

BOLETÍN

INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

ISSN 0458-7766

VOLUMEN 33, Número 2



Julio - Diciembre 2018
Callao, Perú



PERÚ

Ministerio
de la Producción

ESCALA DE MADUREZ GONADAL DEL CALAMAR GIGANTE *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) (CEPHALOPODA: OMMASTREPHIDAE)

GONADAL MATURITY SCALE OF THE JUMBO FLYING SQUID *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) (CEPHALOPODA: OMMASTREPHIDAE)

Ángel Perea¹

Javier Sánchez¹

Betsy Buitrón¹

RESUMEN

PEREA A, SÁNCHEZ J, BUITRÓN B. 2018. Escala de madurez gonadal del calamar gigante *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Bol Inst Mar Perú*. 33(2): 137-152.- Con muestras obtenidas durante el Crucero de Investigación del Calamar gigante, a bordo del B/P Shinko Maru 3 Cr. 0010-11 (octubre-noviembre del año 2000), se contrastaron las características macroscópicas del tejido gonadal con las observadas a nivel microscópico, determinándose una escala de madurez gonadal que consta de cuatro fases de desarrollo gonadal para hembras y 3 para machos. Se presenta la equivalencia de las cuatro fases de madurez gonadal propuestas para hembras, con escalas propuestas por otros autores. Cabe mencionar la existencia de individuos grandes con fase de madurez I. En los machos, la presencia o ausencia de espermatóforos tanto en el saco espermatofórico, como en la cavidad visceral, es determinante para discriminar a los individuos en fase II o III.

PALABRAS CLAVE: *Dosidicus gigas*, calamar gigante, escala de madurez gonadal

ABSTRACT

PEREA A, SÁNCHEZ J, BUITRÓN B. 2018. Gonadal maturity scale of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Bol Inst Mar Peru*. 33(2): 137-152.- With samples obtained during the Research Survey on Jumbo flying squid, aboard the R/V Shinko Maru 3, carried out in October-November 2000, visual gonadal characteristics were contrasted with microscopic features, determining a gonadal maturity scale consisting of 4 gonadal development stages for females and 3 for males. For the case of females, the four stages of gonadal maturity proposed in this paper, are equivalent as those proposed by other authors. It is important to mention the high frequency observed in stage I, in some cases found in large individuals. In males, the presence or absence of spermatophores in spermatophoric sac or in the visceral cavity indicates whether the individual is in stage II or III.

KEYWORDS: *Dosidicus gigas*, jumbo flying squid, gonadal maturity scale

1. INTRODUCCIÓN

Dosidicus gigas (d'Orbigny, 1835), calamar gigante o pota es un cefalópodo cuyos desembarques se han incrementado a partir de los años 1990 y se han mantenido en los últimos 20 años en Perú. Se consideran a las aguas peruanas como las que sostienen la población más grande que soporta los mayores desembarques (NIGMATULLIN *et al.* 2001). En el 2014 se observó que los volúmenes extraídos se mantuvieron altos durante todo el año, debido a su mayor disponibilidad en las áreas de pesca; en el 2015 la variación mensual de los desembarques mantuvo el patrón general (YAMASHIRO *et al.* 2016). Los rasgos morfológicos y la historia de vida de *D. gigas* responden de manera altamente variable con los cambios de las condiciones ambientales, impactos de la pesca y de forma más positiva a través de la reducción de competidores y depredadores (KEYL 2009). Según NIGMATULLIN *et al.* (2001), esta especie, como la mayoría de los cefalópodos, presenta reproducción semélpara, es decir, se reproduce una vez en su vida y muere poco después. Los diversos índices reproductivos (IGS índice gonadosomático, IGN índice

1. INTRODUCTION

Dosidicus gigas (d'Orbigny, 1835), or jumbo flying squid is a cephalopod whose landings have increased since the 1990s and have been maintained in the last 20 years in Peru. Peruvian waters are considered to be those that maintain the largest population that supports most landings (NIGMATULLIN *et al.* 2001). In 2014 it was observed that the volumes extracted remained high throughout the year, due to their greater availability in the fishing areas; in 2015 the monthly variation in landings maintained the general pattern (YAMASHIRO *et al.* 2016). The morphological characteristics and life history of *D. gigas* respond in a highly variable way to changes in environmental conditions, impacts of fishing and more positively through the reduction of competitors and predators (KEYL 2009). According to NIGMATULLIN *et al.* (2001), this species, like most cephalopods, is semelparous, i.e. it reproduces once in its life and dies shortly afterwards. The various reproductive indices (GSI gonadosomatic index, NGI nidamental index, SCI spermatophoric complex index) in Peru indicate

¹ Instituto del Mar del Perú. Esquina Gamarra y General Valle S/N Chucuito, Callao, Perú
Email: aperea@imarpe.gob.pe

de la glándula nidamental, SCI índice del complejo espermatofórico) en Perú, indican que mantiene una actividad reproductiva todo el año, con un periodo de mayor actividad desde julio hasta febrero y picos entre octubre y enero (primavera y verano) (NESIS 1970, 1983; TAFUR y RABÍ 1997, TAFUR *et al.* 2001, TAFUR *et al.* 2010, YATSU *et al.* 1999, CSIRKE *et al.* 2015). Su talla de madurez es muy variable y varios autores han propuesto diferentes estrategias al respecto (NESIS 1983, NIGMATULLIN *et al.* 2001).

En el Perú se confirma la existencia de grupos intraespecíficos o sub-unidades poblacionales que se superponen y que se diferencian de acuerdo a la talla a la cual alcanzan la madurez gonadal (ARGÜELLES *et al.* 2001, NIGMATULLIN *et al.* 2001, TAIPE *et al.* 2001, TAFUR *et al.* 2001, CSIRKE *et al.* 2015, TAFUR *et al.* 2018), que para algunos autores se debe a la existencia de una estrategia migratoria (IBÁÑEZ y CUBILLOS 2007, IBÁÑEZ *et al.* 2015). En Chile se han encontrado paralarvas de *D. gigas* muy lejos de la costa y se ha sugerido que la zona de desove es oceánica (IBÁÑEZ *et al.* 2015) por lo que se puede considerar que los calamares podrían estar desovando en zonas que no corresponden al área de estudio. Para poder verificar este y otros parámetros reproductivos, es importante que la determinación del estado reproductivo sea efectuada con el uso de una escala macroscópica que proporcione el menor sesgo y facilidad en la catalogación de cada fase de madurez.

El análisis del proceso de maduración gonadal en varias especies de cefalópodos ha sido fundamental para entender su ciclo de vida, identificar poblaciones y cohortes e incluso para definir estrategias de manejo (SAUER y LIPINSKI 1990). La determinación de las fases de madurez gonadal es la base para el estudio de variables y aspectos reproductivos como talla de madurez gonadal, potencial reproductivo, periodos de actividad reproductiva y desove (BUITRÓN *et al.* 2015) por lo tanto, es importante determinarlos con la mayor precisión posible. En ese sentido, varias escalas de madurez gonadal se han desarrollado para este cefalópodo (NESIS 1970, JUANICO 1983, ARKHIPKIN 1992, TAFUR y RABÍ 1997). En el presente trabajo se describe una escala de madurez macroscópica, validada microscópicamente, que es simple y con terminología sencilla, práctica, referenciada, cuyas fases de madurez, tipifican las etapas más conspicuas del proceso de maduración en este cefalópodo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

En aguas peruanas, durante el Crucero de Investigación del calamar gigante, a bordo del B/P Shinko Maru 3 0010-11 realizado entre octubre y noviembre del año 2010, se recolectaron 179 gónadas (87 ovarios y 92 testículos), registrándose, además de los datos biométricos, en las hembras las principales características de sus ovarios,

that it maintains reproductive activity throughout the year, with a period of peak activity from July to February and peaks between October and January (spring and summer) (NESIS 1970, 1983; TAFUR & RABÍ 1997, TAFUR *et al.* 2001, TAFUR *et al.* 2010, YATSU *et al.* 1999, CSIRKE *et al.* 2015). Their size of maturity is very variable and several authors have proposed different strategies in this regard (NESIS 1983, NIGMATULLIN *et al.* 2001).

In Peru, the existence of intraspecific groups or population subunits is confirmed, which overlap and differ according to the size at which they reach gonadal maturity (ARGÜELLES *et al.* 2001, NIGMATULLIN *et al.* 2001, TAIPE *et al.* 2001, TAFUR *et al.* 2001, CSIRKE *et al.* 2015, TAFUR *et al.* 2018), which for some authors is due to the existence of a migration strategy (IBÁÑEZ & CUBILLOS 2007, IBÁÑEZ *et al.* 2015). In Chile, *D. gigas* paralarvae have been found far from the coast and it has been suggested that the spawning area is oceanic (IBÁÑEZ *et al.* 2015), so it can be considered that squids may be spawning in areas that do not correspond to the study area. In order to verify this and other reproductive parameters, it is important that the determination of reproductive status be carried out using a macroscopic scale that provides the least bias and ease in the cataloguing of each maturity phase.

Analysis of the gonadal maturation process in several cephalopod species has been fundamental to understanding their life cycle, identifying populations and cohorts and even defining management strategies (SAUER & LIPINSKI 1990). The determination of gonadal maturity phases is the basis for the study of reproductive variables and aspects such as gonadal maturity size, reproductive potential, periods of reproductive activity and spawning (BUITRÓN *et al.* 2015), therefore, it is important to determine them as precisely as possible. In that sense, several gonadal maturity scales have been developed for this cephalopod (NESIS 1970, JUANICO 1983, ARKHIPKIN 1992, TAFUR & RABÍ 1997). This paper describes a macroscopic maturity scale that is microscopically validated, simple and presented in simple and practical terminology, which is referenced and whose maturity phases typify the most conspicuous stages of the maturation process in this cephalopod.

