1 de 3 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/CE

CAPTURA DE EJEMPLARES

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/CE

1. OBJETIVO

Establecer las pautas a considerar en la formación de un lote de reproductores del lenguado *P. adspersus*, destinados a la reproducción en cautiverio.

2. FUNDAMENTO

La captura de ejemplares vivos del medio natural en buenas condiciones sanitarias, que garantice un plantel de reproductores con los cuales se lleve a cabo las experiencias de desoves naturales e inducidos.

3. REFERENCIAS

HERRERA M, HACHERO I, PRADO M A, MÁRQUEZ J M, NAVAS J I. 2003. Resultados preliminares sobre aclimatación y mantenimiento en cautividad de reproductores de lenguado (*Solea senegalensis*), parracho (*Scophthalmus rhombus*) y acedia (*Dicologlossa cuneata*) en el CICEM Agua del Pino, Huelva. IX Congreso Nacional de Acuicultura, 438-440.

SILVA A & OLIVA M. 2010. Revisión sobre aspectos biológicos y de cultivo del lenguado chileno (*Paralichthys adspersus*). Latin American Journal of Aquatic Research, 38(3): 377-386.

4. TERMINOLOGÍA

Atarraya: es un arte de pesca en forma circular, operada por una sola persona desde una embarcación o desde tierra. Posee diámetros de abertura que fluctúan entre dos y cuatro metros, con una altura de dos a tres metros. El peso varía con el tamaño y este a su vez depende de la capacidad y habilidad del pescador. La selectividad de este aparejo está dada por el tamaño de malla estirada que varía desde 1" a 5".

Captura: detención o aprehensión de peces en el agua en diferentes estadios para su posterior cría en cautiverio.

Reproductor: especímenes de ambos sexos, maduros sexualmente, mantenidos para llevar a cabo la reproducción en condiciones controladas.

5. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1 MATERIALES

- Acondicionador de agua (Aquasafe) (Neutralizador de cloro y metales pesados)
- Piedra zeolita (controlador de amonio)
- Termómetro de alcohol
- Bolsas de hielo
- Tanque de 300 L con tapa
- Baldes de 20 L
- Jarras de 2 L
- Manguera de 3/16"
- Piedras difusoras de aire (12 cm)
- Redes de mano
- Balón de oxígeno

5.2 EQUIPOS

- Oxímetro Thermo Scientific Orion 3 Star
- pH-metro Hanna HI-98160
- Compresora de aire de 12 V

6. PROCEDIMIENTO

- Preliminarmente, se verifica que las condiciones del clima y del mar (tabla de mareas, presencia de vientos e intensidad de los oleajes) sean las adecuadas, así como las condiciones in situ reportadas por los pescadores artesanales en la zona de captura (figura N° 1).
- Las condiciones del mar se verifican en la zona de playa (de preferencia arenosa) y con la asistencia de los pescadores artesanales se decide el lugar e inicio de las capturas.
- El tanque de 300 L se utiliza para recepcionar a los peces, colocando 150 L de agua de mar, un difusor de aire para mantener la aeración constante, acondicionador de agua (AQUASAFE) para disminuir el estrés en los peces (5 mL/40 L) y 100 g de piedras zeolita (figura N° 2).
- En la zona seleccionada se lanza la red "atarraya" (figura N° 3) y cada vez que un pez es extraído, inmediatamente se coloca en balde de 20 L con agua y se traslada al tanque de 300 L.
- Una vez colectados un promedio de 10 peces (figura N° 4), se procede al traslado de los ejemplares hasta las instalaciones de

- IMARPE. Durante el trayecto, se monitorea en el tanque de colecta la temperatura y el oxígeno, los cuales deben mantenerse por debajo de 16°C y por encima de 8 mg/L respectivamente. En caso contrario, utilizar bolsas de hielo y proveer oxígeno del balón correspondiente.
- En el Laboratorio de Cultivo de Peces del IMARPE, los peces se colocan en tanques de 2,5 m³ de capacidad, cubiertos con geomembrana de color negro y con sistema de iluminación programable, para su acondicionamiento al cautiverio.
 - De los peces capturados, se separa al menos un pez por cada día de colecta para su disección; con la finalidad de obtener muestras para los análisis parasitológico y de madurez gonadal.
 - Los datos de los peces capturados, se anotan en la ficha de colecta

7. REGISTRO

Nombre: Laboratorio de Cultivo de Peces

Código: F-CP-01.01/CE

Fecha:

Responsable:

Ficha de colecta de lenguado *Paralichthys adspersus*

Fecha	N° pez	Lugar de captura	Longitud Total (cm)	Peso Total (g)	Observaciones



Figura N° 1. Zonas de captura donde se colectaron los peces para el proyecto.



Figura N° 2. Materiales para colecta.



Figura N° 3. Captura con atarraya.




Figura N° 4. Ejemplar capturado.



ALIMENTACIÓN

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/A

	INSTRUCTIVO		Revisión: 00
	ALIMENTACIÓN		Fecha: Enero, 2013 Página: 1 de 5 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/A

ALIMENTACIÓN DE REPRODUCTORES

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/A

1. OBJETIVO

Establecer las pautas a seguir para la preparación y suministro de alimento a los reproductores de lenguado *P. adspersus*.

2. FUNDAMENTO

La nutrición y alimentación son puntos críticos en el acondicionamiento de reproductores de peces en condiciones de cautiverio, generalmente la calidad de la dieta está estrechamente relacionada con la calidad de huevos y larvas, todo ello condicionado con el manejo de parámetros físico-químicos que mantengan la calidad del agua de cultivo, para garantizar las óptimas condiciones de los reproductores.

El conocimiento de la conducta alimentaria y la ingesta de alimentos en los peces en cultivo son puntos claves para diseñar estrategias precisas para la alimentación, maximizar la ingesta y minimizar los residuos de los alimentos.

3. REFERENCIAS

ÁRNASON J, IMSLAND A K, GÚSTAVSSON A, GUNNARSSON S, ARNARSON I, REYNISSON H, JÓNSSON A F, SMÁRADÓTTIR H, THORARENSEN H. 2009. Optimum feed formulation for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): Minimum protein content in diet for maximum growth. *Aquaculture* 291: 188-191.

BOLUDA D, RUBIO V C, LUZ R K, MADRID J A, SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F J. 2009. Daily feeding rhythms of Senegalese sole under laboratory and farming conditions using self-feeding systems. *Aquaculture* 291: 130–135.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). 2008. *Glosario de Acuicultura*. 401 pp.

SILVA A & OLIVA M. 2010. Revisión sobre aspectos biológicos y de cultivo del lenguado chileno (*Paralichthys adspersus*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 38(3): 377-386.

4. TERMINOLOGÍA

Alimentación: es la ingestión de alimento por parte de los organismos para proveerse de sus necesidades alimenticias, fundamentalmente para conseguir energía y desarrollarse. No hay

que confundir alimentación con nutrición, ya que esta última se da a nivel celular y la primera es la acción de ingerir un alimento. La nutrición puede ser autótrofa o heterótrofa.

Nutrición: conjunto de funciones por medio de las cuales la célula toma alimentos del medio externo, los transforma, los incorpora a su protoplasma, y de esta manera repone sus pérdidas materiales y energéticas que tiene durante sus funciones vitales.

Ración de alimento: cantidad de alimento suministrada a un animal.

Biomasa: el peso total vivo de un grupo de organismos vivos o de alguna fracción definida de éste, en un área, en un tiempo determinado.

5. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1 MATERIALES



- Recipiente de plástico de 10 L
- Tabla de picar
- Cuchillo doméstico
- Bolsas de plástico 12 x 17"
- Jeringas de 1 mL.
- Tanques de 300 L

5.2 EQUIPOS

- Balanza eléctrica Mettler Toledo (Cap. Max. 3 kg; Precisión: 0,1 g)
- Peletizadora eléctrica (placa con cribas de 15 mm)
- Congeladora eléctrica horizontal Miray (Capacidad: 100 L)
- Licuadora doméstica.

5.3 INSUMOS

- Lisas y/o pejerrey vivos
- Anchoeta fresca
- Ingredientes para el alimento semihúmedo (anchoveta, calamar gigante, harina de pescado, harina de krill, harina de trigo, attractante y multivitamínico en polvo (con sales minerales y aminoácidos), aceite de pescado

	INSTRUCTIVO		Revisión: 00
	ALIMENTACIÓN		Fecha: Enero, 2013 Página: 2 de 5 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/A

5.4 REACTIVOS

- Solución de povidona al 0,1% (diluido en agua de mar)
- Multivitamínico de uso veterinario "Aminoplex Forte", frasco por 250 mL

6. PROCEDIMIENTO

6.1 ALIMENTACIÓN CON LISAS Y/O PEJERREY VIVOS

6.1.1 Preparación del alimento:

- Se adquiere lisas juveniles vivas o en caso contrario pejerreyes de una talla aproximada de 10 cm, provenientes de la pesca artesanal de la zona del Callao
- Se colocan en un tanque de 300 L con agua de mar y se realiza recambios continuos de agua (entrada y salida), para disminuir el estrés al cautiverio, lo cual hace que excreten y se evite la contaminación del agua en cultivo. Posteriormente se los mantiene con recambios diarios de agua (figura N° 5).
- El día que se va a suministrar como alimento, se desinfectan en una solución de povidona al 0,1% por un tiempo de 5 minutos.
- Luego se pesan de acuerdo a la ración asignada (2,5% de la biomasa) a cada tanque de cultivo

6.1.2 Alimentación:

- A cada individuo se le corta un pedazo de las aletas pectorales o de la aleta caudal (a fin de facilitar su captura por los peces) y se les inyecta 0,05 mL del multivitamínico.
- Al día siguiente, se contabiliza el número de presas que aún quedan vivas en los tanques de cultivo.
- Los datos son anotados en la ficha de control respectiva.

6.2 ALIMENTACIÓN CON ANCHOVETA CONGELADA

6.2.1 Preparación del alimento:

- Las anchovetas frescas son evisceradas y cortadas por la mitad y se enjuagan con agua dulce (figura N° 6).
- Los trozos de anchoveta limpios se pesan de acuerdo a la ración total diaria, se embolsan para luego ponerlo en la congeladora para

su conservación.

6.2.2 Alimentación:

- El día que se alimenta, se descongela una bolsa y se pesa una ración del 2,5% que corresponde a la biomasa de cada tanque y se va suministrando lentamente.
- Al día siguiente, se colecta el alimento no consumido para ser pesado y se anota en la respectiva ficha de control.



6.3 ALIMENTO SEMIHÚMEDO

6.3.1 Preparación del alimento:

- Los insumos como: anchoveta (24%) y calamar gigante frescos o congelados (10%), son eviscerados y cortados para obtener sólo el músculo, para luego ser licuados.
- En un recipiente de 10 L se coloca la mezcla húmeda y se le agrega las ingredientes secos como: harina de pescado (35%), harina de krill (10%), harina de trigo (12%), atráctante (betaína, 1%) y multivitamínico en polvo (con sales minerales y aminoácidos, 3%), se mezcla todo manualmente y finalmente se agrega el aceite de pescado (5%).
- Se pasa la masa por la pelletizadora con un diámetro de criba de 15 mm, de manera que permita obtener un pellet semihúmedo de forma cilíndrica.
- Los pellets semihúmedos se embolsan según cada ración diaria y se guardan en el congelador hasta el momento de su uso.

