

GRUPO DE  
ACUICULTURA Y  
BIODIVERSIDAD

*EFFECTO DEL RÉGIMEN TÉRMICO EN  
LA CALIDAD DE LOS HUEVOS Y  
DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA  
ANGUILLA EUROPEA (ANGUILLA  
ANGUILLA)*

**ALUMNO:**

M<sup>a</sup> Carmen Vílchez Olivencia

Máster Interuniversitario en Acuicultura

**DIRECTORA:**

Luz M<sup>a</sup> Pérez Igualada

Profesora Titular

Grupo de Acuicultura y Biodiversidad

Instituto de Ciencia y Tecnología Animal

**Universidad Politécnica de Valencia**

## ❖ Índice

➤	<b>1.Introducción.....</b>	<b>1</b>
	• 1.1 Biología y ciclo vital de la especie .....	1
	• 1.2 Problemática de la especie: conservación y producción .....	4
	• 1.3 Maduración artificial de hembras de anguila europea .....	6
	• 1.4 La maduración final del huevo de peces .....	7
	• 1.5 Criterios de calidad de los huevos de peces.....	8
	• 1.6 Fases del desarrollo embrionario de peces .....	10
	• 1.7 Papel de la temperatura en la maduración sexual de peces:	
	• 1.7.1 Efectos en la vitelogénesis .....	12
	• 1.7.2 Efectos en la ovulación y puesta. ....	13
➤	<b>2. Objetivos.....</b>	<b>15</b>
➤	<b>3. Material y métodos .....</b>	<b>16</b>
	• 3.1 Peces del experimento .....	16
	• 3.2 Tratamientos hormonales	
	• 3.2.1 Hembras.....	16
	• 3.2.2 Machos.....	17
	• 3.3 Tratamientos térmicos .....	17
	• 3.4 Muestras y sacrificio de animales.....	18
	• 3.5 Inducción a la puesta .....	19
	• 3.6 Fecundación e incubación .....	21
	• 3.7 Flotabilidad de los huevos .....	22
	• 3.8 Diámetro de los oocitos pre-fecundación y post-fecundación .....	22
	• 3.8.1 Diámetro de los oocitos en fase de pre-ovulación .....	22
	• 3.8.2 Diámetro de los oocitos post-fecundación .....	23
	• 3.9 Análisis estadístico.....	24
➤	<b>4. Resultados .....</b>	<b>25</b>
	• 4.1 Porcentaje de respuesta a los tratamientos .....	25
	• 4.2 Tiempo de maduración y ovulación .....	26

• 4.3 Evolución del peso correspondiente a hembras que ovularon .....	28
• 4.3.1 Cambios de peso previos a la puesta .....	28
• 4.3.2 Incrementos de peso desde durante la maduración final .....	29
• 4.4 Evolución del peso de las hembras que no maduraron .....	30
• 4.5 Índices biométricos de las hembras en post-ovulación .....	31
• 4.6 Tiempo de respuesta a la inyección DHP.....	31
• 4.7 Calidad de las puestas: flotabilidad, tasa de fecundación, y porcentaje de huevos con divisiones regulares .....	32
• 4.8 Tamaño de los oocitos: diámetros	
• 4.8.1 Incremento de los diámetros previos a la ovulación .....	33
• 4.8.2 Diámetro de los huevos embrionados a las 4h post-fecundación .....	34
• 4.9 Desarrollo embrionario .....	35
• 4.10 Larvas obtenidas .....	40
➤ <b>5. Discusión</b> .....	42
➤ <b>6. Conclusiones</b> .....	49
➤ <b>7. Bibliografía</b> .....	50
➤ <b>8. Anexos</b> .....	61



## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Biología y ciclo vital de la especie

Las anguilas son peces teleósteos del orden Anguilliformes, de la familia Anguillidae, que cuenta únicamente con el género *Anguilla*. Las 19 especies que forman el género *Anguilla* se encuentran distribuidas en los océanos Atlántico, Pacífico e Índico, así como en sus costas y ambientes dulceacuícolas. En el caso de la anguila europea (*Anguilla anguilla*), su área de distribución abarca todo el mediterráneo y el Atlántico oriental desde Marruecos hasta Noruega (Van Ginneken y Maes, 2005). Las anguilas pasan la mayor parte de su vida en ambientes dulceacuícolas variados, desde tramos medios y bajos de ríos, a lagunas litorales salobres, e incluso algunas poblaciones pueden vivir toda su vida en ambientes marinos costeros, como se ha descubierto recientemente en el Mar Menor. Después de vivir entre 9 y 20 años en agua dulce las hembras, y entre 6 y 12 años los machos (Pérez *et al.*, 2004), entran en un período de metamorfosis denominado “plateamiento” o “silvering”, que es una fase de preparación para su migración hacia el mar. La cabeza se vuelve puntiaguda; los ojos se agrandan, las aletas crecen y alargan y el color varía tomando tonos metalizados brillantes en la zona ventral, por lo que se las llama entonces anguilas plateadas o “silver eels”, en inglés (Fig. 1.D). Es entonces cuando la anguila europea realiza una migración través del Océano Atlántico, y se cree que tarda aproximadamente 6-7 meses en llegar a su área de desove, en el Mar de los Sargazos (Van Ginneken y Maes, 2005). Cuando inician su migración son completamente inmaduras, con un índice gonadosomático inferior al 2% en el caso de las hembras, y < 0.2% en machos (Asturiano *et al.* 2002, Durif *et al.* 2005). El desarrollo de sus gónadas se debe producir, por tanto, durante su viaje o cuando se encuentran cerca del área de puesta.