2. MATERIAL AND METHODS

In Peruvian sea, during the Research Cruise aboard the R/V Shinko Maru 3 0010-11 carried out between October and November 2010, 179 gonads (87 ovaries and 92 testicles) were collected, in addition to biometric data: In females, the main characteristics of their ovaries, such as turgidity, texture, fullness

tales como turgencia, textura, llenura y presencia de ovocitos en el oviducto; en los machos, presencia de espermátóforos en la cavidad visceral y, en ambos sexos, el desarrollo de glándulas anexas. Las gónadas se procesaron histológicamente usando la técnica de infiltración en parafina descrita por HUMASON (1979). Con el uso del micrótopo de rotación se realizaron cortes de 7 µm de espesor para gónadas de hembras y machos. Las secciones histológicas obtenidas fueron coloreadas con Hematoxilina-Eosina (H-E) contrastante y analizadas con un microscopio compuesto. La observación de las secciones histológicas se realizó en detalle, clasificándose a los distintos tipos de ovocitos en función del número y distribución, grado de vitelogenénesis y formación de folículos. Los tipos de ovocitos fueron: ovocito inmaduro, ovocito pre-vitelogenado, ovocito vitelogenado, ovocito maduro y ovocito hidratado, utilizando las descripciones realizadas por MARKAIDA (2002) y BURUKOVSKY *et al.* (1977). En el caso de los machos se identificó la histo-arquitectura testicular para diferenciar las fases de maduración gonadal.

El análisis histológico de cada gónada se contrastó con las características macroscópicas más sobresalientes de las mismas, determinándose las fases de desarrollo gonadal para ambos sexos, las que se ordenaron dentro de una escala de madurez gonadal macroscópica validada microscópicamente.

Luego de la identificación de cada tipo de ovocito, fueron registrados los diámetros en las células seccionadas centralmente, para lo cual se utilizó un sistema de análisis de imágenes previamente calibrado a 40x de aumento. Para una mejor visualización de las mediciones se elaboró un diagrama de cajas por tipo de célula.

3. RESULTADOS

La escala de madurez gonadal se elaboró con base en la descripción del desarrollo ovocitario y espermatogénico de *D. gigas* (Tablas 1, 2 - Anexo).

ESCALA DE MADUREZ GONADAL PARA HEMBRAS

De acuerdo a las observaciones y comparaciones histológicas realizadas en los ovarios colectados y a sus características macroscópicas, se diferenciaron cuatro fases de madurez gonadal para las hembras de *D. gigas*, que se describen a continuación:

Inmaduro (Estadio o Fase I):

Macroscópicamente el ovario inmaduro se caracteriza por ser un órgano en forma de saco piriforme, alargado, de aspecto liso a granuloso, translúcido o de color blanco, siendo translúcido en su fase inicial y un tanto opalescente (opaco) en su fase final. En los oviductos y glándulas oviductales no se observan ovocitos (Fig. 1A).

and presence of oocytes in the oviduct. In males, presence of spermatophores in the visceral cavity and, in both sexes, the development of attached glands. The gonads were histologically processed using the paraffin infiltration technique described by HUMASON (1979). With the use of the rotating microtome, cuts of 7 µm were made for gonads of females and males. The histological sections obtained were stained with contrasting Hematoxylin-Eosin (H-E) and analyzed with a composite microscope. The observation of the histological sections was carried out in detail, classifying the different types of oocytes according to the number and distribution, degree of vitellogenesis and follicle formation. The types of oocytes were: immature, pre-vitellogenic, vitellogenic, mature and hydrated, using the descriptions made by MARKAIDA (2002) and BURUKOVSKY *et al.* (1977). In the case of males, the testicular histo-architecture was identified to differentiate the phases of gonadal maturation.

The histological analysis of each gonad was contrasted with the most outstanding macroscopic characteristics of each one, determining the stages of gonad development for both sexes, which were ordered within a macroscopically validated gonadal maturity scale.

After the identification of each type of oocyte, the diameters were recorded in the centrally sectioned cells, using an image analysis system previously calibrated to 40x magnification. For a better visualization of the measurements, a box diagram by cell type was developed.

3. RESULTS

The gonadal maturity scale was elaborated based on the description of the oocyte and spermatogenic development of *D. gigas* (Tablas 1, 2 - Annexed).

GONADAL MATURITY SCALE FOR FEMALES

According to the observations and histological comparisons made in the collected ovaries and their macroscopic characteristics, four phases of gonadal maturity were differentiated for females *D. gigas*, which are described below:

Immature (Stage or Phase I):

Macroscopically, the immature ovary is characterized by being an organ in the form of a piriform sac, elongated, smooth to granular, translucent or white, being translucent in its initial phase and somewhat opalescent (opaque) in its final phase. No oocytes are observed in oviducts and oviductal glands (Fig. 1A).

Microscópicamente se observan ovocitos inmaduros de forma redondeada algunos y poligonales otros, con citoplasma basófilo y núcleo que llena casi todo el citoplasma, presentando varios nucléolos bien definidos dispersos en el citoplasma con uno de ellos de mayor tamaño. El espacio intercelular es reducido, pudiendo existir células germinales que rodean a cada uno de los ovocitos. La pared del ovario es delgada y eosinófila (Fig. 1B).

Microscopically, immature oocytes are observed in rounded shapes, some of them polygonal, others with basophilic cytoplasm and nucleus that fills almost all the cytoplasm, presenting several well-defined nucleoli dispersed in the cytoplasm with one of them of greater size. The intercellular space is reduced, being able to exist in it germinal cells that surround to each one of the oocytes. The wall of the ovary is thin and eosinophilic (Fig. 1B).

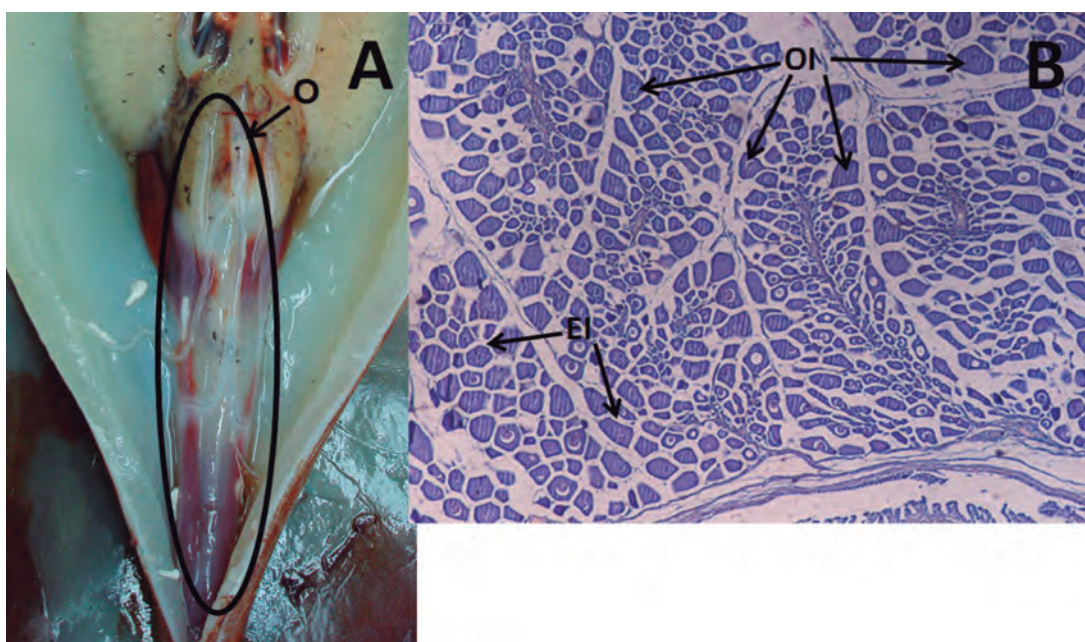


Figura 1.- A) Ejemplar hembra de *D. gigas* en fase I de madurez gonadal, en donde se presenta un ovario inmaduro. B) Corte histológico de ovario en fase I de madurez gonadal, en donde se notan ovocitos inmaduros (OI) y el reducido espacio intercelular (EI) existente entre ellos. 100X

Figure 1. A) Female specimen of *Dosidicus gigas* in phase I of gonadal maturity, where an immature ovary is present. B) Histological cut of the ovary in phase I of gonadal maturity, in which immature oocytes (OI) and the reduced intercellular space (EI) between them are noted. 100X

En maduración (Estadio o Fase II):

Macroscópicamente el ovario es de aspecto granuloso, opaco y su color varía de blanco a crema. En los oviductos y glándulas oviductales aún no se observan ovocitos (Fig. 2A).

Maturing (Stage or Phase II):

Macroscopically the ovary is granular, opaque in appearance and varies in color from white to cream. In the oviducts and oviductal glands, no oocytes are yet observed (Fig. 2A).

Microscópicamente en el ovario se observan dos tipos de ovocitos: inmaduros y en maduración. Estos últimos se caracterizan por ser más grandes que los ovocitos inmaduros y ligeramente acidófilos, tienen el núcleo más pequeño y de posición central. El folículo, que rodea al ovocito, presenta “invaginaciones” de aspecto sinuoso (Fig. 2B).

Two types of oocytes are observed microscopically in the ovary: immature and maturing. The latter are characterized by the fact that they are larger than immature oocytes, slightly acidophilous, and have the smallest and most centrally positioned nucleus. The follicle, which surrounds the oocyte, has winding “invaginations” of sinuous aspect (Fig. 2B).

Maduro (Estadio o Fase III):

Macroscópicamente el ovario es de mayor volumen, turgente y de aspecto piriforme; su pared es delgada y transparente, por ello, los ovocitos maduros se pueden observar a simple vista. Su color varía de crema amarillento a ámbar. Glándulas nidamentales muy desarrolladas (Fig. 3A).