6.3.2 Alimentación:

- Se descongela la ración que corresponde al día a temperatura ambiente.
- Se pesa la ración 2,5% de la biomasa que corresponde a cada tanque de cultivo (figura N° 7) y se suministra lentamente para que sea aprovechado por los peces y no se deposite en el fondo del tanque (figura N° 8)
- Al día siguiente, se retira los pellets no consumidos y se pesan para el control en la ficha correspondiente.

	INSTRUCTIVO	 FINCyT <small>innovación • ciencia • tecnología</small>	Revisión: 00
	ALIMENTACIÓN		Fecha: Enero, 2013 Página: 3 de 5 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/A

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

a) Evaluación del alimento consumido:

$$AC \% = \frac{AA (g) - ANC (g) * 100}{B (g)}$$

b) Factor de conversión alimenticia:

$$FCA = \frac{\text{Alimento suministrado (g)}}{\text{Incremento en Peso (g)}}$$



INSTRUCTIVO

ALIMENTACIÓN



Revisión: 00
Fecha: Enero, 2013
Página: 4 de 5
Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/A

8. REGISTRO

Nombre: Laboratorio de Cultivo de Peces

Código: F-CP-01.01/A

Fecha:

Responsable:

Ficha de control de alimentación diaria

Fecha	Hora	N° Tanque	Alimento suministrado	N° pellets o alim. vivo	Peso alimento (g)	Alimento no ingerido (g)	Observaciones



Figura N° 5. Juveniles de lisas.



Figura N° 6. Anchoveta en trozos.





Figura N° 7. Ración de alimento semihúmedo.



Figura N° 8. Alimentación con alimento semihúmedo.

MARCAJE Y SEXADO

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/ MS

	INSTRUCTIVO		Revisión: 00
	MARCAJE Y SEXADO		Fecha: Enero, 2013 Página: 1 de 3 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/MS

MARCAJE Y SEXADO

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/MS

1. OBJETIVO

Establecer un procedimiento a seguir para el registro e identificación del sexo de cada individuo con la finalidad de facilitar el seguimiento de las condiciones físicas y sanitarias de cada ejemplar.

2. FUNDAMENTO

Las técnicas de marcaje y sexado son importantes en la formación de un plantel de reproductores porque permiten establecer la proporción sexual que se debe tener en cada tanque de cultivo, evaluar periódicamente el estado de maduración de los gametos, con la finalidad de determinar el momento preciso para una inducción a la maduración o la obtención de un desove.

3. REFERENCIAS

FELIP A, CARRILLO M, HERRÁEZ M P, ZANUY S, BASURCO B. 2009. Advances in fish reproduction and their application to broodstock management: A practical manual for sea bass. Options méditerranéennes, series B: Studies and Research N° 63, CIHEAM, Zaragoza, Spain, 2009. ISBN 2-85352-419-1. 95 pp.

HUNTER J R & MACEWICZ B J. 1985. Measurement of spawning frequency in multiple spawning fishes. En: R. L. Lasker (ed.). An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: application to the northern anchovy, *Engraulis mordax*. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS 36: 79-94.

THOMASSEN S, INGEMANN PEDERSEN M, HOLDENSGAARD G. 2000. Tagging the European eel *Anguilla anguilla* L. with coded wire tags. Aquaculture 185: 57-61.

4. TERMINOLOGÍA

Marcaje: es un procedimiento (por ej. tatuaje, herrado, mutilación, pigmentos, isotopos radioactivos, identificadores electrónicos, etc.) que se realiza para la identificación del pez y que no implica el uso de etiquetas.

Reproductor: especímenes de ambos sexos, maduros sexualmente, mantenidos para llevar a cabo la reproducción en condiciones controladas.

Sexado: examinar un pez para identificar su sexo.

5. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1 MATERIALES

- Cánulas o sondas de alimentación de PVC de grado médico de 0,8 mm de diámetro interno x 1,4 mm de diámetro externo
- Láminas portaobjetos 75 x 25 mm
- Láminas cubre objeto 22 x 40 mm
- Jeringa de 3 mL sin aguja
- Esponja de 50 x 50 cm para colocar en la mesa de trabajo
- Bandeja plástica
- Recipiente de 100 L para anestesiarse a los peces
- Ictiómetro estándar de 60 cm de longitud
- Ictiómetro estándar de 60 cm de longitud.
- Batería de 9 voltios (para lector de identificadores electrónicos)

5.2 REACTIVOS

- Anestésico Tricaine-S (MS 222), frasco por 100 g
- Alcohol 70°
- Povidona
- Solución para aclarar los ovocitos, Solución SERRA (Etanol (PA al 99,9%), formol (PA) y ácido acético (PA), 6:3:1 v/v, ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/BO)

5.3 EQUIPOS

- Balanza de precisión Mettler Toledo (Cap. Max. 3 Kg; precis.0,1 g)
- Identificadores electrónicos (Five Star ID chips – Luerlocksistema)
- Escáner Allflex para lectura de identificadores electrónicos (figura N° 9)
- Microscopio NIKON Eclipse 90 i

6. PROCEDIMIENTO

6.1 MARCAJE CON IDENTIFICADOR ELECTRÓNICO

- La solución anestésica se prepara según Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/MB.
- Se anestesian a los peces en grupos de 3 a 5 ejemplares (dependiendo del tamaño),

por 3 minutos, para luego ponerlos sobre la esponja en la mesa de trabajo, y registrar las medidas de peso y talla.

- Se ubica el lugar donde se va a colocar el identificador, entre las aletas dorsal y pectoral, limpiar la zona con povidona e introducir lentamente la aguja en ángulo de 45° con el identificador debajo de la piel del pez y empujar el émbolo completamente (figura N° 10), desinfectar el área inyectada nuevamente con povidona.
- Verificar el correcto funcionamiento del identificador, registrar el código con el escáner (figura N° 11).

6.2 SEXADO

- El poro genital del pez anestesiado se desinfecta con algodón y alcohol.
- En el caso del macho, posee un sólo orificio pequeño en el lado pigmentado, mientras que la hembra posee dos (anal y urogenital), uno anterior y otro posterior dispuestos en una hendidura mayor en el lado ciego o blanco.
- Proceder a la canulación (figura N° 12), en

el caso de las hembras (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/BO) y presión abdominal (figura N° 13) en caso de los machos (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/EMECS).

6.3 ANÁLISIS DE MUESTRA

- Colocar la muestra obtenida de la canulación en una lámina portaobjeto y agregar una gota de solución SERRA, luego cubrir con un cubreobjeto.
- Observar bajo microscopía óptica.
- Este procedimiento se realiza para muestras de hembras y machos.
- Anotar los datos en la ficha correspondiente.

7. REGISTRO

Nombre: Laboratorio de Cultivo de Peces

Código: F-CP-01.01/MS

Fecha:

Responsable:

Ficha de marcaje y sexado

Fecha	N° pez	N° Identificador (Código de Muestra)	Sexo	Foto	Observaciones



Figura N° 9. Escáner e identificador electrónico.



Figura N° 10. Colocación del identificador electrónico.



Figura N° 11. Lectura del identificador electrónico.



Figura N° 12. Canulación.





Figura N° 13. Presión abdominal.



MUESTREO BIOMÉTRICO

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/ MB

	INSTRUCTIVO		Revisión: 00
	MUESTREO BIOMÉTRICO		Fecha: Enero, 2013 Página: 1 de 4 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/MB

MUESTREO BIOMÉTRICO

INSTRUCTIVO IMP-CP-I-Lab-01.01/MB

1. OBJETIVO

Establecer las pautas a seguir durante los muestreos biométricos mensuales de reproductores de lenguado *P. adspersus*.

2. FUNDAMENTO

El muestreo biométrico es una técnica que consiste básicamente en tomar las medidas de peso en gramos y longitud total en centímetros, para realizar un seguimiento de la población existente en cada tanque de cultivo. Además, permite observar las condiciones sanitarias de los peces como la presencia o no de ectoparásitos o cualquier anomalía en el aspecto físico.

3. REFERENCIAS

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). 2008. Glosario de Acuicultura. 401 pp.

GUERRA-SIERRA A & SÁNCHEZ-LIZASO J L. 1998. Fundamentos de explotación de recursos vivos marinos. Editorial Acriba, S.A. Saragoza. 249 pp.

4. TERMINOLOGÍA

Biometría: técnica que consiste en tomar diferentes medidas y observaciones para la comprensión de la naturaleza de una parte o de la población. Dos datos que no pueden faltar son la talla y el peso.

Ictiómetro: instrumento que permite cuantificar la longitud de los peces.

Petequias: son lesiones pequeñas de color rojo.

Tasa de crecimiento específico: mide la velocidad de crecimiento en un determinado período expresado en porcentaje diario de su peso.

Tasa de crecimiento relativo: expresa el crecimiento en peso como porcentaje del peso corporal inicial.

5. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1 MATERIALES

- Mesa de muestreo
- Tanque rectangular de 2,0 m³ de volumen

- Recipiente de 100 L para anestésiar a los peces
- Recipiente de 20 L
- Piedras difusoras (12 y 18 cm), para cada tanque de cultivo
- Esponja de 50 x 50 cm para colocar en la mesa de trabajo
- Bandejas de plástico
- Esponjas limpiadoras verdes
- Escobillas de limpieza con mangos de diferentes calibres
- Mangueras transparentes de 3/16"
- Bolsa filtrante de 10 µ de tamaño de malla
- Jeringas de 1 mL de insulina
- Algodón
- Redes de mano
- Batería de 9 V (para lector de identificadores electrónicos)
- Ictiómetro estándar de 60 cm de longitud
- Multivitamínico de uso veterinario, Aminoplex Forte, frasco por 250 ml

5.2 REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN

5.2.1 Reactivos

- Anestésico Tricaine-S (MS 222), frasco por 100 g
- Povidona
- Nitrato de Plata (50% P/P)
- Hipoclorito de sodio al 2,5 % de uso doméstico

5.2.2 Preparación solución anestésica

- Pesar 3,2 g de Tricaine-S
- Llenar 40 L de agua de mar en un recipiente de 100 L.
- Agregar al recipiente el anestésico y disolver completamente

5.3 EQUIPOS

- Escáner Allflex, lector de identificadores electrónicos.
- Balanza eléctrica Metter Toledo (Cap. Max. 3 kg; Precisión: 0,1 g).
- Sensores de temperatura marca Onset



INSTRUCTIVO

MUESTREO BIOMÉTRICO



Revisión: 00
Fecha: Enero, 2013
Página: 2 de 4
Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/MB

6. PROCEDIMIENTO

6.1 REQUERIMIENTO PREVIO AL MUESTREO: LIMPIEZA DE TANQUES DE CULTIVO

- Se prepara un tanque de 2 m³ que va a recepcionar a los peces con agua de mar y se colocan 2 piedras difusoras para mantenerlo con aireación constante.
- Se apagan los sistemas de recirculación y se baja el nivel de agua de los tanques en el cual se encuentran los peces que serán extraídos con una red de mano y colocados en el tanque de 2 m³ (figura N° 14).
- De los tanques de cultivo, se retiran los sensores de temperatura, los skimmers, tubos cribados centrales, tubo de ingreso de agua, mangueras y piedras difusoras para lavarlos.
- Se lavan los tanques de cultivo con una solución de hipoclorito de sodio y agua dulce a una concentración 1:1. Las piedras difusoras se colocan en un recipiente de 20 L en una solución de hipoclorito de sodio y agua dulce 1:1 para su limpieza durante 48 horas.
- Las tuberías del sistema de recirculación se desarmen y se limpian con abundante agua dulce.
- Nuevamente se colocan los implementos retirados y se abre la llave de ingreso de agua a cada tanque y se coloca en esta la bolsa de filtrado.
- Finalmente, la bomba de ingreso de agua se enciende para llenar los tanques; una vez llenos, se sacan las bolsas filtrantes, se colocan los sensores de temperatura y se encienden los sistemas de recirculación.