La ruta migratoria, así como la profundidad a la que migra la anguila europea se conocen sólo de un modo muy parcial. En 1988 se capturó en el mar una hembra de anguila con la gónada parcialmente desarrollada (IGS=10%), a una profundidad de 500 m, cerca de las Islas Azores (Bast y Kinkhardt, 1988). Recientemente se ha descubierto la ruta migratoria de la anguila europea en sus primeros 1300 Km de migración oceánica (Aarestrup *et al.*, 2009), por medio del uso de transmisores que almacenan datos de temperatura y presión, y al liberarse tras un tiempo y alcanzar la superficie, transmiten los datos almacenados vía satélite (pop-up satellite archival transmitters). Con esta tecnología se ha demostrado que, en su migración hacia el Mar de los Sargazos, las anguilas realizan además migraciones verticales diarias a profundidades entre 200-1000 m. Durante la noche las anguilas nadan en aguas menos

## INTRODUCCIÓN

profundas y más cálidas (media de 282 m, y 11.7 °C), mientras que al amanecer descienden a zonas más profundas y frías (media 564 m, y 7-10 °C) (Aarestrup *et al.* 2009). Estos datos concuerdan con las migraciones verticales marinas de estos peces observadas en el oeste de España y el Mediterráneo (Tesch, 1978, 1989), donde se vio que las anguilas nadaban por el día en aguas profundas, a unos 13 °C y durante la noche migraban a la zona superficial, donde encontraban aguas más cálidas.

Otras especies de anguilas, como la anguila australiana (*Anguilla dieffenbachii*) y la anguila japonesa (*A. japonica*) también realizan migraciones verticales durante sus migraciones hasta las áreas correspondientes de puesta. La anguila japonesa desciende durante el día a 600-900 m (Tª de 6-7 °C), y asciende de noche a aguas más cálidas a 200-300 m (Jellyman y Tsukamoto, 2010), mientras que la anguila japonesa se encuentra durante la noche entre 500-800 m, y durante el día entre 100 y 500 m (Manabe *et al.* 2011). Puesto que durante las migraciones las anguilas no se alimentan, las migraciones verticales podrían servir para evitar a los depredadores, y según algunos autores, para autorregular su velocidad de maduración sexual por la exposición a aguas frías (Jellyman y Tsukamoto, 2010).

El área exacta de puesta de la anguila europea, así como la profundidad en que se produce el desove en el mar de los Sargazos sigue siendo desconocida actualmente, ya que a pesar de los esfuerzos realizados para capturar anguilas adultas en el área estimada de freza, nunca se ha logrado capturar un solo ejemplar. Por ello, aun hoy se desconocen las condiciones exactas de salinidad y de temperatura, iluminación o presión en las que se produce la freza de esta especie.

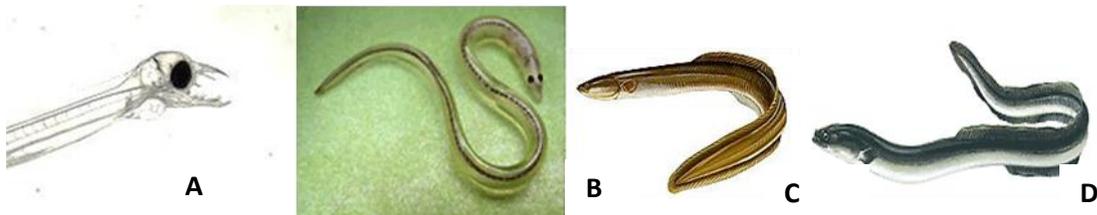
Para tratar de averiguar la profundidad de freza se han liberado anguilas maduras artificialmente con hormonas en el área probable de desove, en el Mar de los Sargazos. En un caso las anguilas se sumergieron hasta una profundidad de 700 m (Tesch, 1989), mientras que en otra prueba descendieron mucho menos, hasta 250-270 m (Fricke y Kaese, 1995). A estas profundidades, en estas áreas, la temperatura del mar está en torno a 18-20°C.