Mature (Stage or Phase III):

Macroscopically, the ovary is larger, swollen and piriform in appearance; its wall is thin and transparent, so mature oocytes can be seen with the naked eye. Its color varies from yellowish cream to amber. Highly developed nidamental glands (Fig. 3A).

Microscópicamente el ovario maduro presenta cuatro tipos de ovocitos: inmaduro, en maduración, maduro y maduro avanzado. Estos últimos son de mayor tamaño, presentan un citoplasma eosinófilo con abundante vitelo, el núcleo en los estados más avanzados se vuelve periférico y más pequeño. Cuando éstos alcanzan su máxima madurez las “invaginaciones” desaparecen. Los oviductos presentan ovocitos maduros avanzados ovulados (sin folículo), en cantidad variable (Fig. 3B).

Microscopically, the mature ovary presents four types of oocytes: immature, maturing, mature and advanced mature. The latter are larger, have an eosinophilic cytoplasm with abundant yolk, the nucleus in the more advanced stages becomes peripheral and smaller. When they reach their maximum maturity, the “invaginations” disappear. The oviducts have advanced mature ovulated oocytes (without follicle), in variable quantity (Fig. 3B).

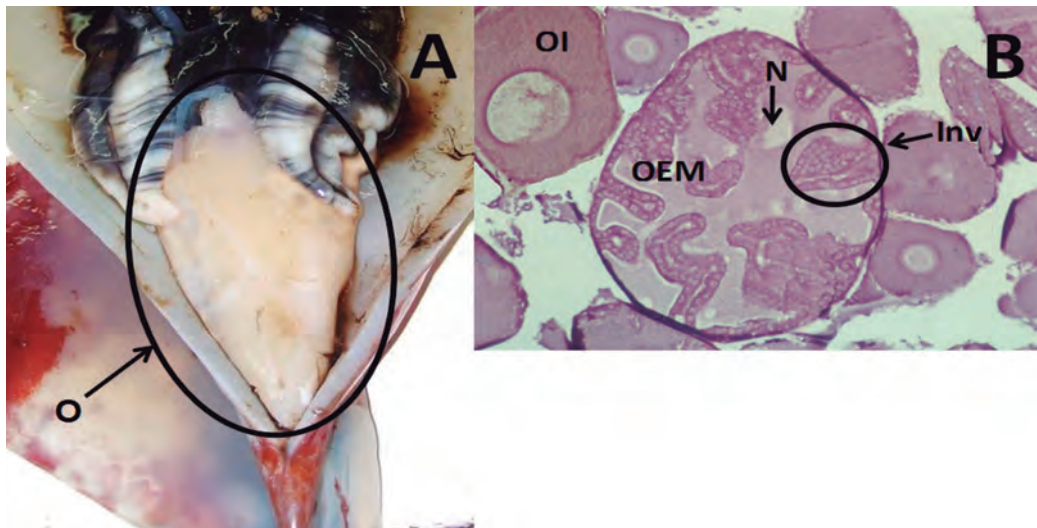


Figura 2.- A) Ejemplar hembra de *Dosidicus gigas* en fase II de madurez gonadal. Obsérvese el ovario en maduración (O). B) Corte histológico de ovario en fase II, donde es notoria la presencia de ovocitos inmaduros (OI), ovocitos en maduración (OEM), núcleo (N) y las invaginaciones del folículo (Inv). 400X

Figure 2. A) Female specimen of *Dosidicus gigas* in phase II of gonadal maturity. The ovary is observed to be maturing (O). B) Histological cut of the ovary in phase II, where the presence of immature oocytes (OI), maturing oocytes (OEM), nucleus (N) and invaginations of the follicle (Inv) is notorious.

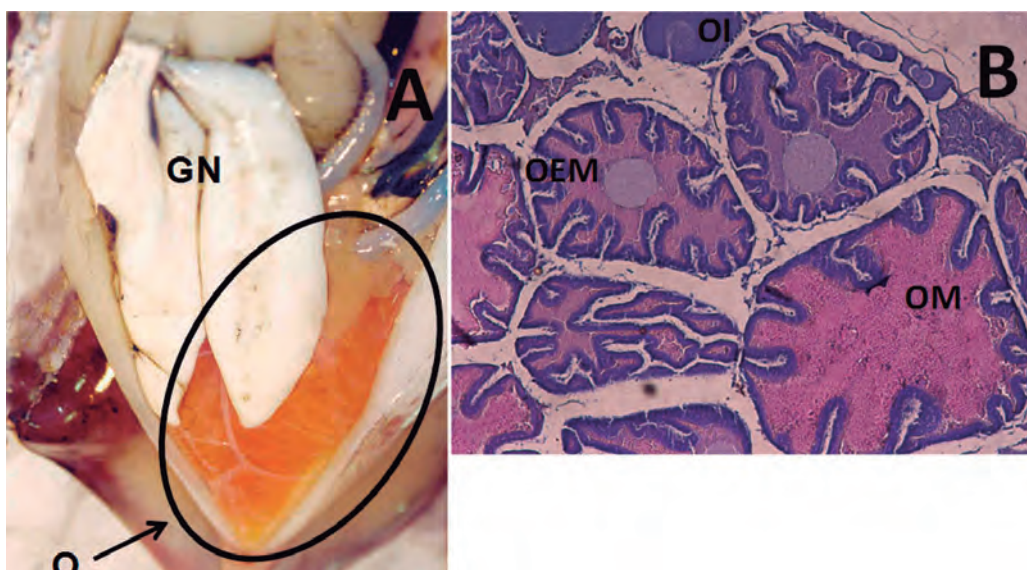


Figura 3.- A) Ejemplar hembra de *Dosidicus gigas* en fase III de madurez gonadal, se observa el ovario maduro (O) y la glándula nidamental (GN). B) Corte histológico de un ovario en fase II con ovocitos inmaduros (OI), ovocitos en maduración (OEM) ovocito maduro (OM). 400X

Figure 3. A) Female specimen of *Dosidicus gigas* in phase III of gonadal maturity, the mature ovary (O) and the nidamental gland (GN) are observed. B) Histological cut of a phase II ovary with immature oocytes (OI), maturing oocytes (OEM) and mature oocytes (OM). 400X

En desove (Estadio o Fase IV):

Macroscópicamente el ovario es menos turgente, granuloso, con gran cantidad de ovocitos color crema amarillo y ámbar, su pared es muy delgada. Los ovocitos color ámbar son los predominantes y le dan una tonalidad naranja al ovario (Fig. 4A).

Microscópicamente se observan los cuatro tipos de ovocitos: inmaduro, en maduración, maduro y maduro avanzado. Es posible observar en el ovario la presencia de folículos post-ovulatorios. Los oviductos al igual que en el fase III, presentan ovocitos maduros avanzados ovulados (sin folículo) en cantidades variables; es posible observar huevos en la parte distal de la glándula oviductal (Fig. 4B).

Spawning (Stage or Phase IV):

Macroscopically the ovary is less turgid, grainy, with a large number of yellow and amber cream oocytes, its wall is very thin. The amber oocytes are predominant and give the ovary an orange hue (Fig. 4A).

Microscopically, the four types of oocytes are observed: immature, maturing, mature and advanced mature. It is possible to observe the presence of post-ovulatory follicles in the ovary. The oviducts, as in phase III, have advanced mature oocytes ovulated (without follicle) in varying amounts; it is possible to observe eggs in the distal part of the oviductal gland (Fig. 4B).

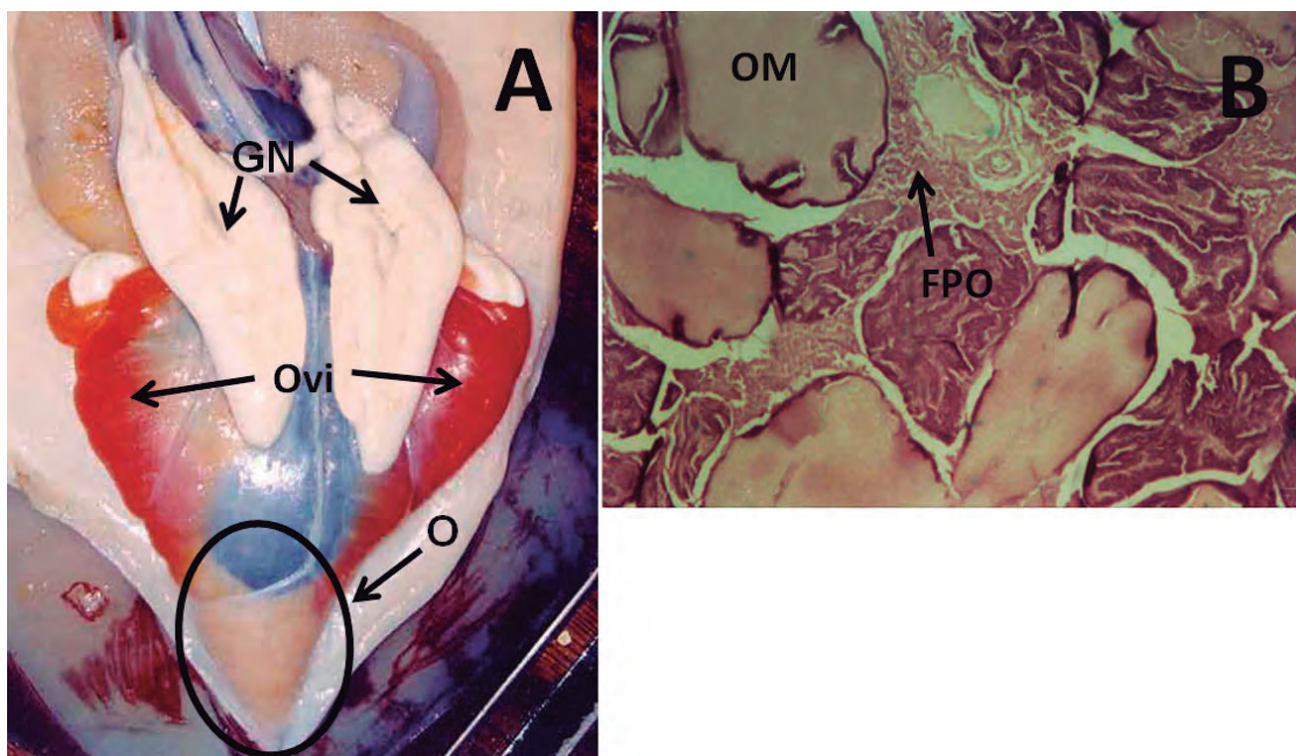


Figura 4.- A) Ejemplar hembra de *Dosidicus gigas* en fase IV de madurez gonadal, mostrando el ovario desovante (O), los oviductos (Ovi) llenos de ovocitos maduros avanzados y la glándula nidamental (GN). B) Corte histológico de ovario en fase III, se notan ovocitos maduros (OM) y folículos post-ovulatorios (FPO). 400X