6.2 MUESTREO BIOMÉTRICO

- Se anestesian a los peces en grupos de 3 a 5 ejemplares (dependiendo del tamaño), por un tiempo de 3 minutos.
- Los ejemplares sedados se retiran uno por uno y se identifica el código electrónico con el escáner (figura N° 15) (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/MS), posteriormente asegurarse de eliminar el exceso de agua para evitar errores durante el pesado (figura N° 16) y anotar el dato en la ficha respectiva, se miden (figura N° 17) con el ictiómetro a

partir del extremo más sobresaliente de la boca hasta el radio de mayor tamaño o más largo de la aleta caudal, considerando la longitud al centímetro inferior.

- A cada ejemplar se le inyecta 0,05 mL/Kg de multivitamínico, en caso de que el pez muestre alguna laceración en la boca, debe ser tratado con nitrato de plata y si se observa petequias desinfectar el área con povidona (figura N° 18).
- Cualquier otra anomalía observada se debe anotar en la ficha de muestreo, como por ejemplo la presencia de parásitos internos como *Philometra* sp. al presionar la cavidad abdominal, o el caso de ectoparásitos como *Entobdella* sp.
- Se regresa el pez al tanque que le corresponde según la ficha de muestreo y se le observa hasta su recuperación del anestésico.

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

a) Tasa de crecimiento relativo:

$$RGR (\% BW_i) = \frac{BW_f - BW_i * 100}{BW_i}$$

b) Tasa de crecimiento específico:

$$SGR \left(\frac{\% BW_i}{\text{día}} \right) = \frac{\ln \left(\frac{BW_f}{BW_i} \right) * 100}{T_f - T_i}$$



INSTRUCTIVO
MUESTREO BIOMÉTRICO



Revisión: 00
Fecha: Enero, 2013
Página: 3 de 4
Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/MB

8. REGISTRO

Nombre: Laboratorio de Cultivo de Peces
Código: F-CP-01.01/MB
Fecha:
Responsable:

Ficha de muestreo

Fecha	Código de muestra	Sexo	Tanque origen	Tanque destino	Longitud total (cm)	Peso total (g)	Parásitos	Presencia <i>Philometra</i> sp.	Observaciones	Foto

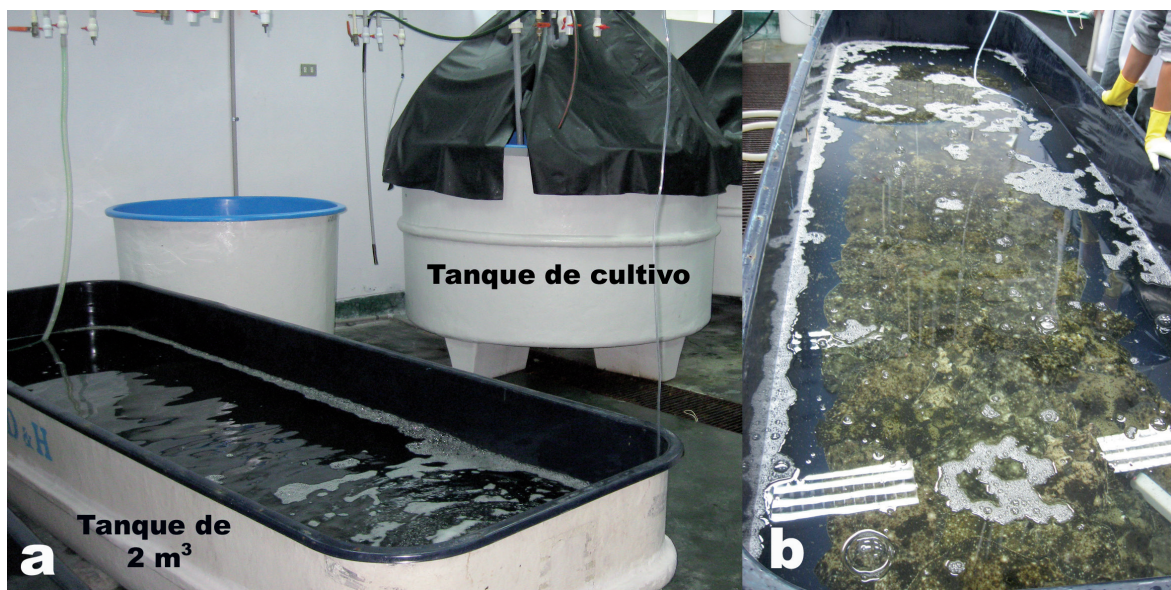


Figura N° 14. a) Tanque de cultivo y de recepción de peces (2m³) y b) Tanque de 2m³ con los peces.



Figura N° 15. Lectura del identificador electrónico.



Figura N° 16: Medición del peso.




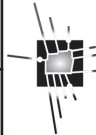
Figura N° 17: Medición de la longitud total.



Figura N° 18: Desinfección de las petequias con povidona.

BIOPSIA OVÁRICA

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/B0

	INSTRUCTIVO	 FINCyT <small>Innovación • Ciencia • Tecnología</small>	Revisión: 00
	BIOPSIA OVÁRICA		Fecha: Enero, 2013 Página: 1 de 3 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/BO

BIOPSIA OVÁRICA

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/BO

1. OBJETIVO

Establecer las pautas para colecta óptima de ovocitos que permita evaluar el estado de maduración gonadal de cada ejemplar hembra acondicionado en el laboratorio.

2. FUNDAMENTO

La biopsia ovárica o canulación, es la técnica utilizada para obtener una muestra en fresco de tejido ovárico y determinar el estado de maduración gonadal de las hembras, lo cual sirve para predecir el momento de los desoves naturales o en caso contrario realizar una inducción hormonal para la obtención de los mismos.

3. REFERENCIAS

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). 2008. Glosario de Acuicultura. 401 pp.

WATANABE W O, CARROLL P M, DANIELS H V. 2000. Recent progress in controlled reproduction of southern flounder *Paralichthys lethostigma*. p. 141-148. En: C. Tamaru (ed.). Spawning and Maturation of Aquaculture Species: proceedings of the twenty eighth UJNR Aquaculture Panel 10-12 November 1999, Kihei, Hawaii. 174 pp.

4. TERMINOLOGÍA

Biopsia: procedimiento mediante el cual se extraen muestras de tejidos, células o fluidos para su examen.

Gónada: órgano sexual primario, testículo (produce esperma) y ovario (produce huevos).

5. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1 MATERIALES

- Cánulas de PVC de grado médico de 0,8 mm de diámetro interno y 1,4 mm de diámetro externo
- Jeringa de 3 mL sin aguja
- Esponja de 50 x 50 cm para colocar en la mesa de trabajo
- Láminas portaobjetos 75 x 25 mm
- Láminas cubreobjetos 22 x 40 mm
- Estilete
- Piseta con agua dulce
- Algodón

- Bandeja plástica
- Recipiente de 100 L
- Ictiomómetro de 60 cm de longitud

5.2 REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN

5.2.1 Reactivos

- Anestésico Tricaine-S (MS 222), frasco por 100 g.
- Solución SERRA (Etanol (PA al 99.9%), formol (PA) y ácido acético (PA), 6:3:1 v/v)

5.2.2 Preparación solución SERRA



- Se agrega en un frasco de vidrio de color oscuro con tapa: 60 mL de etanol, 30 mL de formol y finalmente 10 mL de ácido acético y se homogeniza la solución.

5.3 EQUIPOS

- Balanza eléctrica marca Mettler Toledo (Cap. Max. 3 Kg; precis. 0,1 g).
- Escáner Allflex para leer los identificadores electrónicos.

6. PROCEDIMIENTO

- Se coloca a los peces en la solución anestésica (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/MB).
- Se realiza el muestreo biométrico de cada ejemplar (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/MB).
- Se limpia con algodón el área alrededor del poro genital de cada ejemplar hembra (figura N° 19).
- Se introduce en el poro genital aproximadamente unos 10 cm la cánula y en su otro extremo se coloca la jeringa de 3 mL para succionar la muestra (figura N° 20).
- Cuando se observe la muestra dentro de la cánula, se retira la jeringa y luego se retira la cánula del pez (figura N° 21).
- Se regresa el pez a su tanque de origen.
- Se coloca la muestra en la lámina portaobjeto previamente rotulada con el código correspondiente (figura N° 22).

	INSTRUCTIVO	 FINCyT <small>innovación • ciencia • tecnología</small>	Revisión: 00
	BIOPSIA OVÁRICA		Fecha: Enero, 2013 Página: 2 de 3 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/BO

- Se agrega a la muestra una gota de agua dulce o de la solución SERRA.
- Se coloca un cubreobjeto tratando de no aplastar la muestra.
- Se analiza el estado de madurez gonadal (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/SMGH).



Figura N° 19. Poro genital de la hembra.



Figura N° 20. Biopsia ovárica.



Figura N° 21. Muestra de ovocitos en la cánula.





Figura N° 22. Muestra de ovocitos en la lámina.



SEGUIMIENTO DE MADUREZ GONADAL DE HEMBRAS

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/SMGH

	INSTRUCTIVO	 FINCyT <small>Innovación • ciencia • tecnología</small>	Revisión: 00
	SEGUIMIENTO DE MADUREZ GONADAL DE HEMBRAS		Fecha: Enero, 2013 Página: 1 de 4 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/SMGH

SEGUIMIENTO DE MADUREZ GONADAL DE HEMBRAS

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/SMGH

1. OBJETIVO

Establecer las pautas para determinar el estado de madurez gonadal periódicamente de hembras de *Paralichthys adspersus* acondicionadas en el laboratorio.

2. FUNDAMENTO

La producción de alevinos es el objetivo principal de toda producción acuícola, para tal propósito, se debe conocer el comportamiento reproductivo de la especie en cautiverio, el origen de los reproductores, la cantidad disponible de estos, el manejo y condiciones de cultivo. Dentro de estos aspectos, la etapa más importante para el proceso de desove en cautiverio es la selección de los reproductores aptos de acuerdo a un seguimiento de la madurez gonadal; las metodologías utilizadas para este propósito varían desde las no invasivas, por observaciones de características externas, a invasivas como la biopsia ovárica o canulación.

3. REFERENCIAS

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). 2008. Glosario de Acuicultura. 401 pp.

HUNTER J R & MACEWICZ B J. 1985. Measurement of spawning frequency in multiple spawning fishes. En: R. L. Lasker (ed.). An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: application to the northern anchovy, *Engraulis mordax*. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS 36: 79-94.