Se ha estimado, a partir de experimentos de laboratorio, que cada hembra puede llegar a poner 9-10 millones de huevos, de entre 0.9-1.3 mm de diámetro. Los huevos, pelágicos, son fecundados externamente. Después del desove, los progenitores, que no se alimentan durante la migración, posiblemente mueren. De los huevos nacen unas larvas aplanadas, los leptocéfalos (Fig. 1.A.), que se nutren durante unos días a partir de las reservas acumuladas en el saco vitelino, y posteriormente se alimentan de diversos tipos de plancton gelatinoso, principalmente hidrozooos, ctenóforos y taliáceos (Riemann *et al.*, 2010). Los

leptocéfalos nadan activamente ayudados por la corriente del Golfo de Méjico a través del Atlántico, y tardan en alcanzar las costas de Europa y África unos 220-290 días (Lecomte-Finiger, 1994; Arai *et al.* 2000), en contra de las estimaciones previas, que suponían una duración de esta migración de 2 a 3 años (Schmitz, 1922).

Cuando se aproximan a la plataforma continental los leptocéfalos miden entre 7 y 7.5 cm. Cerca de la plataforma continental sufren una metamorfosis en la que disminuye su longitud, los órganos varían de lugar y de forma, pierden los dientes originales, y el cuerpo, antes aplanado, adopta una forma redondeada. El nuevo ejemplar es de menor longitud que la larva de la que procede, mide de 6 a 7 cm de longitud, carece de dientes y es aún algo transparente, es la conocida angula sin pigmentar (*glass eel*) (Fig. 1.B), que adquiere la pigmentación en unos pocos días.

Las angulas entran en los ríos o canales por la noche, en grandes grupos, coincidiendo en general con las fases de luna nueva, en que son menos detectables por los predadores. Pronto les salen nuevos dientes, devoran pequeños animales, y su piel adquiere la pigmentación característica de las angulas. Cuando alcanzan tamaños mayores empiezan a denominarse anguilas, anguilas amarillas, o anguilas pasturencas (Valencia), ya que la pigmentación durante toda su vida en las aguas dulces es amarillenta en el vientre, y parda o verdosa en la zona dorsal (Fig. 1.C).

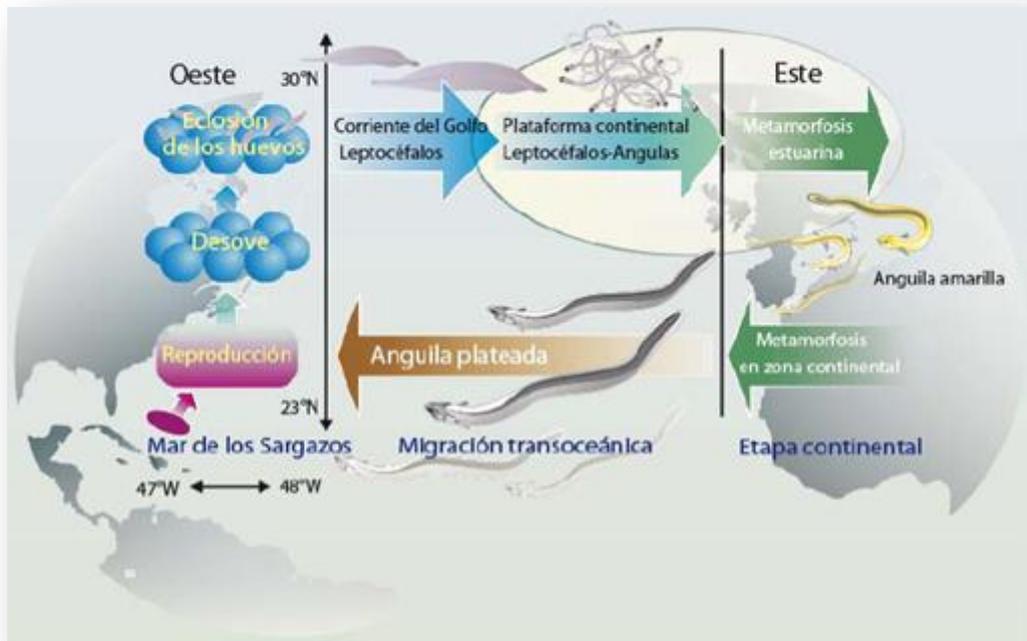


**Fig. 1.** Metamorfosis de la anguila europea de izquierda a derecha: A) leptocéfalo, B) angula sin pigmentar, C) anguila amarilla, D) anguila plateada.