Figure 4. A) Female specimen of *Dosidicus gigas* in phase IV of gonadal maturity, showing the spawning ovary (O), the oviducts (Ovi) filled of advanced mature oocytes and the nidamental gland (GN). B) Histological cut of the ovary in phase III, mature oocytes (OM) and post-ovulatory follicles (FPO) are noted. 400X.

Las mediciones realizadas por tipo de ovocito son presentadas en la figura 5, donde se puede observar el crecimiento en tamaño de las células desde ovocitos inmaduros (OI) cuyo diámetro medio fue de 337,4 μ hasta el ovocito maduro avanzado (OMAV) cuyo diámetro medio alcanzó 900,0 μ

The measurements made by type of oocyte are presented in Figure 5, where the growth in cell size from immature oocytes (OI) with an average diameter of 337.4 μ to advanced mature oocyte (OMAV) with an average diameter of 900.0 μ can be seen.

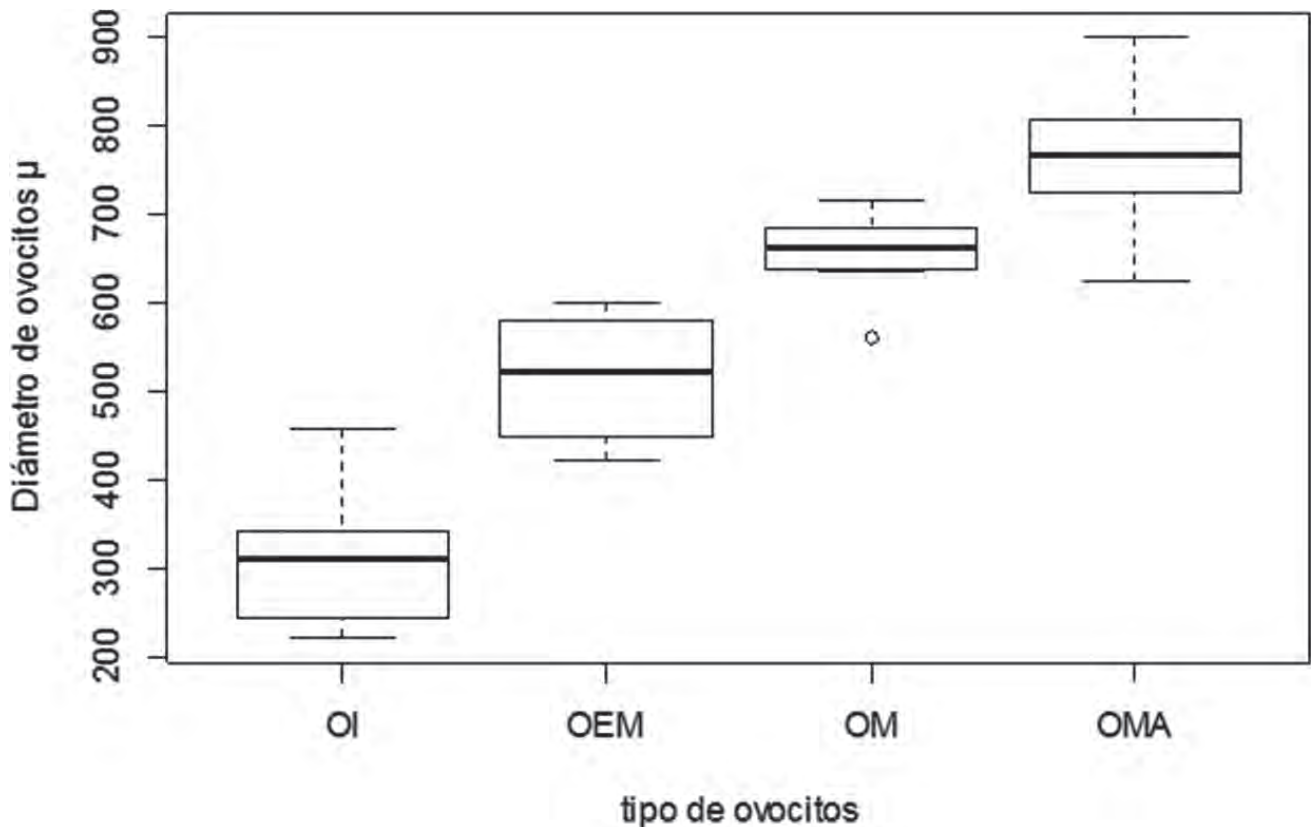


Figura 5.- Diámetro de ovocitos, según el tipo, OI = Ovocito inmaduro; OEM = Ovocito en madurez; OM = Ovocito maduro; OMA = Ovocito maduro avanzado de *Dosidicus gigas*

Figure 5. Oocyte diameter, depending on type, OI = Immature oocyte; OEM = Maturing oocyte; OM = Mature oocyte; OMA = Advanced mature oocyte of *Dosidicus gigas*

ESCALA DE MADUREZ GONADAL PARA MACHOS

De acuerdo a las observaciones realizadas, se diferenciaron tres fases de madurez gonadal para los machos, que son las siguientes:

Inmaduro (Estadio o Fase I):

Macroscópicamente el testículo inmaduro es delgado y translúcido. El complejo espermatofórico se encuentra en formación y sin espermatóforos visibles en el saco espermatofórico (Fig. 6A).

Microscópicamente está conformado por túbulos pequeños que contienen espermatogonios y/o espermatocitos, los cuales ocupan toda la cavidad interna de manera uniforme. Los espermatogonios y espermatocitos son células esféricas y fuertemente basófilas, siendo los espermatocitos de dimensiones más pequeñas (Fig. 6B).

GONADAL MATURITY SCALE FOR MALES

According to the observations made, three phases of gonadal maturity were differentiated for males, which are as follows:

Immature (Stage or Phase I):

Macroscopically, the immature testicle is thin and translucent. The spermatophoric complex is in formation and without visible spermatophores in the spermatophoric sac (Fig. 6A).

Microscopically, it is made up of small tubules containing spermatogonies and/or sperm cells, which occupy the entire internal cavity in a uniform manner. Spermatogonies and sperm cells are spherical and strongly basophilic cells, with the spermatocytes being smaller in size (Fig. 6B).

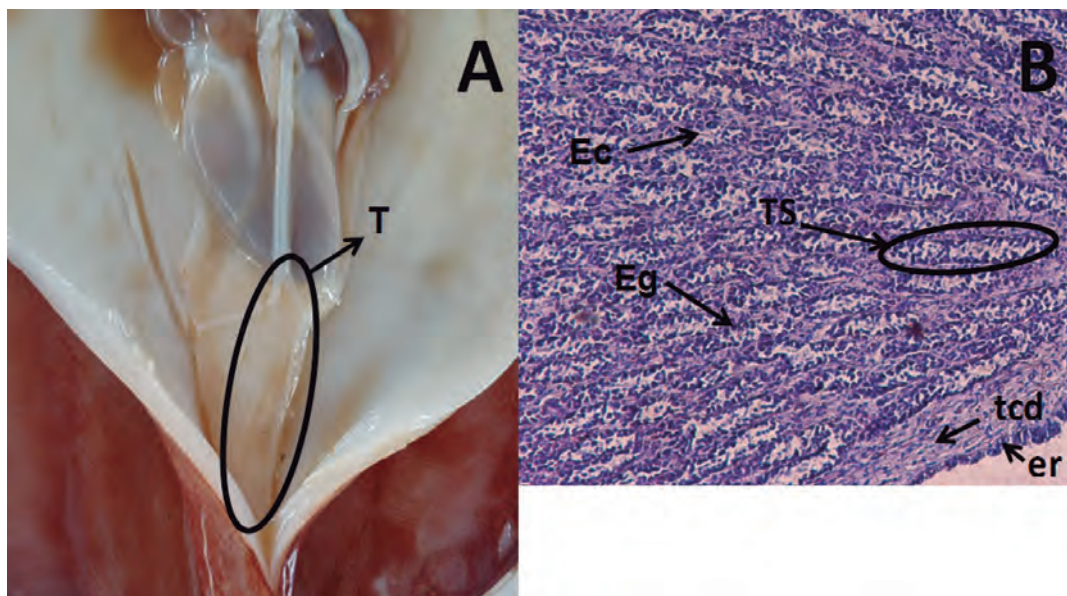


Figura 6.- A) Ejemplar macho de *Dosidicus gigas* en fase I de madurez gonadal. B) Corte histológico de testículo en fase I, se observa túbulos seminíferos (TS), espermatocito (Ec), espermatogonio (Eg), tejido conectivo denso (tcd) y epitelio de revestimiento (er) que cubre el testículo. 100X

Figure 6. A) Male specimen of *Dosidicus gigas* in phase I of gonadal maturity. B) Histological cut of the testicle in phase I, seminiferous tubules (TS), spermatocyte (Ec), spermatogony (Eg), dense connective tissue (tcd) and lining epithelium (er) covering the testicle are observed. 100X

En maduración (Fase II):

Macroscópicamente se caracteriza por ser de mayor volumen que en la fase anterior, blanquecino, opaco (Fig. 7A).