WATANABE W O, CARROLL P M, DANIELS H V. 2000. Recent progress in controlled reproduction of southern flounder *Paralichthys lethostigma*. p. 141-148. En: C. Tamaru (ed.). Spawning and Maturation of Aquaculture Species: proceedings of the twenty eighth UJNR Aquaculture Panel 10-12 November 1999, Kihei, pHawaii. 174 pp.

WEST G. 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 41: 199-222.

4. TERMINOLOGÍA

Comportamiento reproductivo: cualquier actividad dirigida hacia la perpetuación de la

especie.

Gónada: órgano sexual primario, testículo (produce esperma) y ovario (produce ovocitos).

Maduración gonadal: proceso de crecimiento hasta alcanzar el máximo desarrollo de las gónadas.

5. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1 MATERIALES

- Cánulas o sondas de alimentación de PVC de grado médico de 0,8 mm de diámetro interno x 1,4 mm de diámetro externo
- Jeringa de 3 mL sin aguja
- Esponja de 50 x 50 cm para colocar en la mesa de trabajo
- Láminas portaobjetos 75 x 25 mm
- Láminas cubreobjetos 22 x 40 mm
- Estilete
- Contómetro
- Piseta con agua de dulce

5.2 REACTIVOS



- Anestésico Tricaine-S (MS 222), frasco por 100 g
- Solución SERRA (Etanol (PA al 99.9%), formol (PA) y ácido acético (PA), 6:3:1 v/v)

5.3 EQUIPOS

- Microscopio óptico NIKON Eclipse 90i con una cámara digital incorporada
- Programa de imágenes NIKON NIS ELEMENTS

6. PROCEDIMIENTO

- Se prepara la mesa de trabajo con las láminas portaobjetos (figura N° 23).
- Se extrae la muestra de ovocitos por biopsia ovárica o canulación (Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/BO), se esparce con la ayuda de un estilete en una lámina portaobjeto limpia, la cual se rotula según el identificador electrónico de cada pez.
- Se agrega una gota de agua dulce o solución SERRA (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/BO) y se cubre con una lámina cubreobjeto,

	INSTRUCTIVO	 FINCyT <small>innovación • ciencia • tecnología</small>	Revisión: 00 Fecha: Enero, 2013 Página: 2 de 4 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/SMGH
	SEGUIMIENTO DE MADUREZ GONADAL DE HEMBRAS		

- evite aplastar los ovocitos.
- Se analiza las láminas a través del microscopio óptico utilizando el contraste de fase (PH1, PH2) y un contómetro, se procede a identificar y contar el número de células, basándose en la descripción de Hunter & Macewicz (1985) (figura N° 24).
 - De acuerdo a la presencia y proporción de los diferentes tipos de ovocitos (inmaduro, pre-vitelogénico, vitelogénico, maduro, hidratado) u ovocitos en degradación celular, denominados atrésicos, se identifica el estadio de madurez gonadal: Inmaduro, En maduración, Maduro, Desovante, Recuperación e Inactivo.
 - Se registra las observaciones en la ficha correspondiente y se obtiene imágenes de las muestras, utilizando el programa de imágenes NIKON NIS ELEMENT (figura N° 25).
 - Se realiza mediciones del diámetro de 50 ovocitos (> 0,1 mm) de cada muestra elegidos aleatoriamente con el mismo programa y se anota las mediciones en la ficha de seguimiento de la madurez gonadal.



INSTRUCTIVO
SEGUIMIENTO DE MADUREZ GONADAL DE HEMBRAS



Revisión: 00
Fecha: Enero, 2013
Página: 3 de 4
Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/SMGH

7. REGISTRO

Nombre: Laboratorio de Cultivo de Peces
Código: F-CP-01.01/SMGH
Fecha:
Responsable:

Ficha de seguimiento de madurez gonadal en hembras

Código de pez	Clase de ovocito				Atresia α			Parásitos	Estado	Observaciones
	Sin vitelo inmaduro	Sin vitelo pre vitelogénico	Pocos vitelog. + otros	Muchos maduros + otros	Maduro con núcleo migratorio	Sin vitelo	Parcial vitelog.			



Figura N° 23. Mesa de trabajo con láminas portaobjetos.

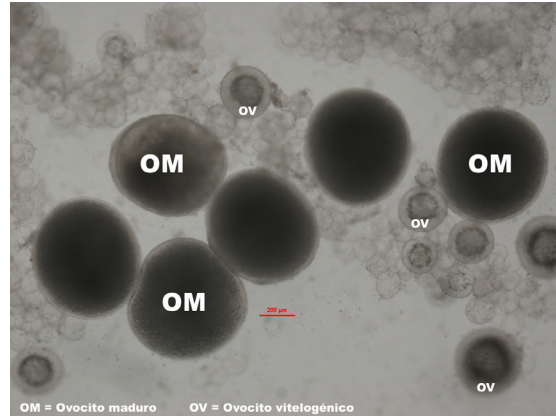


Figura N° 24. Muestra de ovocitos.

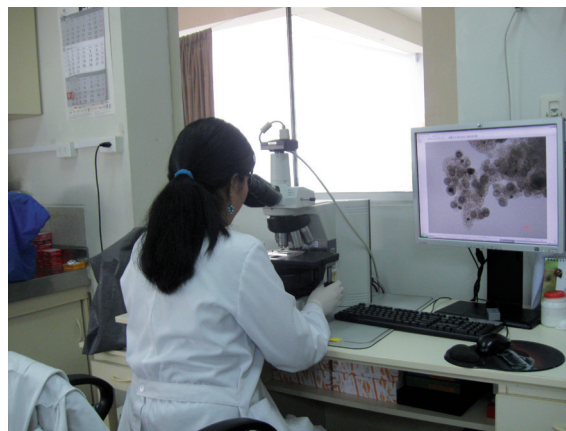




Figura N° 25. Análisis de las láminas.



INDUCCIÓN HORMONAL

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/IH

	INSTRUCTIVO		Revisión: 00
	INDUCCIÓN HORMONAL		Fecha: Enero, 2013 Página: 1 de 3 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/IH

INDUCCIÓN HORMONAL

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/IH

1. OBJETIVO

Establecer las pautas para inducir a la maduración de gametos (ovulación) y desove en *P. adspersus*.

2. FUNDAMENTO

Los tratamientos hormonales son fundamentales para completar la maduración final de los gametos y asegurar el éxito del desove en muchas especies acuícolas.

Los métodos más modernos de inducción a la ovulación se han centrado en la aplicación de hormonas liberadoras de gonadotropinas (LHRH o GnRH). Estas son moléculas pequeñas (decapéptidos) que realizan el control de la glándula hipófisis en su producción de gonadotropinas (LH y FSH o GtH-I y GtH-II). Existen análogos sintéticos (LHRH-a o GnRH-a) más potentes y de mayor duración que los nativos, lo cual genera su masificación.

La forma de aplicación de la mayoría de ellas es en medio líquido a través de inyecciones, pero también existen los implantes o pellets hormonales, efectivos por la menor manipulación producida en los peces y por el mayor tiempo de liberación que facilita la acción de la hormona.

3. REFERENCIAS

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). 2008. Glosario de Acuicultura. 401 pp.

VALDEVENITO I. 2008. Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. Arch. Med. Vet. 40: 115-123.

WATANABE W O, CARROLL P M, DANIELS H V. 2000. Recent progress in controlled reproduction of southern flounder *Paralichthys lethostigma*. p. 141-148. En: C. Tamaru (ed.). Spawning and Maturation of Aquaculture Species: proceedings of the twenty eighth UJNR Aquaculture Panel 10-12 November 1999, Kihei, Hawaii. 174 pp.

4. TERMINOLOGÍA

Hormona: sustancias secretada por células especializadas cuyo fin es la de afectar la función de otras células.

Inducción hormonal: uso de hormonas para

provocar la ovulación.

5. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1 MATERIALES

- Cánulas de PVC de grado médico de 0,8 mm de diámetro interno y 1,4 mm de diámetro externo
- Jeringa de 3 mL sin aguja
- Esponja de 50 x 50 cm para colocar en la mesa de trabajo
- Láminas portaobjetos 75 x 25 mm
- Láminas cubreobjetos 22 x 40 mm
- Estilete
- Piseta con agua dulce
- Algodón
- Bandeja plástica
- Recipiente de 100 L.
- Ictiomómetro de 60 cm de longitud
- Eppendorf de 1,5 mL de capacidad
- Cámara de cultivo celular de 24 pocillos
- Micropipeta automática de 10 - 100 µL capacidad
- Puntas para micropipeta
- Cámara de Neubauer
- Agua de mar microfiltrada y esterilizada (AMFE)
- Cámara de frío (elaborado en laboratorio)
- Cronómetro
- Guantes quirúrgicos
- Papel toalla
- Jeringas de 1mL

5.2 REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN.

5.2.1 Reactivos:

- Anestésico Tricaine-S (MS 222), frasco por 100 g
- Solución SERRA (Etanol (PA al 99,9%), formol (PA) y ácido acético (PA), 6:3:1 v/v)
- Povidona.
- Pellets hormonales "Ovaplant" (75 µg LHRH-a/pellet)
- Acetato de Buserelina (pura en polvo).
- Solución salina 0,9 % (SS)

5.2.2 Preparación de solución de acetato de buserelina:

- Pesar 0,005 g de hormona
- Mezclar la hormona en 50 mL de solución salina para obtener una concentración de 100 µg/1 mL

5.3 EQUIPOS

- Balanza eléctrica marca Mettler Toledo (Cap. Max. 3 Kg; precis. 0,1 g)
- Escáner Allflex para leer los identificadores electrónicos
- Pistola para la implantación de pellets hormonales

6. PROCEDIMIENTO

6.1 INYECCION DE HORMONAS

- Se coloca a los peces en la solución anestésica (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/MB).
- Se realiza el muestreo biométrico de cada ejemplar (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/MB).
- Se realiza la biopsia ovárica (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/BO) y se analiza el estado de madurez gonadal (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/SMGH).
- Se desinfecta con povidona el área donde se va a inyectar, generalmente, debajo de la aleta pectoral, introduciendo lentamente la aguja y empujar el émbolo (figura N° 26), luego se vuelve a desinfectar el área.
- Se inyecta a las hembras con un diámetro de ovocitos igual o mayor a 500 µ.
- La dosis de hormona es según el peso total (g) y el estado de madurez gonadal (tabla N° 1).

6.2 IMPLANTE HORMONAL

- Se coloca a los peces en la solución anestésica (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/MB).
- Se realiza el muestreo biométrico de cada ejemplar (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/MB).
- Se realiza la biopsia ovárica (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/BO) y se analiza el estado de madurez gonadal de las hembras

Tabla N° 1: Dosis de hormona según el peso.

Peso pez (g)	Dosis (ml) (Cc 25 µg/Kg)
500	0.13
1000	0.25
1500	0.38
2000	0.50
2500	0.63
3000	0.75
3500	0.88
4000	1.00

(ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/SMGH).

- Se coloca el implante hormonal (figura N° 27) en hembras con inicios de maduración (estadio II).
- Se coloca la pistola con el implante de acuerdo a la figura N° 28, desinfectando previamente la zona con povidona.
- Se introduce la aguja de la pistola y se deja el implante, luego se desinfecta nuevamente con povidona.
- La cantidad de implantes a colocar es según el peso total (g) (tabla N° 2).