Desde las entradas de los ríos las anguilas pasan a los afluentes, instalándose en cursos de agua dulce. Viven tanto en ambientes lóticos como ríos, canales y acequias, como en ambientes lénticos como lagos, estanques y pozos. Es una especie que tolera grandes variaciones ambientales, pudiendo vivir en aguas dulces, salobres o saladas, y a temperaturas entre 12 y 28°C (Perez *et al.* 2004). Se encuentran tanto en aguas claras como en las turbias, aunque son lucífugas. Su necesidad de oxígeno es inferior a la de otras especies, tolerando

## INTRODUCCIÓN

concentraciones de 3-4 mg/l. Presentan cierto grado de respiración cutánea, que les permite salir del agua y desplazarse sobre el terreno en tiempo húmedo o lluvioso.



**Fig. 2.** Esquema del ciclo biológico de la anguila europea.

### 1.2. Problemática de la especie: conservación y producción

La anguila era una especie abundante hasta la década de los años 1970. Desde entonces, los stocks se redujeron de forma muy rápida, de modo que el ICES (Consejo Internacional de Exploración del Mar) indicó en 1998 que el stock europeo de anguilas se encontraba fuera de los límites biológicos de seguridad, ya que se había reducido al 1 % del stock existente en los años 1950. En Septiembre de 2007 la Unión Europea (EC 1100/2007) estableció las medidas para la recuperación de los stocks, obligando a los países miembros a establecer Planes de Gestión de la Anguila que aseguren un escape del 40 % de las anguilas plateadas al mar. Esto implica en la práctica la reducción o el cierre de muchas pesquerías europeas. Además, la anguila europea se incluyó en marzo de 2009 en el Anexo II de CITES (Convención para el Comercio Internacional de Especies Amenazadas), por lo que el comercio de anguilas desde la Unión Europea a terceros países necesita de un certificado de una autoridad científica competente de que la exportación no perjudicará a la especie.

Las causas atribuidas al declive de las poblaciones europeas son variadas:

1. Sobrepesca
2. Barreras en la migración ascendente
3. Centrales hidroeléctricas
4. Pérdida de hábitat
5. Pérdida de calidad de los individuos reproductores

1. La **sobrepesca** de angulas y adultos. Las angulas sólo se consumen como alimento en España, pero en países como Francia o Gran Bretaña se capturan para su venta a piscifactorías de todo el mundo. La acuicultura depende del suministro de angulas, ya que no es posible reproducir la especie en cautividad.

2. **Barreras físicas:** las obstrucciones a la migración por el río como la construcción de presas u otras infraestructuras, se presentan como una grave amenaza que ha extinguido la mayor parte de las poblaciones continentales de la península Ibérica. Dado que la anguila durante su ciclo de vida ha de ascender por el río y posteriormente volverá al mar, la obstrucción a la migración conllevará que las anguilas jóvenes no pueden ascender en el río (Elvira, 1991; Lobón-Cerviá, 1991). Se ha comprobado la efectividad para las anguilas de pasos construidos en presas que les permiten remontar los ríos, como se ha hecho en la presa de Touvedo en el río Lima (Portugal) (Santos *et al.*, 2002).

3. La existencia de **centrales hidroeléctricas:** las turbinas movidas por el agua causan lesiones o la muerte de diversas especies de peces que chocan con estos elementos.

4. **Pérdida y degradación de hábitats:** la pérdida de humedales y de estuarios afecta directamente a las poblaciones de anguila europea. Otra forma de degradación del hábitat es la contaminación, como la debida a pesticidas agrícolas, efluentes industriales y urbanos.