Microscópicamente presenta espermatogonios, espermatocitos y espermátides. Los túbulos son desarrollados y presentan una luz reducida (Fig. 7B).

Maturing (Stage or Phase II):

Macroscopically, it is characterized by a larger volume than in the previous phase, whitish, opaque (Fig. 7A).

Microscopically it presents spermatogonies, spermatocytes and spermatids. The tubules are developed and have reduced light (Fig. 7B).

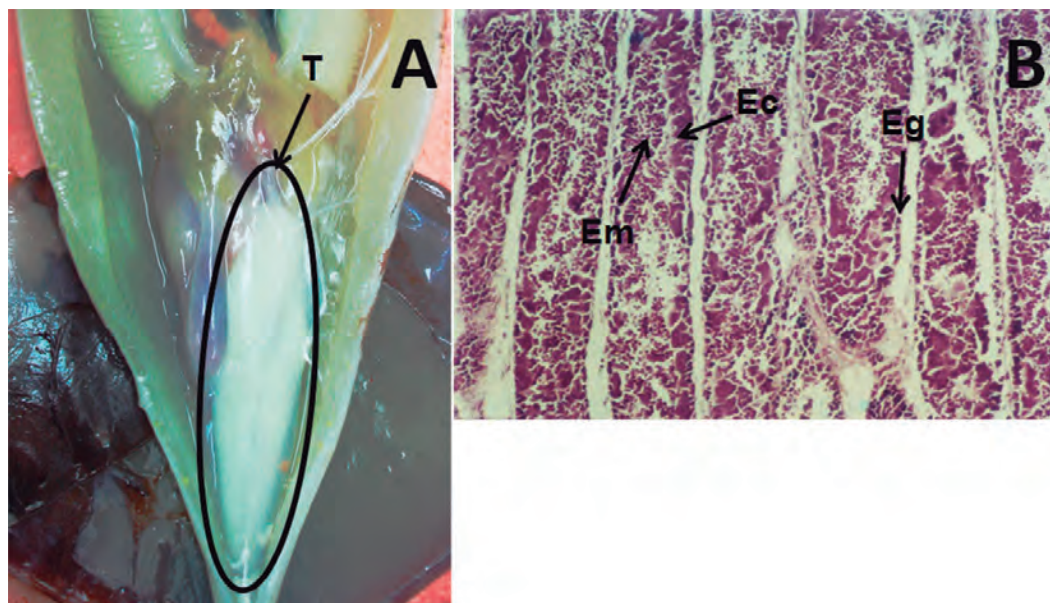


Figura 7.- A) Ejemplar macho de *Dosidicus gigas* en fase II de madurez gonadal, mostrando el testículo en maduración (T). B) Corte histológico de testículo en fase II, se observa espermatogonios (Eg), espermatocitos (Ec) y espermátides (Em). 100X

Figure 7. A) Male specimen of *Dosidicus gigas* in phase II of gonadal maturity, showing the mature testicle (T). B) Histological cut of the testicle in phase II, spermatogonies (Eg), spermatocytes (Ec) and spermatids (Em) are observed. 100X

Maduro (Estadio o Fase III):

Macroscópicamente se caracteriza por tener consistencia turgente, de color blanco y de aspecto lechoso. Los espermátóforos se encuentran tanto en el saco espermatófórico, como en la cavidad visceral (Fig. 8A).

Microscópicamente presenta espermatogonios, espermatocitos, espermátides y espermatozoides. Estos últimos son eosinófilos y están localizados en la luz de los túbulos, la cual es amplia (Fig. 8B).

Mature (Stage or Phase III):

Macroscopically it is characterized by its turgid consistency, white color and milky appearance. The spermatophores are found both in the spermatophoric sac and in the visceral cavity (Fig. 8A).

Microscopically, it presents spermatogonies, spermatocytes, spermatids and spermatozoa. The latter are eosinophils and are located in the tubular lumen, which is broad (Fig. 8B).

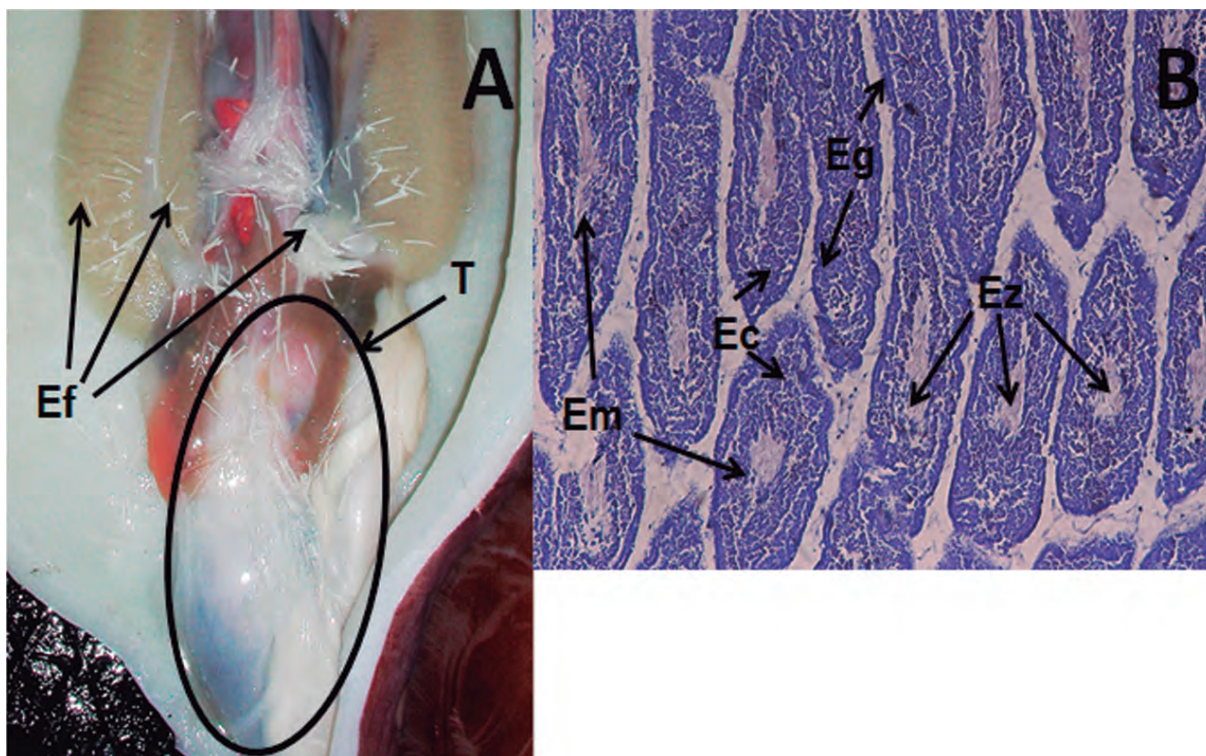


Figura 8.- A) Ejemplar macho de *Dosidicus gigas* en fase III de madurez gonadal, mostrando el testículo maduro (T) y espermátóforos (Ef). B) Corte histológico de testículo en fase III, con espermatogonios (Eg), espermatocitos (Ec), espermátides (Em) y espermatozoides (Ez), además, una amplia luz de los túbulos. 100X

Figure 8. A) Male specimen of *Dosidicus gigas* in phase III of gonadal maturity, showing the mature testicle (T) and spermatophores (Eph). B) Histological cut of testicle in phase III, with spermatogonies (Eg), spermatocytes (Ec), spermatids (Em) and spermatozoa (Ez), in addition to a wide tubular lumen. 100X

En las Tablas 3 y 4 (Anexo) se muestran la comparación entre las fases de madurez establecidas en el presente trabajo con las de otros trabajos y equivalencias entre ellas, tanto para hembras como para machos.

Durante la elaboración del presente trabajo se encontró alta frecuencia de la fase I, hallándose en algunos casos, individuos de gran tamaño con un ovario grande, pero que no presentaban madurez alguna.

Tables 3 and 4 (Annexed) show the comparison between the maturity phases established in the present work with those of other work and their equivalences for both females and males.

During the elaboration of this paper, a high frequency of phase I was found, in some cases, large individuals with a large ovary were found, but they did not present any maturity.

4. DISCUSIÓN

Existen varios estudios en los que se analiza el ciclo reproductivo a partir de los cambios morfocromáticos de las gónadas (NESIS 1970, MICHEL *et al.* 1986, TAFUR y RABÍ 1997, MARKAIDA y SOSA-NISHIZAKI 2001, TAFUR *et al.* 2001); estas escalas macroscópicas deberían contar con sustento histológico y criterios que simplifiquen la identificación de las fases de madurez (KJESBU *et al.* 2003, SÁNCHEZ *et al.* 2013). Sin embargo, en el caso de *D. gigas*, esos estudios han empleado escalas de madurez diferentes, por lo cual también se han hecho distintas interpretaciones del proceso de maduración en esta especie (DÍAZ-URIBE *et al.* 2006, GONZÁLEZ y CHONG 2005).