Tabla N° 2: Implantes de 75 µg/Kg, según el peso.

Límites de peso (g)	N° de implantes
750 - 1500	1
1501 - 3000	2
3001 - 5000	3
5000	4
Más	5



Figura N° 26. Inyección de Hormona.





Figura N° 27. Pistola con pellets hormonales.



Figura N° 28. Inyección de pellets hormonales.

DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES DE HUEVOS Y LARVAS

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/DLTHL

	INSTRUCTIVO	 FINCyT <small>innovación • ciencia • tecnología</small>	Revisión: 00
	DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES DE HUEVOS Y LARVAS		Fecha: Enero, 2013 Página: 1 de 3 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/DLTHL

DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES DE HUEVOS Y LARVAS

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/DLTHL

1. OBJETIVO

Establecer las pautas para determinar los lípidos totales en huevos y larvas de lenguado para su análisis cuantitativo.

2. FUNDAMENTO

Los lípidos de los tejidos se extraen mediante una mezcla de solventes orgánicos (cloroformo - metanol) y se cuantifican mediante la técnica de gravimetría. Esta técnica se aplica a muestras de huevos, así como, tejidos corporales de larvas y juveniles de peces.

3. REFERENCIAS

IRTA (INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA). Manual del S.I.G código 2000-L-00015.

4. TERMINOLOGÍA

Huevo: célula germinal femenina madura y fecundada.

Larva: etapa de un organismo que comprende desde que inicia su alimentación externa hasta su metamorfosis a juvenil. En estado de larva, el animal difiere bastante en apariencia y comportamiento de un juvenil o un adulto.

5. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1 MATERIALES

- Tubos de vidrio con tapa de 15 mL.
- Embudo de vidrio
- Papel de filtro (Whatman N° 41)
- Homogeneizador (Potter Glas-Col®)
- Desecador
- Viales de vidrio con tapa (2 y 7 mL)

5.2 REACTIVOS

- Cloroformo (PA)
- Metanol (PA)
- KCl
- Nitrógeno gas



5.3 EQUIPOS

- Vortex (VELP Scientifica – ZX Classic)
- Bomba de vacío (Vacuumbrand)
- Centrífuga (HEROLAB)

- Campana extractora de gases (LABCONCO)
- Balanza de analítica Kern AB3 220-4M (Cap. Max. 220 g; precis. 0,001 g)

6. PROCEDIMIENTO

- Los viales de 2 mL previamente marcados se pesan y se mantienen en el desecador hasta su uso.
- Se pesa 1 g de tejido fresco (muestras de huevos o larvas) (figura N° 29) en tubo del Homogeneizador (potter), se agrega 10 mL de una mezcla de cloroformo (C): metanol (M) (2:1) (v/v) (figura N° 30). La muestra se homogeniza manualmente por 5 minutos, se realizan los análisis por triplicado para validar estadísticamente los resultados.
- Se coloca el papel filtro en el embudo para filtrar por gravedad la muestra (figura N° 31).
- Se lava previamente el papel filtro con 10 mL de la mezcla C:M 2:1 v/v y se pasa a través de este la muestra homogenizada, recogiendo lo filtrado en un tubo de 15 mL.
- El tubo del homogeneizador se enjuaga dos veces con 1 mL de C:M, y se pasa a través del filtro, se recoge todo lo filtrado en el mismo tubo, luego, se lava también el filtro con la mezcla de C:M y se pasa al tubo.
- Se calcula el volumen total de la mezcla de C:M contenido en el tubo, y se añade una solución de KCl al 0,88%, equivalente a 1/4 del volumen total.
- Se mezcla la muestra con el vortex y se centrifuga a 2000 rpm por 10 minutos.
- Se descarta la fase acuosa (fase superior) con la ayuda de una pipeta pasteur y se transfiere la fase orgánica (fase inferior) a un tubo limpio.
- Se seca la fase orgánica con nitrógeno gas hasta llegar a 1 mL del volumen total.
- Se transfiere el contenido a un vial de 2 mL utilizando una pipeta pasteur y se concentra la muestra en el vial usando nitrógeno gas hasta sequedad.
- El vial se deja en el desecador conectado a una bomba de vacío y se cubre con un plástico negro, durante toda la noche.

	INSTRUCTIVO DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES DE HUEVOS Y LARVAS	 FINCyT <small>innovación • ciencia • tecnología</small>	Revisión: 00 Fecha: Enero, 2013 Página: 2 de 3 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/DLTHL
---	--	---	--

- Se pesa el vial con la muestra y se calcula los lípidos totales del tejido analizado.
- Conservar los lípidos totales en C:M en una relación de 10 mg/mL para la transmetilación posterior.

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

a) Porcentaje de lípidos totales:

$$\%G = \left(\frac{V_2 - V_1}{W} \right) \times 100\%$$

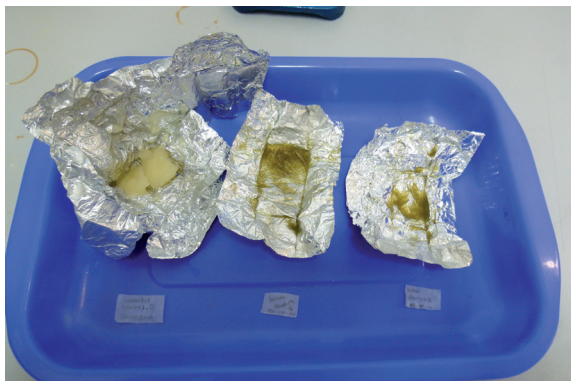


Figura N° 29. Muestras de huevos y larvas.

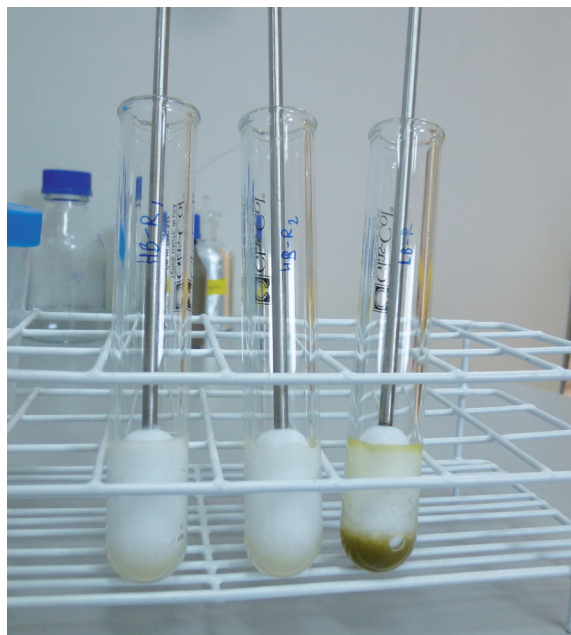


Figura N° 30. Muestras de huevos y larvas en el homegenizador.

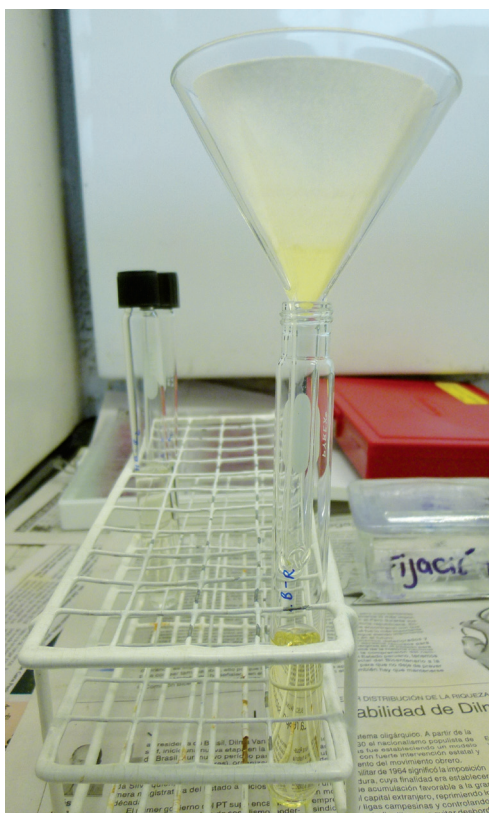


Figura N° 31. Filtrado de la muestra

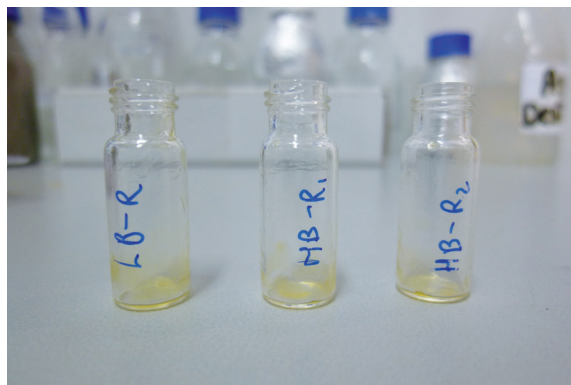


Figura N° 32. Lípidos totales.

DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE HUEVOS Y LARVAS

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/DAGHL



INSTRUCTIVO
**DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS
DE HUEVOS Y LARVAS**



Revisión: 00
Fecha: Enero, 2013
Página: 1 de 3
Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/DAGHL

DETERMINACIÓN DE ACIDOS GRASOS DE HUEVOS Y LARVAS
Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/DAGHL

1. OBJETIVO

Establecer las pautas a seguir para la determinar el perfil de ácidos grasos a partir de una muestra de lípidos totales.

2. FUNDAMENTO

El método consiste en metilar los ácidos grasos para luego extraerlos y cuantificarlos por cromatografía de gases con detector FID (Flamelonization Detector). Esta técnica se aplica a cualquier muestra de lípidos totales previamente extraídos.

3. REFERENCIAS

ARREDONDO B & VOLTOLINA D. 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de investigaciones Biológicas del Noereste, S.C. México.

4. TERMINOLOGÍA

Huevo: célula germinal femenina madura y fecundada.

Larva: etapa de un organismo que comprende desde que inicia su alimentación externa hasta su metamorfosis a juvenil. En estado de larva, el animal difiere bastante en apariencia y comportamiento de un juvenil o un adulto.

5. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1 MATERIALES

- Micropipeta de 100µL-1000 µL
- Micropipeta de 0,5mL-5mL.
- Tubos de ensayo de tapa rosca.
- Viales con tapa de 2mL.

5.2 REACTIVOS

- Nitrógeno gas
- Ácido Clorhídrico PA
- Metanol PA
- Hexano GC
- Sulfato de sodio anhidro PA
- Estandar interno C 17:0 ácido heptanoicometilester



5.3 EQUIPOS

- Cromatógrafo de gases equipado con detector FID. (Varian CP-3800)
- Balanza de analítica Kern AB3 220-4M

(Cap. Max. 220 g; precis.0,001 g).