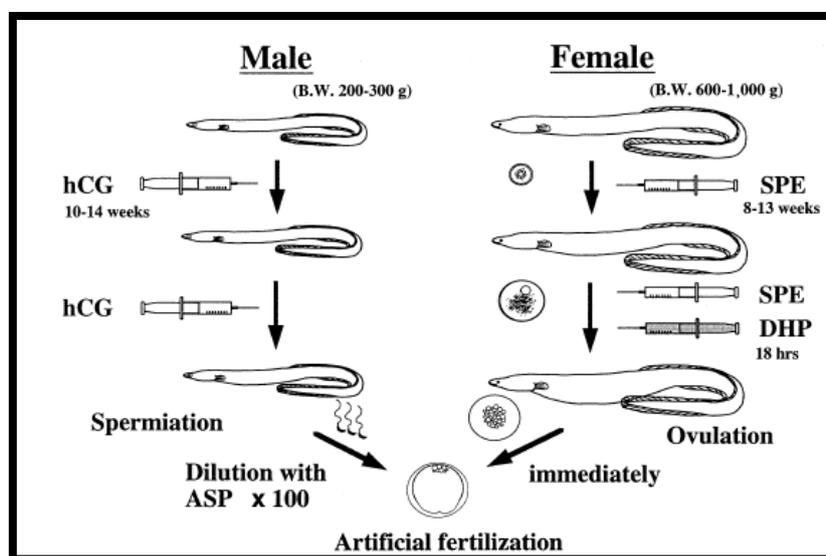
5. **Pérdida de calidad de los reproductores.** La anguila es un eficiente bioacumulador por su alto contenido lipídico, su ciclo de vida largo, y su vida bentónica (Mariottini *et al.*, 2006). Se han detectado restos de mercurio, metales pesados y residuos organoclorados en anguilas procedentes de diversos puntos de la geografía española, con niveles de contaminantes más altos que en otras especies de peces, como barbos o truchas (Bordajandi *et al.*, 2003). En cuanto a los estudios referentes a parásitos en anguilas de la Albufera de Valencia, se han encontrado entre otros el protozoo *Edwardsiella tarda* (Edwing *et al.*, 1965) causante de enfermedades enfisematosas, y el nemátodo *Anguillicola crassus* (Höglund *et al.* 1989), que afecta a la vejiga natatoria y por tanto a la eficiencia en la natación. La acumulación de

## INTRODUCCIÓN

contaminantes en los tejidos puede afectar a la calidad de las puestas, mientras que los parásitos de la vejiga natatoria pueden afectar a la migración reproductiva.

### 1.3. Maduración artificial de hembras de anguila

La maduración de anguilas se realiza actualmente con tratamientos hormonales, puesto que estos peces no maduran sexualmente en cautividad. Los tratamientos que se emplean actualmente están basados en el método desarrollado por Ohta *et al.*, (1996, 1997) en anguila japonesa, mediante el cual se ha podido inducir una maduración sexual artificial tanto en machos como en hembras de anguila europea (Fig. 3).



**Fig. 3.** Esquema del protocolo de inducción hormonal para la maduración de machos y hembras de anguila japonesa. (Ohta *et al.*, 1997).

El método de maduración sexual de la anguila japonesa consiste en suministrar a las hembras inyecciones semanales de extracto de hipófisis de carpa (CPE) o salmón (SPE), durante 8-13 semanas, y una vez que las hembras alcanzan el estado de maduración final, se induce la puesta por medio de una última inyección de SPE y una inyección de  $17\alpha$ -hidroxi- $20\beta$ -dihidroprogesterona (DHP) unas horas o días más tarde. El DHP es un esteroide inductor de la maduración (MIS), que induce la ovulación entre 10-12 horas tras la inyección.

Cabe destacar que actualmente es posible obtener angulas de anguila japonesa con regularidad (Tanaka *et al.*, 2003), y en abril de 2010, se informó a la prensa de que se había logrado producir la segunda generación de anguilas japonesas cultivadas, por científicos de la

Agencia de Investigación Pesquera de Yokohama, Japón (mispeces.com Abril 2010; The Japan Times, 10 Abril 2010). Sin embargo, aún no existe una producción comercial de angulas japonesas que permita el abastecimiento a las piscifactorías.

En cuanto a la anguila europea, los experimentos de inducción hormonal de la maduración comenzaron en la década de los años 1960. Desde entonces cabe destacar algunos estudios como el de Boëtius y Boëtius (1980) que, aplicando tratamientos combinados de hCG y extracto de hipófisis de carpa (CPE), lograron inducir índices gonadosomáticos (IGS) máximos de 60.7%, aunque tras extraer los oocitos mediante masaje abdominal sus ensayos de fertilización fracasaron.

Diversos grupos de investigación han realizado ensayos de fecundación e incubación con hembras de anguila europea (Pérez *et al.* 2000, 2005; Palstra *et al.*, 2005), pero la calidad de las puestas es muy variable. Un grupo de investigación del Instituto Danés para la Investigación Pesquera de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU-Aqua) ha logrado recientemente obtener larvas de anguila que sobreviven durante 25 días, aunque aún no se ha publicado el método empleado para ello.

#### **1.4. La maduración final del huevo en peces**

A diferencia de lo que ocurre en los oocitos de otros vertebrados, el principal aumento del volumen del huevo de teleósteos (67-75 %) se produce poco antes de la ovulación, durante el proceso denominado “maduración final”, que es inducido por la hormona luteinizante (LH) a través de la síntesis de los esteroides inductores de la maduración (MIS) por las células foliculares que rodean al oocito. Durante la maduración se producen varios procesos, de forma rápida (en horas-días):

- Reinicio de la meiosis en el núcleo (detenida en profase I), que culmina con la expulsión del primer corpúsculo polar. Comienza la 2ª división meiótica, que se detiene en la metafase antes de la ovulación.