En el presente estudio, se observaron individuos con ovarios que presentaban ovocitos en diferente grado de desarrollo, los cuales son ovulados y luego son reclutados en el oviducto para el posterior desove continuo. Al respecto, HERNÁNDEZ-MUÑOZ *et al.* (2016) mencionan que la presencia de folículos post-ovulatorios, pero sobre todo de ovocitos en diferente grado de desarrollo, es un aspecto importante para caracterizar a *Dosidicus gigas* como una especie con desove múltiple o reproductor parcial. En ese sentido, ROCHA *et al.* (2001) propusieron que *D. gigas* es una especie que “desova más de una vez al año” en su ciclo de vida, con un desarrollo ovocitario asincrónico, no hay regeneración del ovario y la puesta de huevos se realiza en momentos separados durante la misma estación de desove. En ese sentido, VILLANUEVA (1993) reportó una nueva estrategia reproductiva en octópodos cirrados con un desarrollo ovocitario cíclico y continuo y varios desoves a lo largo de la vida. En este trabajo hemos encontrado que esta especie presenta ovarios parcialmente desovados que contienen folículos post-ovulatorios así como ovocitos en varias etapas de desarrollo, pero no se han observado ovocitos atrésicos, como lo reportado en otros cefalópodos (SIEIRO *et al.* 2016) por lo tanto, no existe en esta escala macroscópica la categoría de ovarios desovados, lo cual sugiere que, la estrategia reproductiva de *D. gigas* corresponde a una especie capaz de desovar más de una vez de forma continua, constituyéndose en un reproductor con desove monocíclico, cuyos ovocitos en su fase de mayor desarrollo son reclutados en el oviducto para el posterior desove, sin producirse la regeneración del ovario ni la producción de nuevas células sexuales, como ya ha sido mencionado por otros autores (MARKAIDA 2002, GONZÁLEZ y CHONG 2005, TAFUR *et al.* 2010, IBÁÑEZ *et al.* 2011, KEYL *et al.* 2011, LIU *et al.* 2013, HERNÁNDEZ-MUÑOZ *et al.* 2016).

En el caso de las hembras, las cuatro fases de madurez gonadal descritas, sobre la base de las características macroscópicas de los ovarios validados mediante análisis microscópico, tienen equivalencia o coinciden

4. DISCUSSION

There are several studies in which the reproductive cycle is analyzed based on the morphochromatic changes of the gonads (NESIS 1970, MICHEL *et al.* 1986, TAFUR & RABÍ 1997, MARKAIDA & SOSA-NISHIZAKI 2001, TAFUR *et al.* 2001); these macroscopic scales should have histological support and criteria that simplify the identification of the maturity phases (KJESBU *et al.* 2003, SÁNCHEZ *et al.* 2013). However, in the case of *D. gigas*, these studies have used different maturity scales, so different interpretations of the maturation process have also been made for this species (DÍAZ-URIBE *et al.* 2006, GONZÁLEZ & CHONG 2005).

In the present study, individuals were observed with ovaries that had oocytes at different stages of development, which are ovulated and then recruited into the oviduct for subsequent continuous spawning. In this regard, HERNÁNDEZ-MUÑOZ *et al.* (2016) mention that the presence of post-ovulatory follicles, but especially of oocytes in different stages of development, is an important aspect to characterize *Dosidicus gigas* as a species with multiple spawning or partial reproduction. In this sense, ROCHA *et al.* (2001) proposed that *D. gigas* is a species that “spawns more than once a year” in its life cycle, with an asynchronous oocyte development, there is no ovarian regeneration and egg laying is performed at separate times during the same spawning season. In this respect, VILLANUEVA (1993) reported a new reproductive strategy in cirrhopedic octopods with continuous cyclic oocyte development and several spawning cycles throughout life. In this paper we have found that this species has partially spawned ovaries that contain post-ovulatory follicles as well as oocytes at various stages of development, but no atresic oocytes have been observed, as reported in other cephalopods (SIEIRO *et al.* 2016), therefore, the category of spawned ovaries does not exist in this macroscopic scale, which suggests that the reproductive strategy of *D. gigas* corresponds to a species capable of spawning more than once on a continuous basis, constituting a breeder with monocyclic spawning, whose oocytes in their most developed phase are recruited in the oviduct for subsequent spawning, without the regeneration of the ovary or the production of new sex cells, as has already been mentioned by other authors (MARKAIDA 2001, GONZÁLEZ & CHONG 2006, TAFUR *et al.* 2010, IBÁÑEZ *et al.* 2011, KEYL *et al.* 2011, LIU *et al.* 2013, HERNÁNDEZ-MUÑOZ *et al.* 2016).

In the case of females, the four stages of gonadal maturity described, based on the macroscopic characteristics of the ovaries validated by microscopic analysis, are equivalent or coincide with those

con lo propuesto por otros autores (NESIS 1970, 1983; MICHEL *et al.* 1986). La alta frecuencia de individuos de gran tamaño en fase I, pertenecerían al grupo poblacional grande que ha sido reportado en trabajos anteriores (ARGÜELLES *et al.* 2001, TAFUR y RABÍ 1997, TAFUR *et al.* 2001, TAFUR *et al.* 2018).

Algunos ejemplares grandes que se encuentran en la fase I, pueden ser catalogados erróneamente en la fase II de madurez gonadal, los muestreadores podrían ser influenciados por el tamaño del individuo y no por las características propias del órgano reproductivo. Este error es crítico cuando se realizan estimaciones de primera madurez donde el vector de individuos inmaduros debe ser bien diferenciado del vector individuos reproductivamente activos (estadios II, III y IV). La construcción de la ojiva de madurez se basa, precisamente, en las proporciones que dan ambos vectores y el incremento de su pendiente está igualmente influenciado por las proporciones dadas por esas dos componentes. En la presente contribución, las diferencias entre ambas fases están claramente definidas por el aspecto granuloso y el color del ovario de la fase II respecto a la fase I.

Así mismo, las fases III y IV se diferencian básicamente por la presencia o ausencia de huevos en la glándula oviductal, que es el indicador de la fase de desove en las hembras, siendo que todos los huevos pueden ser evacuados en un único desove (STAAF *et al.* 2008). NESIS (1970) estableció cuatro fases características para las hembras de *D. gigas*, con ejemplares de la Corriente Costera Peruana (CCP), basándose para ello en las características externas de la gónada, principalmente el grado de desarrollo y engrosamiento de los oviductos y glándulas nidamentales, así como las características cromáticas de los óvulos y el aparato reproductor durante el proceso de maduración. Al respecto, MICHEL *et al.* (1986) tipificaron una escala macroscópica arbitraria de madurez gonádica de cuatro fases para las hembras, con base en las características morfológicas y cromáticas del aparato reproductor en sus diferentes fases de desarrollo, relacionadas con la descripción microscópica de cada fase, por medio de análisis histológico (Tabla 2) y MARKAIDA (2002) propuso cuatro fases para *Dosidicus gigas*, basándose en los tipos celulares observados durante el proceso de ovogénesis, tomando en cuenta la moda más avanzada en estos ácinos o folículos del ovario.

En los machos, se establecieron tres fases de madurez gonadal, basadas en las características macroscópicas de los testículos, validadas mediante cortes histológicos, donde se aprecia la presencia y distribución de las células sexuales masculinas, en diferentes fases de desarrollo, siendo la fase I muy fácil de diferenciar a simple vista por las características que presenta al momento de su catalogación. En

proposed by other authors (NESIS 1970, 1983; MICHEL *et al.* 1986). The high frequency of large phase I individuals, would belong to the large population group that has been reported in previous studies (ARGÜELLES *et al.* 2001, TAFUR & RABÍ 1997, TAFUR *et al.* 2001, TAFUR *et al.* 2018).

Some large specimens that are in phase I may be mistakenly catalogued in phase II of gonadal maturity. Samplers may be influenced by the size of the individual and not by the characteristics of the reproductive organ. This error is critical when making estimates of first maturity where the vector of immature individuals must be well differentiated from the vector of reproductively active individuals (stages II, III and IV). The construction of the maturity ogive is based precisely on the proportions given by both vectors and the increase in its slope is equally influenced by the proportions given by these two components. In this contribution, the differences between the two phases are clearly defined by the granular appearance and color of the ovary from phase II respect to phase I.

Also, phases III and IV are basically differentiated by the presence or absence of eggs in the oviductal gland, which is the indicator of the spawning phase in females, since all eggs can be evacuated in a single spawning period (STAAF *et al.* 2008). NESIS (1970) established four characteristic phases for females *D. gigas*, with specimens of the Peruvian Coastal Current (PCC), based on the external characteristics of the gonad, mainly the degree of development and thickening of the oviducts and nesting glands, as well as the chromatic characteristics of the eggs and the reproductive system during the maturation process. In this regard, MICHEL *et al.* (1986) typified an arbitrary macroscopic scale of gonadal maturity of four phases for females, based on the morphological and chromatic characteristics of the reproductive system in its different stages of development, related to the microscopic description of each phase, by means of histological analysis (Table 2) and MARKAIDA (2002), proposed four phases for *Dosidicus gigas*, based on the cell types observed during the oocyteogenesis process, taking into account the most advanced mode in these acini or ovarian follicles.

In males, three phases of gonadal maturity were established, based on the macroscopic characteristics of the testicles, validated by histological cuts, where the presence and distribution of male sexual cells can be appreciated, in different phases of development, being phase I very easy to differentiate with the naked eye by the characteristics that it presents at the time of

la diferenciación de las fases II y III, es importante visualizar la presencia o ausencia de espermatóforos tanto en el saco espermatofórico, como en la cavidad visceral, porque esta característica nos indicaría en cuál de estas dos fases se encuentra el individuo. Sin embargo, es importante mencionar que el proceso de espermatogénesis es continuo por lo que en la fase II ya están formados los espermatozoides. La presencia o no de espermatóforos en la cavidad visceral constituye una herramienta visual inconfundible que separa los individuos en maduración de los maduros propiamente, para fines prácticos pero no significa que sea una medida cuantitativa.

5. CONCLUSIONES

Para el calamar gigante o pota *Dosidicus gigas*, se determinó una escala macroscópica de madurez gonadal que consta de cuatro fases de desarrollo para hembras y tres fases para machos.