6. PROCEDIMIENTO

- Se prepara 50 mL del patrón interno C 17:0 en una solución de cloroformo-metanol (2:1), a una concentración de 1 mg/mL
- Los 50 µL del patrón interno C 17:0 se añade a un tubo de 15 mL con tapa rosca (figura N° 33).
- Luego se agrega 50µL de la muestra de lípidos totales (conservada en una relación de 10mg/mL)
- El extracto lipídico se seca con nitrógeno gas y se somete a metanólisis adicionando 2,5 mL de la mezcla de HCl:CH₃OH (5%, v/v), a 85°C por 2,5 h.
- Los metilesteres obtenidos de la reacción de metanólisis se extraen con 1,5 mL de hexano, repitiendo este paso dos veces.
- Una vez obtenido el extracto de hexano se lava con 2 mL de agua destilada utilizando una pipeta pasteur (burbujeando) y repetir el lavado 3 veces. Después del tercer lavado se recupera el hexano en un nuevo tubo previamente lavado como los anteriores.
- Seque el extracto de hexano que contiene los ácidos grasos metil esterificados, con nitrógeno gas.
- Se disuelve la muestra seca con 1 mL de hexano y agregar una pizca (0,01 mg) de sulfato de sodio anhidro a fin de eliminar el remanente de agua que pueda ser inyectado al cromatógrafo.
- Se toma 250 µL y se coloca en un vial con tapa de teflón (figura N° 34).
- Del vial sellado se inyecta 1 µL en el cromatógrafo de gases (figura N° 35).
- Condiciones de cromatógrafo:
 - Volumen de inyección: 1µL
 - Gas portador: He
 - Flujo del gas portador en la columna: 0,9 mL/min
 - Inyección de la muestra: sin división splitless
 - Temperatura del inyector: 250°C
 - Temperatura del detector: 260°C
 - Horno: 110°C/3min,
 - Luego 30°C/min hasta 165°C

	<p>INSTRUCTIVO</p> <p>DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE HUEVOS Y LARVAS</p>	 <p>FINCyT innovación • ciencia • tecnología</p>	<p>Revisión: 00 Fecha: Enero, 2013 Página: 2 de 3 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/DAGHL</p>
---	--	--	---

- A 165°C/2 min,
- Luego 2.2°C/min hasta 209°C,
- Finalmente 209°C/35 min.
- Analizar y cuantificar cromatogramas (figura N° 36).

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS



a) Peso del metiléster:

$$C_i = C_s \left(\frac{A_i}{A} \right)$$



EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE PUESTAS

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/ECP

	INSTRUCTIVO		Revisión: 00
	EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE PUESTAS		Fecha: Enero, 2013 Página: 1 de 4 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/ECP

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE PUESTAS INSTRUCTIVO IMP-CP-I-Lab-01.01/ECP

1. OBJETIVO

Establecer las pautas para determinar la calidad de las puestas o desoves de lenguado con la finalidad de mejorar la sobrevivencia larval.

2. FUNDAMENTO

La calidad del huevo es determinada por varios parámetros y cambios frecuentes durante la estación reproductiva, entre ellos se pueden mencionar el estado endocrinológico durante la ovogénesis, la cantidad y calidad de ingesta del alimento, parámetros fisicoquímicos del agua, estrés de los reproductores, contribución genética de los padres y la sobre maduración de los huevos después de la ovulación (Aristizabal *et al.*, 2009).

La estimación de la calidad del huevo se relaciona directamente con el porcentaje de sobrevivencia larval, es así que para optimizar la producción de un hatchery se debe iniciar por tener un ciclo de producción de alta calidad de huevos con la finalidad de tener un elevado porcentaje de eclosión y larvas viables de crecimiento óptimo y resistente al estrés. La identificación entre la buena y mala calidad de huevos es vital para reducir los costos de producción a gran escala

3. REFERENCIAS

ARISTIZABAL E, SUÁREZ J, VEGA A, BARGAS R. 2009. Egg and larval quality assessment in the Argentinean red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 287: 329-334.

CARRILLO M, ZANUY S, OYEN F, CERDA J, NAVAS J M, RAMOS J. 2000. Some criteria of the quality of the progeny as indicator of physiological broodstock fitness. *CIHEAM – Options Mediterraneennes*, volumen 47.

GIMÉNEZ G, ESTÉVEZ A, LAHNSTEINER F, ZECEVIC B, BELL J G, HENDERSON R J, PIÑERA J A, SANCHEZ-PRADO J A. 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). *Aquaculture* 260: 232-243.

IRTA (INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA) – ESPAÑA. Curso de capacitación técnica. IMARPE 2011.

4. TEMINOLOGÍA

Hatchery: lugar para la cría artificial de las diferentes etapas de vida de los animales (peces, moluscos, crustáceos, etc.)

Huevo: célula germinal femenina madura y fecundada.

Oogénesis: desarrollo celular que conduce a la formación de un óvulo.

Reproductor: especímenes de ambos sexos, maduros sexualmente, mantenidos para llevar a cabo la reproducción en condiciones controladas.

5. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1. MATERIALES

- Colector de huevos
- Tamiz de 500 μ
- Probeta de 500 mL
- Vaso de precipitado de 500 mL y 1000 mL.
- Viales de vidrio con tapa de 5 mL.
- Tubos de microcentrifuga (eppendorf) de 1,5 mL
- Placas de 96 pocillos
- Pipetas pasteur
- Lunas de reloj
- Caja de cubreobjetos de (24 x 24 mm)
- Agua de mar esterilizada por radiación ultravioleta (UV) a 1 μ

5.2. REACTIVOS

- Povidona
- Formol (PA) al 10%

5.3. EQUIPOS

- Microscopio NIKON Eclipse 90 i
- Estereoscopio Zeiss, modelo Discovery. V12
- Cámara fotográfica NIKON Digital Sightds-SMC
- Incubadora Binder, modelo KBW400

6. PROCEDIMIENTO

- Del colector de huevos se saca una muestra en una luna reloj y se observa al microscopio el estado de desarrollo del huevo (figura N° 37).
- Los huevos del colector se trasvasan a un



INSTRUCTIVO

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE PUESTAS



Revisión: 00
Fecha: Enero, 2013
Página: 2 de 4
Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/ECP

- tamiz de 500 μ y se enjuagan con abundante agua de mar esterilizada por radiación ultravioleta (UV) a 1 μ (figura N° 38).
- Se desinfectan los huevos con povidona a una concentración de 100 ppm por 3 minutos, luego del tiempo requerido se enjuagan con abundante agua UV a 1 μ .
 - Los huevos se trasvasan a una probeta de 500 mL y se espera hasta que se separen los huevos flotantes de los no flotantes, luego se anota el volumen de cada fracción (flotantes y no flotantes) (figura N° 39).
 - Sacar los huevos flotantes a un vaso de precipitado con agua de mar UV (los huevos tienen que estar lo más limpios posibles).
 - La muestra separada en el vaso de precipitado se utiliza para las placas de 96 pocillos, de aquí se coloca 5 g en un vial de 5 mL para el análisis de lípidos y otra fracción similar para biometría en otro vial de 5 mL.
 - Tome fotos a una muestra de 20 huevos.
 - Otras muestras de huevos se almacenan en tubos de microcentrífuga fijada previamente con formol al 10% tamponado, por si hiciera falta hacer observaciones y/o biometrías posteriormente.

6.1. MUESTREO EN PLACA DE 96 POCILLOS

- Se cogen los huevos uno por uno y se distribuye un huevo por pocillo (figura N° 40) con la ayuda de una pipeta pasteur de vidrio recortada de acuerdo al diámetro del huevo.
- Se separa el huevo elegido (fecundado y en buen estado) con la pipeta pasteur de vidrio arrastrando el menor volumen posible de agua y evitando arrastrar otros huevos.
- Luego el resto de los pocillos se rellena con agua de mar filtrada a 1 μ m y esterilizada por radiación ultravioleta utilizando otra pipeta pasteur de vidrio (tener cuidado de no mezclar pipetas).

- Cada placa se rotula con fecha, código de la hembra y número de tanque de la puesta.
- Se incuba a temperatura de 18°C a oscuras o en penumbra hasta la eclosión del huevo.
- A diario se hace el seguimiento y observación al microscopio de la placa de 96 pocillos y se anota en la ficha correspondiente.

6.2. MUESTRA PARA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

- Pese un vial limpio de 5 mL y rotúlelo.
- Los huevos filtrados y lavados con agua destilada se colocan en el vial y se pesan 5 g de muestra (figura N°40).
- Almacene en el congelador a -80°C hasta que sean procesadas.

7. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

a) Porcentaje de Fertilización (PF)

$$PF = \frac{\text{Número de huevo viables}}{\text{Total de huevos desovados}} \times 100$$

b) Porcentaje de Eclosión (PE)

$$PE = \frac{\text{Número de larvas con saco vitelino}}{\text{Número de huevos viables}} \times 100$$



INSTRUCTIVO
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE PUESTAS



Revisión: 00
Fecha: Enero, 2013
Página: 3 de 4
Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/ECP

8. REGISTROS

Placa de 96 pocillos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Nombre: Laboratorio de Cultivo de Peces
Código: F-CP-01.01/ECP
Fecha:
Responsable:

Ficha de datos de la placa de 96 pocillos

Fecha	Día	N° huevos eclosionados	N° huevos muertos	N° larvas



Figura N° 37. Colecta de huevos.



Figura N° 38. Tamiz de 500 μ con huevos.

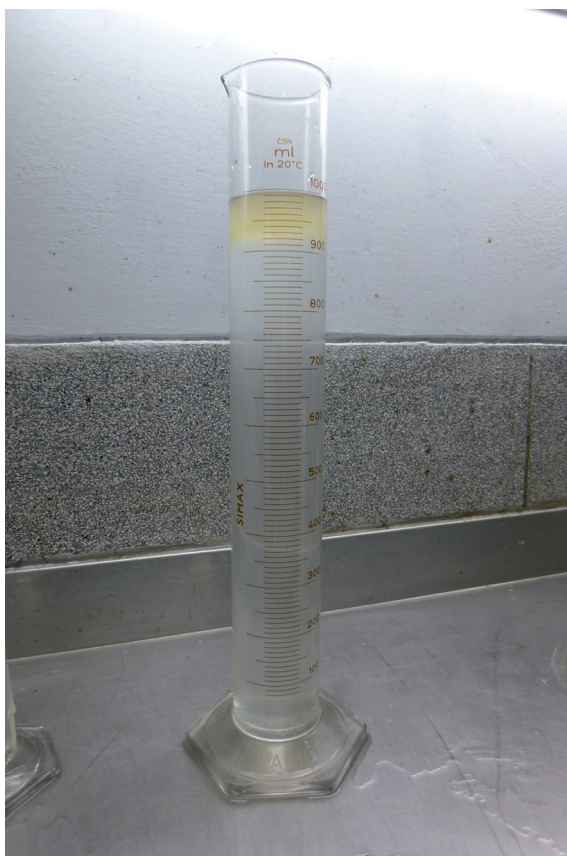


Figura N° 39. Separación de huevo flotantes y no flotantes.

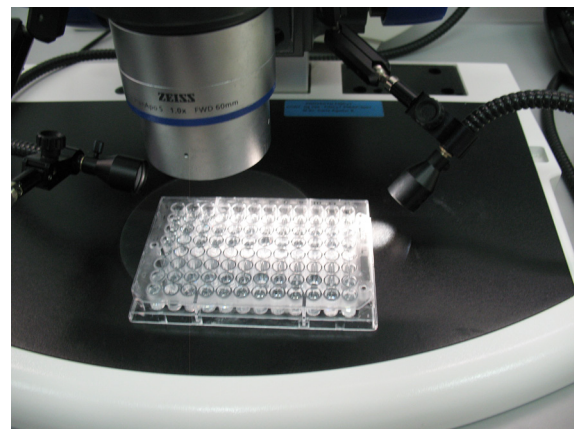



Figura N° 40. Muestreo en Placa de 96 pocillos.