- Al mismo tiempo, se produce una migración del núcleo hacia la periferia, y finalmente se produce la ruptura de la membrana nuclear.

- Fusión del vitelo y adquisición de transparencia: los gránulos de vitelo se fusionan y el vitelo adquiere un color transparente.

- Hidratación del huevo

## INTRODUCCIÓN

La hidratación del huevo durante la maduración meiótica se produce en un periodo de tiempo relativamente corto (por ejemplo, 6-10 h, a 20-25 °C). Es un proceso más intenso en las especies marinas con huevos pelágicos, donde el contenido de agua puede llegar a alcanzar el 90-95% del huevo, y puede suponer un aumento de tamaño de los oocitos de varios órdenes de magnitud (Wallace y Selman, 1981; Selman y Wallace, 1993). La captación de agua en los oocitos de peces marinos se produce gracias al gradiente osmótico generado por la ruptura parcial de las proteínas del vitelo, que generan aminoácidos libres. El agua entra entonces a favor de gradiente, a través de aquaporinas (Cerdá *et al.* 2007).

La observación del estado de maduración final de los oocitos es importante en acuicultura, ya que, en los casos en los que la ovulación es inducida artificialmente por medio de hormonas, el momento en que se aplica la inyección de los inductores de la puesta (análogos de LHRH, MIS, hCG) es muy importante para obtener puestas de calidad. Generalmente se considera adecuado inducir la puesta cuando en los oocitos es posible observar el estado de migración del núcleo, y el oocito presenta un color transparente y un tamaño mayor que en los días previos.

### 1.5. Criterios de calidad de los huevos en peces

La calidad de los huevos se define como la capacidad del huevo para ser fertilizado y de desarrollarse como un embrión normal. La calidad de los huevos y las larvas son limitantes en la producción de peces, y por tanto en el desarrollo de la industria de la acuicultura (Bobe *et al.* 2009).

En la obtención de huevos de calidad están implicados varios procesos, como la incorporación, síntesis y procesamiento de los componentes del huevo. Una fase especialmente importante en la formación del huevo es la vitelogénesis, durante la cual se produce la incorporación masiva del vitelo en el oocito, que más adelante se utilizará por el embrión para su desarrollo. La evaluación de los huevos y la progenie es esencial para el desarrollo de protocolos de inducción a la puesta. La calidad de los huevos puede ser evaluada mediante diversos parámetros (Lahnsteiner *et al.* 2004, Bobe *et al.* 2009):

- A) *Parámetros de viabilidad*: flotabilidad de los huevos, tasa de fecundación, porcentaje de supervivencia pre-eclosión y porcentaje de eclosión, supervivencia pos-eclosión.
- B) *Parámetros morfológicos del huevo*: diámetro, presencia de divisiones regulares, transparencia.

- C) *Frecuencia de etapas embrionarias*: porcentaje de huevos fecundados que se desarrollan hasta los estados de mórula, gástrula o estados más avanzados.
- D) *Parámetros bioquímicos de los oocitos*: pH, contenido en aminoácidos, hormonas, monosacáridos, etc.

La flotabilidad de los huevos se emplea como parámetro de calidad en las puestas de huevos pelágicos, ya que los huevos sobremaduros, o bien degenerados, pierden su flotabilidad en agua de mar y caen al fondo, adquiriendo un aspecto opaco en lugar de transparente.

La tasa de fecundación se mide como el porcentaje de huevos que presentan al menos 8 divisiones celulares, ya que la activación del huevo producida únicamente por inmersión en agua de mar (o agua dulce, en las especies dulceacuícolas) puede causar algunas divisiones celulares. En algunas especies como el bacalao (*Gadus morhua*) o la anguila, la observación de los oocitos fecundados es bastante fácil debido a su transparencia. Sin embargo, otras especies como la trucha arcoíris, la diferenciación entre oocitos fecundados y no fecundados resulta más difícil debido a la opacidad del huevo. No siempre una mayor tasa de fecundación se relaciona con un mayor desarrollo embrionario, como se ha visto en algunas especies marinas (Escudos *et al.*, 1997). Por ello, es más fiable emplear como criterio de calidad el porcentaje de huevos con divisiones celulares regulares, más relacionado con el posterior éxito en el desarrollo embrionario.

El tamaño y la apariencia de los huevos no fertilizados pueden ser utilizados también como criterios para evaluar el potencial de desarrollo global de los huevos tras la fertilización. Por ejemplo, un mayor tamaño del huevo se considera que es beneficioso para el posterior desarrollo del embrión. Sin embargo, muy pocos datos pueden apoyar esta hipótesis. En la trucha arco iris, por ejemplo, se ha demostrado que, en condiciones normales de temperatura, y con buenas prácticas de manejo, huevos pequeños producen tasas similares de fertilización que los de mayor tamaño (Bromage *et al.* 1992). Además del tamaño, otros parámetros morfológicos, como por ejemplo, la distribución de los lípidos en los huevos no fertilizados se emplean como indicador de la posterior supervivencia de los embriones (Mansour *et al.* 2007).