D. gigas tiene un desarrollo gonadal de tipo asincrónico, con una estrategia reproductiva de desovador múltiple con un patrón de desove monocíclico.

Consideramos que las escalas macroscópicas son útiles para describir la madurez sexual del calamar *D. gigas*, al existir alta correspondencia con las fases microscópicas.

cataloguing. In the differentiation of phases II and III, it is important to visualize the presence or absence of spermatophores both in the spermatophoric sac and in the visceral cavity, because this characteristic would indicate which of these two phases the individual is in. However, it is important to mention that the spermatogenesis process is continuous, so that in phase II the spermatozoa are already formed. The presence or absence of spermatophores in the visceral cavity is an unmistakable visual tool that separates maturing individuals from mature individuals for practical purposes, but it does not mean that it is a quantitative measure.

5. CONCLUSIONS

For the jumbo flying squid *Dosidicus gigas*, a macroscopic scale of gonadal maturity was determined, consisting of four development phases for females and three phases for males.

D. gigas has an asynchronous gonadal development, with a multiple spawning reproductive strategy with a monocyclic spawning pattern.

We consider that macroscopic scales are useful to describe the sexual maturity of this squid, as there is a high correspondence with the microscopic phases.

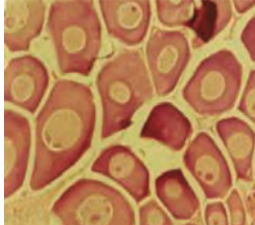
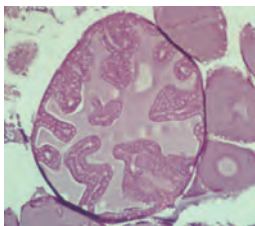
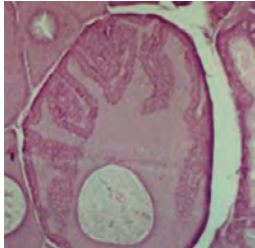
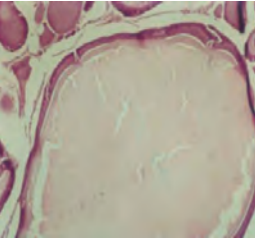
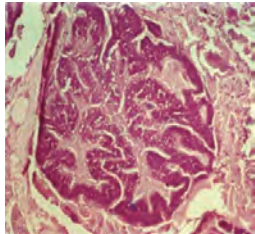
6. REFERENCIAS/REFERENCES

- ARGÜELLES J, RODHOUSE P G, VILLEGAS P, CASTILLO G. 2001. Age, growth and population structure of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* in Peruvian waters. *Fish. Res.* 54: 51-61.
- ARKHIPKIN A I. 1992. Reproductive system structure, development and function in cephalopods with a new general scale for maturity stages. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.* Vol. 12: 63-74.
- BUITRÓN B, PEREA A, MORI J, SÁNCHEZ J, ROQUE C, CASTILLO J, GALVEZ M. 2015. Madurez gonadal de peces de importancia comercial: Escalas macroscópicas validadas microscópicamente. *Bol Inst Mar Perú.* Vol. 30 (1, 2): 3-9.
- BURUKOVSKY R, ZUEV T, NIGMATULIN C, TZIMBAL M. 1977. Methodological principles of plotting scales of reproductive maturing systems in female squids, based on *Sthenoteuthis pteropus* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Zool. Zh.* 56(12): 1781-1791 [En ruso]. Traducción al inglés por Language Services Branch, NMFS, NOAA, U.S. Dep. Comm. 13 pp.
- CSIRKE J, ALEGRE A, ARGÜELLES J, GUEVARA-CARRASCO R, MARIÁTEGUI L, SEGURA M, TAFUR R, YAMASHIRO C. 2015. Main biological and fishery aspects of the jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the Peruvian Humboldt Current System. South Pacific Regional Fisheries Management Organization 3rd Meeting of the Scientific Committee. Port Vila, Vanuatu. 28 September – 3 October 2015. 1-33.
- DÍAZ-URIBE J G, HERNÁNDEZ-HERRERA A, MORALES-BOJÓRQUEZ E, MARTÍNEZ-AGUILAR S, SUAREZ-HIGUERA M C, HERNÁNDEZ-LÓPEZ A. 2006. Histological validation of the gonadal maturation stages of female jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California, Mexico. *Ciencias Marinas.* 32: 23-31.
- GONZÁLEZ P, CHONG J. 2005. Biología reproductiva del *Dosidicus gigas* d'Orbigny 1835 (Cephalopoda, Ommastrephidae) en la zona norte-centro de Chile. *Gayana.* 70(2): 237-244.
- HERNÁNDEZ-MUÑOZ A T, RODRÍGUEZ-JARAMILLO C, MEJÍA-REBOLLO A, SALINAS-ZAVALA C A. 2016. Reproductive strategy in jumbo squid *Dosidicus gigas* (D'Orbigny, 1835): A new perspective. *Fisheries Research.* 173: 145-150.
- HUMASON G. 1979. Animal tissue techniques. W. Freeman Eds. 4ta Ed. 661 pp.
- IBÁÑEZ C M, CUBILLOS L A. 2007. Seasonal variation in the length structure and reproductive condition of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) off central-south Chile. *Scientia Marina.* 71(1): 123-128.
- IBÁÑEZ C M, CUBILLOS L A, TAFUR R. 2011. Genetic diversity and demographic history of *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the Humboldt Current System. *Mar Ecol Prog Ser.* 431: 163-171.
- IBÁÑEZ C M, SEPÚLVEDA R D, ULLOA P, KEYL F, PARDO-GANDARILLAS M C. 2015. The biology and ecology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda) in Chilean

- waters: a review. *Latin American Journal of Aquatic Research* 43(3): 402-414. Doi: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-2.
- JUANICO M. 1983. Squid maturity scales for population analysis. In: *Advances in assessment of world cephalopod resources* (p. 341-378), J. F. Caddy (ed.), FAO Fish. Tech. Pap. 231: 452 p.
- KEYL F. 2009. The Cephalopod *Dosidicus gigas* of the Humboldt Current System under the impact of fishery and environmental variability. Tesis para obtener el grado académico de Doctor en Ciencias. Universitat Bremen. 214 pp.
- KEYL F, ARGÜELLES J, TAFUR R. 2011. Interannual variability in size structure, age, and growth of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) assessed by modal progression analysis. *ICES Journal of Marine Science*. 68(3): 507-518.
- KJESBU O, HUNTER R, WITHTHAMES P (Ed.). 2003. Plenary document. In: Report of de working group on modern approaches to assess maturity and fecundity of warm- and cold-water fish and squids. *Fisken og haver* 12. http://brage.bibsys.no/im/handle/URN:NBN:nobibsys_brage_3594. [acceso: 18/07/2013]
- LIU B, CHEN X, CHEN Y, TIAN S, LI J, FANG Z, YANG M. 2013. Age, maturation, and population structure of the Humboldt squid *Dosidicus gigas* off the Peruvian Exclusive Economic Zones. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 31(1): 81-91. <http://dx.doi.org/10.1007/s00343-013-2036-z>
- MARKAIDA U, SOSA-NISHIZAKI O. 2001. Reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, 1995-1997. *Fish. Res.* 54: 63-82.
- MARKAIDA U. 2002. Biología del calamar gigante *Dosidicus gigas* Orbigny, 1835 (Cephalopoda: Ommastrephidae) en el Golfo de California, México. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE). Tesis. 387 p.
- MICHEL E, KLETT A, OCHOA R. 1986. Estudio preliminar para la determinación de madurez gonádica del calamar gigante *Dosidicus gigas* (d'Orbigny 1835). *Instituto Nacional de Pesca, México. Ciencia Pesquera*. 5: 77-89.
- NESIS K N. 1970. The biology of the giant squid of Peru and Chile, *Dosidicus gigas*. *Oceanology*. 10: 140-152.
- NESIS K N. 1983. *Dosidicus gigas*. In: P.R. Boyle (ed.), *Cephalopod life cycles*. Academic Press, London. 215-231.
- NIGMATULLIN C M, NESIS K N, ARKHIPKIN A I. 2001. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fish. Res.* 54: 9-19.
- ROCHA F, GUERRA A, GONZÁLEZ A F. 2001. A review of reproductive strategies in Cephalopods. *Biol. Rev.* 76: 291-304.
- SÁNCHEZ J, PEREA A, BUITRÓN B, ROMERO L. 2013. Escala de madurez gonadal de jurel *Trachurus murphyi* Nichols 1920. *Rev. per. biol.* Lima. 20(1): 35-44.
- SAUER W H, LIPINSKI M R. 1990. Histological validation of morphological stages of sexual maturity in chokker squid *Loligo vulgaris reynaudii* D'Orb (Cephalopoda: Loliginidae). *South African of Journal Marine Science*. 9: 189-200.
- SIEIRO P, OTERO J, GUERRA A. 2016. Histomorphological study of ovarian atresia over the reproductive cycle of *Octopus vulgaris* from Galician waters (NW Spain). *Zoomorphology*. 135(4): 419-431.
- STAAR D J, CAMARILLO-COP S, HADDOCK S H D, NYACK A C, PAYNE J, SALINAS-ZAVALA C A, SIEBEL B A, TRUEBLOOD L, WIDMER C, GILLY W F. 2008. Natural egg mass deposition by the Humboldt squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California and characteristics of hatchlings and paralarvae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 88(4): 759-770.
- TAFUR R, RABÍ M. 1997. Reproduction of the jumbo flying squid, *Dosidicus gigas* (D'Orbigny 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) off Peruvian coasts. *Sci. Mar.* 61 (Supl. 2): 33-37.
- TAFUR R, VILLEGAS P, RABÍ M, YAMASHIRO C. 2001. Dynamics of maturation, seasonality of reproduction and spawning grounds of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in Peruvian waters. *Fish. Res.* 54: 33-50.
- TAFUR R, KEYL F, ARGÜELLES J. 2010. Reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* in relation to environmental variability of the northern Humboldt Current System. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 400: 127-141.
- TAFUR R, PEREA A, BUITRÓN B. 2018. Aspectos reproductivos del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Perú. *Bol Inst Mar Perú*. 33(2): 119-136.
- TAIPE A, YAMASHIRO C, MARIÁTEGUI L, ROJAS P, ROQUE C. 2001. Distribution and concentrations of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) off the Peruvian coast between 1991 and 1999. *Fish. Res.*, 54: 21-32.
- VILLANUEVA R. 1993. Continuous spawning in the cirrate octopods *Opisthoteuthis agassizzi* and *O. vossi*: features of sexual maturation defining a reproductive strategy in cephalopods. *Marine Biology*. 114: 265-275.
- YAMASHIRO C, MARÍN W, ARGÜELLES J. 2016. El recurso calamar gigante en la costa peruana y el Niño. *Bol. Trimestral Oceanográfico. Instituto del Mar del Perú*. 2(1): 17-20.
- YATSU A, TAFUR R, MARAVÍ C. 1999. Embryos and rhynchoteuthion paralarvae of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda) obtained through artificial fertilization from Peruvian waters. *Fisheries Science*. 65(6): 904-908.