Figura N° 41. Muestra para extracción de lípidos.



EXTRACCIÓN DE MUESTRA Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE SEMEN

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/EMECS



EXTRACCIÓN DE MUESTRA Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE SEMEN Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/EMECS

1. OBJETIVO

Establecer las pautas para la obtención de muestras de semen, destinado a determinar la concentración espermática y el porcentaje de motilidad.

2. FUNDAMENTO

El conocimiento adecuado de las características físicas y químicas de los espermatozoides es importante para obtener puestas viables en peces acondicionados al cautiverio. En el lenguado *Paralichthys adspersus* en condiciones de cultivo, se ha identificado en los machos una baja producción de semen lo cual afecta el porcentaje de fecundación. Por ello, el monitoreo de la calidad espermática es importante porque permite la selección óptima de los reproductores machos y provee de información sobre problemas relacionados a la calidad de los espermatozoides.

3. REFERENCIAS

BEIRA J, SOARES F, HERRAÉZ M P, DINIS M T, CABRITA E. 2009. Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. *Theriogenology* 72: 1251–1261.

CECCON C, HIDEO M, BIANCHINI A, MARINS L, SAMPAIO L. 2010. Sperm quality of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* throughout the reproductive season. *Aquaculture Research*: 1-9.

4. TERMINOLOGÍA

Calidad espermática: medida de la habilidad del esperma a fecundar exitosamente un ovocito. Para su determinación se emplea cualquier parámetro físico cuantificable que se relacione con la capacidad fecundante del espermatozoide.

Concentración espermática: es el número de espermatozoides por mL de muestra de semen, esta se evalúa utilizando la cámara de Neubauer.

Motilidad espermática: se valora el porcentaje de espermatozoides con desplazamiento progresivo.

5. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1 MATERIALES

- Tubos de microcentrífuga (eppendorf)

de 1,5 mL

- Cámara de cultivo celular de 24 pocillos
- Micropipeta automática de 10 - 100 μ L capacidad
- Puntas para micropipeta
- Cámara de Neubauer
- Agua de mar microfiltrada y esterilizada (AMFE)
- Cámara de frío (elaborado en laboratorio)
- Cronómetro
- Contómetro
- Guantes quirúrgicos
- Papel toalla

5.2 REACTIVOS

- Anestésico Tricaine-S (MS 222), frasco por 100 g
- Solución salina 0,9% (SS)

6. PROCEDIMIENTO

- Se anestesian individualmente los peces por inmersión en solución de Tricaine-S a una concentración de 80 mg/L de agua de mar (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/MB).
- Una vez inmobilizados los peces, se realiza un ligero masaje abdominal en dirección al poro genital y se extrae 0,1 mL de volumen de semen con la jeringa de 1 mL (figura N° 42) y se coloca en un eppendorf.
- De la muestra de semen obtenida en otro eppendorf conteniendo 90 μ L de SS se le agrega 10 μ L de semen formando la solución espermática (SE), para mantener inactivos los espermatozoides y almacenar a - 5°C en la cámara de frío.
- Se extrae 10 μ L de SE y se coloca en un pocillo de la placa de cultivo conteniendo 190 μ L de SS para obtener la dilución 1 (D1).
- Para determinar la concentración espermática extraer 10 μ L de D1 y colocarlo en un pocillo de la placa de cultivo conteniendo 90 μ L de SS para obtener la dilución 2 (D2) (figura N° 43).
- Inmediatamente se toma una alícuota de D2 con una micropipeta y se coloca en la cámara de Neubauer para realizar el conteo por triplicado en 3 campos diferentes de la

	<p>INSTRUCTIVO</p> <hr/> <p>EXTRACCIÓN DE MUESTRA Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE SEMEN</p>	 <p>FINCyT innovación • ciencia • tecnología</p>	<p>Revisión: 00 Fecha: Enero, 2013 Página: 2 de 4 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/EMECS</p>
---	---	--	---

cámara. (figura N° 44)

- Para determinar la motilidad espermática en fresco, se extrae 10 µL de D1 y se coloca en un pocillo de la placa de cultivo conteniendo 90 µL de AMFE para activarlos.
- Inmediatamente se toma una alícuota con una micropipeta y se coloca en la cámara de Neubauer.
- Se observa bajo microscopía óptica a los 0; 1; 2; 3 y 4 minutos post-activación en AMFE en 3 campos diferentes de la cámara de Neubauer (figura N° 45).

7. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

a) La concentración espermática/mL:

$$CE \text{ esp/mL: } N \times 5 \times 10^8$$

b) Motilidad espermática (%):

$$\%: \frac{\# \text{ Espermatozoides móviles}}{\# \text{ Espermatozoides totales}} \times 100\%$$



8. REGISTROS

Nombre: Laboratorio de Cultivo de Peces
Código: F-CP-01.01.A/EMECS
Fecha:
Responsable:

Ficha de volúmen espermático

N°	Código de muestra	Volúmen Espermático (mL)

Nombre: Laboratorio de Cultivo de Peces
Código: F-CP-01.01.B/EMECS
Fecha:
Responsable:

Ficha de determinación de la concentración espermática

Fecha	Código de muestra	Conteo N° de espermatozoides			Concentración espermática (esp/mL)
		R1	R2	R3	

Nombre: Laboratorio de Cultivo de Peces
Código: F-CP-01.01.C/EMECS
Fecha:
Responsable:

Ficha de determinación de la motilidad espermática

Fecha	Código de muestra	% Motilidad espermática				
		Mot 0"	Mot 60"	Mot 120"	Mot 180"	Mot 240"



Figura N° 42. Extracción de muestra de semen.

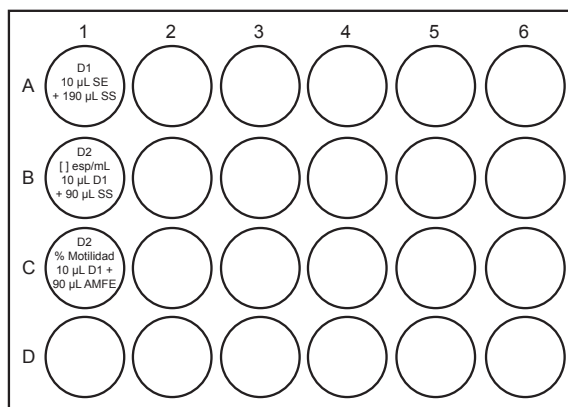


Figura N° 43. Diluciones en la cámara de cultivo celular.

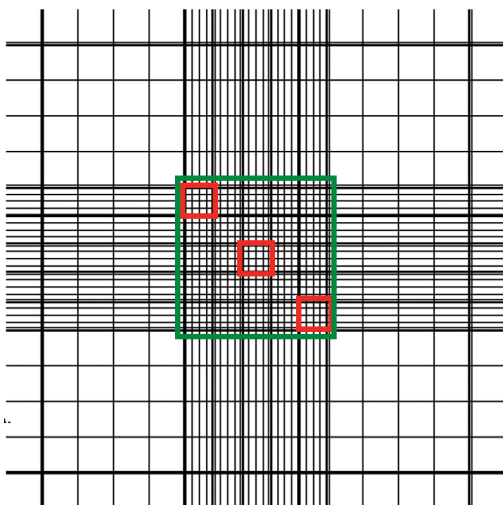


Figura N° 44. Disposición de cuadrículas de la cámara de Neubauer para determinación de concentración (verde) y motilidad espermática (rojo).



Figura N° 45. Análisis de motilidad espermática en el microscopio.



VIABILIDAD ESPERMÁTICA TINCIÓN LIVE/DEAD SPERM VIABILITY KIT

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/VETL/D

	INSTRUCTIVO		Revisión: 00
	VIABILIDAD ESPERMÁTICA TINCIÓN LIVE/DEAD® SPERM VIABILITY KIT		Fecha: Enero, 2013 Página: 1 de 4 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/VETL/D

VIABILIDAD ESPERMÁTICA TINCIÓN LIVE/DEAD® SPERM VIABILITY KIT Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/VETL/D

1. OBJETIVOS

Establecer las pautas a seguir para la evaluación de la viabilidad de espermatozoides de *Paralichthys adspersus* a través del uso del kit de tinción live/dead® sperm viability.

2. FUNDAMENTO

La viabilidad espermática se define como la capacidad de moverse o fecundar de un espermatozoide, así como también se refiere a la integridad de la membrana nuclear, donde se aplican diferentes técnicas como: tinciones duales usando fluorocromos, citometría de flujo y observaciones bajo microscopía confocal.

La técnica de tinción dual o Kit LIVE/DEAD®, utiliza fluorocromos y se basa en que estos pueden o no penetrar las membranas celulares de los espermatozoides. El fluorocromo SYBR 14 es capaz de penetrar la cabeza del espermatozoide, teñir los ácidos nucleicos de las células viables (membrana intacta) y emitir fluorescencia verde; a diferencia del fluorocromo Ioduro de propidio (IP), se emplea para identificar las células no viables, ya que solo penetra en las células si la membrana nuclear se encuentra dañada y tiñe ácidos nucleicos intercalándose entre los pares de bases. Este fluorocromo emite fluorescencia roja y es positivo para células no viables.

3. REFERENCIAS

PANIAGUA C, JENKINS J, SEGOVIA M, TIERSCH T. 2006. Assessment of gamete quality for the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of fluorescent dyes. *Cryobiology* 53: 128-138.

RURANGWA E, KIMBE D, OLLEVIERA F, NASHA J. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234: 1-28.

4. TERMINOLOGÍA

Fluorocromo: molécula química que absorbe luz a una determinada longitud de onda y emite a una longitud superior. Estos ofrecen un método sensible para obtener información acerca de la estructura, función y vitalidad de las células.

Viabilidad espermática: porcentaje de

espermatozoides viables.

5. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1 MATERIALES

- Micropipeta 10 – 100 µL
- Puntas para micropipeta
- Láminas portaobjeto 75 x 25 mm
- Láminas cubreobjetos 22 x 40 mm
- Tubos de microcentrifuga (eppendorf) de 1,5 mL

5.2 REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

5.2.1 Reactivos

- Solución salina 0,9% (SS)
- Kit de Viabilidad Espermática LIVE/DEAD® (L-7011) (figura N° 46):
 - Tinción SYBR 14 (Componente A), solución de 100 µL de 1 mM en DMSO (Dimetilsulfóxido).
 - Ioduro de Propidio (Componente B), solución de 5 mL de 2,4 mM en agua

5.2.2 Preparación de Solución SYBR 14- Solución A

- Se toma de 10 µL de SYBR y se disuelve en 90 µL de DMSO
- La solución se almacena a -20°C y protegida de la luz

5.3 EQUIPOS

- Microscopio de Epifluorescencia NIKON ECLIPSE E600PoI
- Cámara de fotos INFINITE CAPTURE

6. PROCEDIMIENTO

6.1 OBTENER DE LA MUESTRA DE SEMEN

- Se realiza conforme al instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/EMECS.