Varios estudios han demostrado que valores de pH bajos en el fluido ovárico se asocian con una reducción de la calidad del huevo. Por ejemplo, en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), el descenso de la calidad de los huevos durante el envejecimiento post- ovulatorio se asocia con una caída de pH del fluido de ovario (Fauvel *et al.* 1993). Por último, otros

## INTRODUCCIÓN

parámetros bioquímicos (enzimas, metabolitos) también pueden emplearse como criterios de calidad (Lahnsteiner y Patarnello 2004).

### **1.6. Fases del desarrollo embrionario de peces**

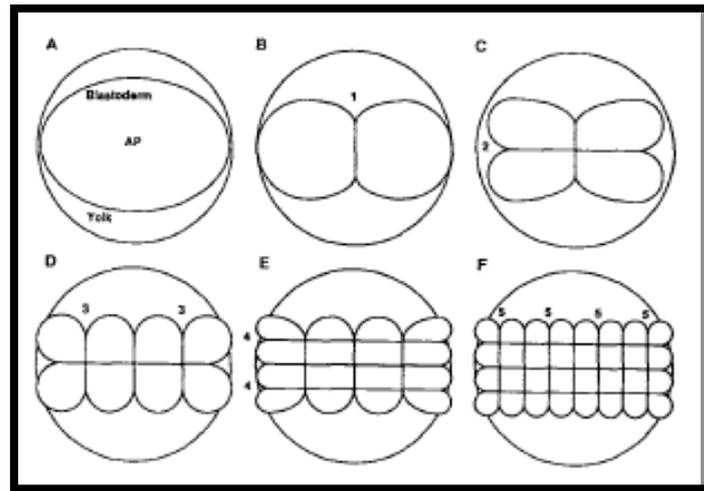
A continuación se describen brevemente las principales fases del desarrollo embrionario de peces, que son: cigoto, fase de primeras divisiones, blástula, gástrula, segmentación y organogénesis, y eclosión, y que van apareciendo a lo largo del tiempo en función de la temperatura del agua.

#### Cigoto

Comprende el tiempo desde la fertilización del huevo hasta la observación de las primeras divisiones del embrión. Se producen muchos cambios durante esta fase, pero lo más evidente es el desarrollo del espacio perivitelino, entre la membrana del huevo y el corion, que llega a suponer un tercio del diámetro del huevo (de aproximadamente 1 mm). El espacio perivitelino se forma por la reacción cortical que se produce tras la fecundación, y en la que se libera el contenido de los alveolos corticales al espacio comprendido entre la membrana del huevo y el corion del mismo. El contenido de los alveolos (mucopolisacáridos, proteínas, lectinas) produce el endurecimiento del corion, que protegerá al embrión frente al medio externo. Asimismo, en esta fase se produce la diferenciación bipolar, en la que el citoplasma fluye hacia el polo animal (donde se produjo la fecundación), y forma el blastodisco o disco embrionario, que experimentará posteriormente las divisiones celulares.

#### Fase de primeras divisiones

En esta fase se produce una serie de divisiones rápidas (Fig. 4) que implican el aumento del número de blastómeros y una disminución de su tamaño. Las primeras divisiones se producen en un plano vertical, hasta generar entre 16 y 32 blastómeros. La sexta división se produce en un plano horizontal, y se generan 64 células que se distribuyen en dos capas superpuestas en el blastodisco. Durante esta fase las células (blastómeros) son grandes, y fáciles de observar al microscopio.



**Fig.4.** Esquema de la disposición de los blastómeros tras las 5 primeras divisiones (Tomado de Kimmel *et al.*, 1995)

### Blástula

La fase de blástula comprende los estados embrionarios desde 128 células hasta el momento en que comienza la epibolia (movimientos de los tejidos embrionarios). Lo más característico de esta fase es el aspecto esférico del blastodisco. Durante esta etapa se produce la transición de blástula media (*mid-blastula transition*, MBT), en la que se activa la transcripción de genes del embrión. También se generan 3 capas embrionarias: la capa sincitial vitelina, la capa de la envoltura, que dará lugar al peridermo, y la capa de células profundas, que originará los tejidos del embrión. Durante la epibolia, los tejidos embrionarios van recubriendo progresivamente el vitelo. Se considera un estado como blástula hasta que la epibolia ha alcanzado el 30 % (Kimmel *et al.* 1995), es decir, cuando el blastodermo recubre una cuarta parte del vitelo del huevo.