Anexo:

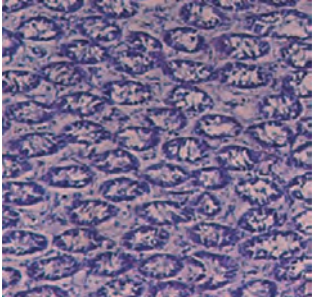
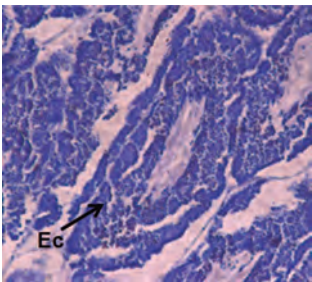
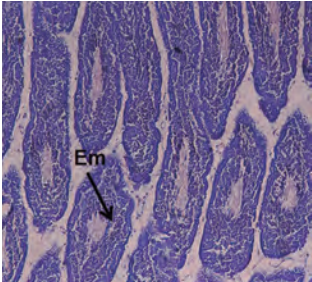
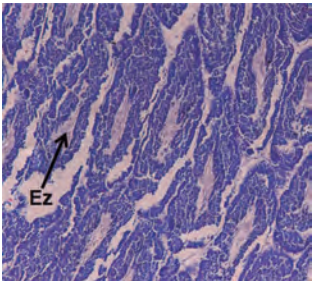
Tabla 1.- Tipos de ovocitos de calamar gigante *Dosidicus gigas* y sus principales características
 Table 1. Types of oocytes of the Jumbo flying squid *Dosidicus gigas* and their main characteristics

OVOCITOS OOCYTES	DESCRIPCIÓN DESCRIPTION	IMAGEN IMAGE
Ovocito inmaduro Immature oocyte (OI)	Células muy pequeñas y de forma poligonal, con núcleo esférico de posición central. Nucléolos dispersos en el citoplasma, con uno de gran tamaño. Citoplasma basófilo. Very small cells and polygonal shape, with spherical core of central position. Nucleolus dispersed in the cytoplasm, with a large one. Basophilic cytoplasm. Diámetro: 67,2 ± 13,6 µm Aumento: 100x	
Ovocito en maduración Maturing oocytes (OEM)	Células de forma esférica. Células foliculares adheridas al ovocito aumentan de tamaño y junto al epitelio folicular se proyectan al interior de la célula a manera de invaginaciones. Citoplasma basófilo. Spherical shape cells. Follicular cells attached to the oocyte increase in size and, together with the follicular epithelium, are projected into the cell as invaginations. Basophilic cytoplasm. Diámetro: 328,9 ± 55,2 µm Aumento: 400x	
Ovocito maduro Mature oocyte (OM)	Células de forma esférica. Núcleo esférico de posición periférica. Las células foliculares y el epitelio folicular que invadieron el citoplasma del ovocito, se retiran a la periferia conforme el ovocito continúa madurando. Citoplasma basófilo. Spherical shape cells. Spherical core of peripheral position. The follicular cells and the follicular epithelium that invaded the cytoplasm of the oocyte, are withdrawn to the periphery as the oocyte continues to mature. Basophilic cytoplasm. Diámetro: 600,0 ± 65,4 µm Aumento: 400x	
Ovocito maduro avanzado Advance mature oocyte (OMA)	Células de forma esférica. No se observan invaginaciones. Puede observarse un OMA no ovulado (rodeado del epitelio folicular y células foliculares) o un OMA ovulado (sin epitelio folicular ni células foliculares, que llaga al oviducto). Citoplasma eosinófilo. Spherical shape cells. No invaginations are seen. A non-ovulated OMA (surrounded by follicular epithelium and follicular cells) or an ovine OMA (without follicular epithelium or follicular cells, which reaches the oviduct) can be observed. Eosinophil cytoplasm. Diámetro: 759,2 ± 64,7 µm Aumento: 400x	
Folículo post-ovulatorio Post ovulatory follicle (FPO)	Es la capa folicular que delimitaba al ovocito maduro avanzado y que queda en el ovario luego de haberse producido la ovulación. El folículo post-ovulatorio tiene cambios en su morfología y tamaño conforme transcurre el tiempo. It is the follicular layer that delimited the advanced mature oocyte and remains in the ovary after ovulation has occurred. The post-ovulatory follicle has changes in its morphology and size as time passes. Aumento: 200x	

Anexo:

Tabla 2.- Descripción de principales tipos de células sexuales en machos de calamar gigante *Dosidicus gigas*

Table 2. Description of main types of sex cells in males Jumbo flying squid *Dosidicus gigas*

CÉLULAS CELLS	DESCRIPCIÓN DESCRIPTION	IMAGEN IMAGE
Espermatogonios Spermatogonia (Eg)	<p>Células pequeñas que se encuentran localizadas en las paredes de los túbulos seminíferos, están distribuidos de manera uniforme. Poseen el citoplasma basófilo y núcleo bastante desarrollado.</p> <p>Small cells that are located in the walls of the seminiferous tubules, are evenly distributed. They have the basophilic cytoplasm and well developed nucleus.</p> <p>Aumento: 400x</p>	
Espermatocitos Spermatocytes (Ec)	<p>Células de forma esférica que están localizadas cerca al lumen de los túbulos seminíferos, junto a las espermáticas. Son más pequeñas que las espermatogonias. Tienen citoplasma basófilo.</p> <p>Spherical cells that are located near the lumen of the seminiferous tubules, next to the spermatogenic ones. They are smaller than spermatogonia. They have basophilic cytoplasm.</p> <p>Aumento: 400x</p>	
Espermátides Spermatids (Et)	<p>Células de forma alargada que se encuentran localizadas cerca al lumen de los túbulos seminíferos, ubicándose junto a las espermatogonias.</p> <p>Cells of elongated form that are located near the lumen of the seminiferous tubules, being located next to the spermatogonies.</p> <p>Aumento: 100x</p>	
Espermatozoides Sperm (Ez)	<p>Son células de forma alargada, se encuentran distribuidos en el lumen de los túbulos seminíferos.</p> <p>They are cells of elongated form; they are distributed in the lumen of the seminiferous tubules.</p> <p>Aumento: 100x</p>	

Anexo:

Tabla 3.- Equivalencia entre las fases de madurez gonadal macroscópica de hembras utilizados en otros estudios de *Dosidicus gigas* y el presente trabajo (Modificado de MARKAIDA 2002)

Table 3. Equivalence between the phases of macroscopic gonadal maturity of females used in other *Dosidicus gigas* studies and the present work (Modified from MARKAIDA 2002)

Este estudio These study	LIPINSKI y UNDERHILL (1995)	NESIS (1970, 1983)	EHRHARDT <i>et al.</i> (1983, 1986)	MICHEL <i>et al.</i> (1986)
I Inmaduro Immature	I	I Inmadura Immature	I Inmadurez Immature	I Inmadura Immature
	II			
II En maduración Maturing	III	II Alargamiento de glándula nidamental Nidamental Gland Extension	II Transición Transition	II En madurez Maturing
III Maduro Mature		IV		III Varios huevos en oviductos Several eggs in Oviducts
	V	IV Oviductos llenos Oviducts filled		
IV Desove Spawning	VI		IV Desovando Spawning	IV Desove Spawning
			V Agotado Exhausted	

Anexo:

Tabla 4.- Equivalencia entre las fases de madurez gonadal macroscópica de machos propuestas por otros autores para *Dosidicus gigas* y el presente trabajo. EF: espermatoforos; SE: saco espermatorfórico (Modificado de MARKAIDA 2002)

Table 4. Equivalence between the phases of macroscopic gonadal maturity of males proposed by other authors for *Dosidicus gigas* and the present work. EF: spermatophores; SE: spermatofore sac (Modified from MARKAIDA 2002)

Este estudio These study	LIPINSKI y UNDERHILL (1995)	NESIS (1970, 1983)	EHRHARDT <i>et al.</i> (1983, 1986)	MICHEL <i>et al.</i> (1986)
I Inmaduro Immature	I	I Inmaduro Immature	I Inmadurez Immature	I Inmaduro Immature
	II			
II En maduración Maturing	III		II Transición Transition	II Madurando Maturing
III Maduro Mature	IV	II Varios EF en SE Many EF in SE	III Maduro Mature	III Maduro Mature
	V	III Maduro Mature		
	VI		IV Desovando Spawning	
			V Agotado Exhausted	