6.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- Se extrae 10 µL de la solución D1 (ver



INSTRUCTIVO

VIABILIDAD ESPERMÁTICA TINCIÓN LIVE/DEAD® SPERM VIABILITY KIT



Revisión: 00
Fecha: Enero, 2013
Página: 2 de 4
Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/VETL/D

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/EMECS) y se coloca en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL que contiene 90 µL de solución salina (SS).

- Se le adiciona 10 µL de Solución A e se incuba por 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad, siendo su concentración final 100 nM.
- Luego se añade 10 µL de Ioduro de Propidio y se incuba por 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad, siendo su concentración final 24 µM.
- De la mezcla se toma 50 µL y se coloca sobre una lámina portaobjeto cubriéndose con una lámina cubreobjetos y se almacena en oscuridad (realizar 3 repeticiones por cada muestra).

6.3 ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- Se observa las muestras a un aumento 400X en un microscopio de Epifluorescencia NIKON ECLIPSE E600Pol con cámara fotográfica (figura N° 47).
- Se evalúa aproximadamente 200 espermatozoides por cada lámina, los espermatozoides viables son los que emiten una fluorescencia verde y los no viables emiten fluorescencia roja (figura N° 48).

7. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

a) Viabilidad Espermática:

$$\% \text{ Viab.} : \frac{N^{\circ}EV}{N^{\circ}EV + N^{\circ}ENV} \times 100\%$$



INSTRUCTIVO
VIABILIDAD ESPERMÁTICA TINCIÓN
LIVE/DEAD® SPERM VIABILITY KIT



Revisión: 00
 Fecha: Enero, 2013
 Página: 3 de 4
 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/VETL/D

8. REGISTRO

Nombre: Laboratorio de Cultivo de Peces

Código: F-CP-01.01/VETL/D

Fecha:

Responsable:

Ficha de evaluación de la viabilidad espermática

Fecha	Código de muestra	Técnica de tinción	Lámina	N° espermatozoides viables	N° espermatozoides no viables	% Viabilidad Espermática



Figura N° 46. Kit de viabilidad espermática.

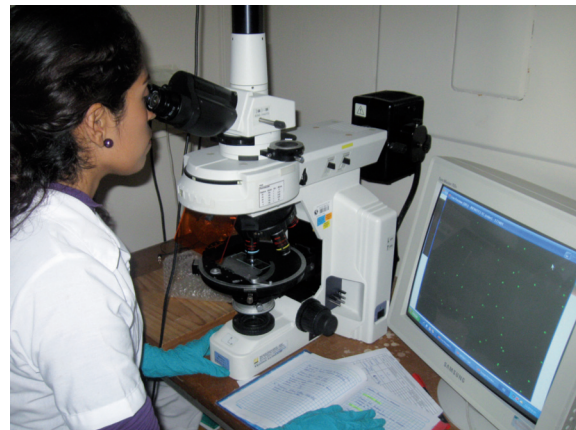


Figura N° 47. Evaluación de viabilidad espermática con el Kit LIVE/DEAD® en el Microscopio de Epifluorescencia.

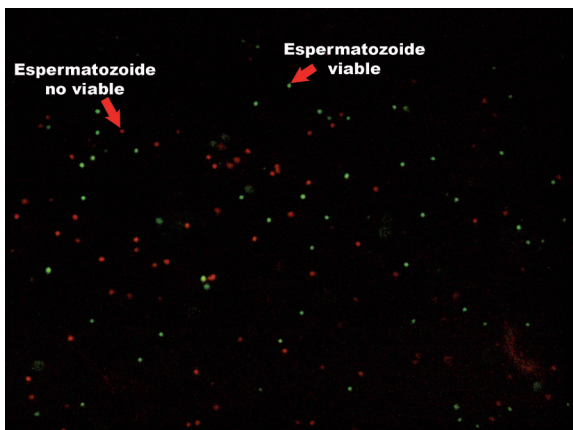


Figura N° 48. Espermatozoides viables y no viables.



VIABILIDAD ESPERMÁTICA TINCIÓN EOSINA/NIGROSINA

Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/VETE/N



INSTRUCTIVO

VIABILIDAD ESPERMÁTICA: TINCIÓN VITAL EOSINA/NIGROSINA



Revisión: 00
Fecha: Enero, 2013
Página: 1 de 4
Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/VETE/N

VIABILIDAD ESPERMÁTICA TINCIÓN VITAL EOSINA/NIGROSINA Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/VETE/N

1. OBJETIVOS

Establecer las pautas a seguir para la evaluación de la viabilidad de espermatozoides de *Paralichthys adspersus* empleando la técnica de tinción vital Eosina – Nigrosina.

2. FUNDAMENTO

El concepto de esta técnica se basa en diferenciar las células vivas de las muertas ya que las células muertas son permeables a los colorantes a causa de la degradación de su membrana, mientras que las vivas no permiten el paso de los colorantes. Los espermatozoides muertos se tiñen de rojo por el ingreso de la eosina mientras los vivos se muestran incoloros y brillan sobre el fondo oscuro que provee la nigrosina.

En tal sentido, la motilidad es un parámetro que define la calidad del espermatozoide, sin embargo, en una muestra a veces se presentan espermatozoides inmóviles que pueden estar vivos; para la identificación de ellos se emplea la coloración vital de eosina-nigrosina, que establece dicha diferencia.

3. REFERENCIAS

BJOËRNDAHL L, SOËDERLUND I, KVIST U. 2003. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. Human Reproduction 18(4): 813-816.

VUTHIPHANDCHAI V, CHOMPHUTHAWACH S, NIMRAT S. 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. Theriogenology 72(1): 129-138.

4. TERMINOLOGÍA

Tinción vital: se denomina así porque sirve para diferenciar células vivas de las muertas.

Viabilidad espermática: porcentaje de espermatozoides viables.

5. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.1 MATERIALES

- Vasos de precipitado
- Micropipeta 10 – 100 µL

- Frascos de vidrio oscuro
- Puntas para micropipeta
- Tubos de microcentrifuga de 1,5 mL
- Laminas Portaobjetos 75 x 25 mm
- Filtro (Whatman N° 40)

5.2 REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

5.2.1 Reactivos

- Eosina (Eo)
- Nigrosina (Nig)

5.2.2 Preparación de Solución Eosina-Nigrosina (Eo-Nig) en volumen de 50 mL:

- Se pesa 2,5 g de Eo y se diluye con agua destilada en un vaso de precipitado de 50 mL para tener una concentración final del 5%.
- Luego se pesa 5 g de Nig y se adiciona a la mezcla anterior para tener una concentración final del 10% de este último reactivo.
- Se mezclan ambas soluciones empleando el agitador magnético a temperatura de 40°C, se filtra dos veces y se almacena en un frasco oscuro a temperatura ambiente.

5.3 EQUIPOS



- Microscopio Biológico MEIJI TECHNO CO., LTD.
- Cámara fotográfica CANON POWERSHOT 640 (10 Mpx)
- Balanza de analítica Kern AB3 220-4M (Cap. Max. 220 g; precis. 0,001 g)
- Agitador magnético (VELP AREC Heating magnetic stirrer)

6. PROCEDIMIENTO

6.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE SEMEN

- Se realiza conforme al Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/EMECS.

6.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

	INSTRUCTIVO		Revisión: 00
	VIABILIDAD ESPERMÁTICA: TINCIÓN VITAL EOSINA/NIGROSINA		Fecha: Enero, 2013 Página: 2 de 4 Código: IMP-CP-I-Lab-01.01/VETE/N

- Se extrae 10 µL de muestra de la solución D1 (ver Instructivo IMP-CP-I-Lab-01.01/EMECS) y se coloca en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL conteniendo 90 µL de solución salina (SS).
- Sobre una lámina portaobjeto se coloca 10 µL de la solución anterior y se le agrega 10 µL de Solución Eo-Nig, se realiza un frotis a lo largo de la lámina y se deja secar a temperatura ambiente por 15 min (realizar 3 repeticiones por cada muestra) (figura N° 49).

6.3 ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- Se evalúa la viabilidad espermática de las muestras a un aumento de 400X en un microscopio con cámara fotográfica (figura N° 50).
- Se evalúa aproximadamente 200 espermatozoides por cada lámina, los espermatozoides viables son los que emiten brillantez y los no viables son de color rojo (figura N° 51). Los resultados se colocan en la ficha de evaluación de la viabilidad espermática.

7. EXPRESIÓN RESULTADOS

a) Viabilidad Espermática

$$\% \text{ Viab.} := \frac{N^{\circ}EV}{N^{\circ}EV + N^{\circ}ENV} \times 100\%$$



INSTRUCTIVO

VIABILIDAD ESPERMÁTICA: TINCIÓN VITAL EOSINA/NIGROSINA



Revisión: 00
Fecha: Enero, 2013
Página: 3 de 4
Código: IMP-CP-Lab-01.01/VETE/N

8. REGISTRO

Nombre: Laboratorio de Cultivo de Peces

Código: F-CP-01.01/VETE/N

Fecha:

Responsable:

Ficha de evaluación de la viabilidad espermática

Fecha	Código de muestra	Técnica de tinción	Lámina	N° espermatozoides viables	N° espermatozoides no viables	% Viabilidad Espermática

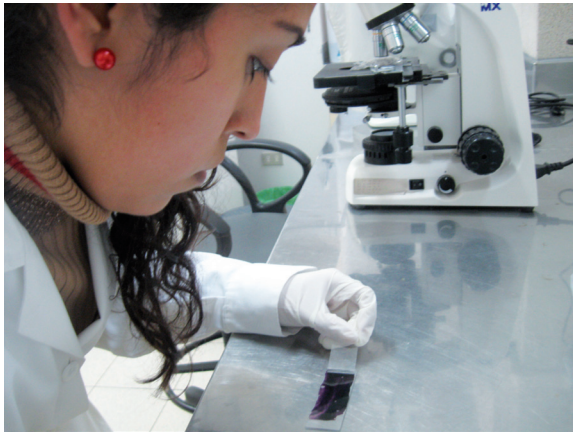


Figura N° 49. Preparación de lámina portaobjeto (frotis con Eo-Nig).



Figura N° 50. Evaluación de viabilidad con Eo-Nig en el microscopio.

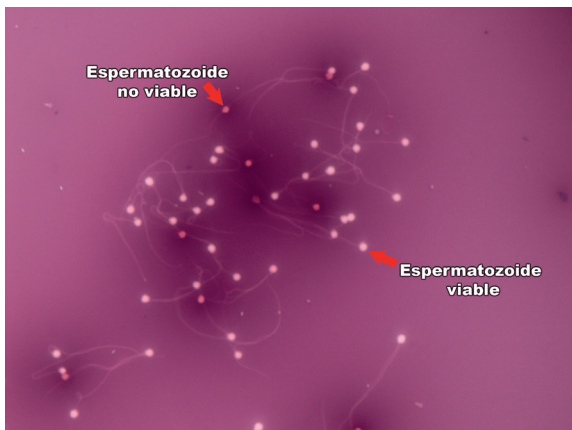


Figura N° 51. Espermatozoides teñidos con Eo-Nig.



INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ
Esquina Gamarra y General Valle S/N Chucuito Callao
Telf. (051)6250800
<http://www.imarpe.pe/imarpe/>