### Gástrula

La fase de gástrula comprende desde que el embrión se encuentra en un estado de 50% de epibolia hasta el final de la epibolia. Al mismo tiempo que la epibolia continua, se producen movimientos celulares morfogénicos de involución, convergencia y extensión, que originan las capas germinales primarias y el eje embrionario. El comienzo de los movimientos de involución define el inicio de la gastrulación. Aparece entonces una región engrosada en el margen del embrión, denominada anillo germinal, producido por la involución de las células del epiblasto.

## INTRODUCCIÓN

### Segmentación y organogénesis

Durante esta etapa se forma el tubo neural, y conforme avanza el desarrollo cefálico se pueden identificar las distintas zonas cerebrales y la estructura ocular debajo de la cual se puede distinguir el corazón. La longitud del embrión aumenta, y se producen los primeros movimientos corporales.

### Eclosión

El tiempo de desarrollo embrionario hasta la eclosión varía entre las diferentes especies, y también está en función de la temperatura del agua. En la anguila japonesa se ha comprobado que el tiempo de eclosión varía en función de la temperatura de incubación; esta se produce al cabo de 23-28 horas post-fecundación (h.p.f.), cuando los huevos se incuban a 28°C, y entre 48-54 h.p.f., cuando se incuban a 19°C (Ahn *et al.*, 2012). La eclosión se produce tras una serie de movimientos rápidos del embrión que primero rasgan el corion hasta llegar a desprenderse de él.

## **1.7. Papel de la temperatura en la reproducción de peces**

### **1.7.1. Efecto en la vitelogénesis**

Actualmente se sabe que la temperatura del agua afecta, no solo a las fases de maduración final y puesta de los peces, sino también a la fase de vitelogénesis de las hembras. En la lubina americana (*Morone saxatilis*; Clark *et al.*, 2005) y lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, García-López *et al.*, 2006), se ha visto que en hembras expuestas a temperaturas elevadas y constantes se origina una reducción de la producción de esteroides sexuales y un desarrollo anormal de la vitelogénesis. También, estudios previos con *S.salar* expuestos a diferentes regímenes térmicos (14, 18 y 20°C) durante la vitelogénesis han demostrado un descenso en los niveles de vitelogenina en plasma a 22 °C respecto a 14 °C (Pankhurst *et al.* 2010). Esta reducción en vitelogenina estaba relacionada con un descenso en el tamaño del huevo, así como de la fertilidad y supervivencia larvaria.

Sato *et al.*, (2006) estudiaron el efecto de la temperatura del agua en la vitelogénesis de la anguila japonesa, y observaron que el tratamiento con gonadotropinas de salmón a bajas temperaturas (10°C) inducía en las hembras menores niveles de vitelogenina y un menor desarrollo ovárico que en las hembras mantenidas a temperatura elevada (20 °C).

En otro estudio con anguila japonesa se observó la maduración sexual parcial de una hembra de anguila tan sólo gracias a la aplicación de cambios diarios de temperatura entre 5 y 15 °C (Mikawa *et al.*, 2008), sin necesidad de tratamiento hormonal.

Recientemente, Pérez *et al.*, (2011) evaluaron el efecto de distintos regímenes térmicos en hembras de anguila durante su maduración inducida por medio de inyecciones de extracto de hipófisis, y demostraron que el termoperíodo afectaba al proceso de vitelogénesis de la anguila. En este trabajo se observó que un régimen con temperatura variable (10-18 °C) inducía en hembras de anguila europea un perfil hormonal más similar al de otros peces que maduran de forma natural, frente al obtenido con una temperatura constante de 20°C. En un trabajo posterior se vio que regímenes térmicos diferentes causaban diferente velocidad de desarrollo en hembras de anguila, aunque no se evaluó la calidad de las puestas, ya que al finalizar el experimento el máximo estado alcanzado fue de vitelogénesis media/final (Mazzeo *et al.*, en preparación). En éste último estudio se vio que el mantenimiento a una temperatura de 18°C durante el tratamiento hormonal de hembras de anguila causa un mayor desarrollo sexual al cabo de 12 semanas que el obtenido con temperaturas inferiores. Sin embargo temperaturas más bajas (10-15°C), no frenaron el desarrollo de las etapas iniciales de la vitelogénesis.

Hasta el momento, en todos los estudios de maduración de hembras de anguila la temperatura del agua se ha mantenido constante durante todo el proceso de maduración. Tanto la anguila japonesa como la europea se han mantenido a una temperatura de 20 °C (Ohta *et al.*, 1997; Pedersen, 2003, 2004, Palstra *et al.*, 2005) durante los tratamientos de inducción hormonal de la maduración. Esta temperatura podría ser excesivamente alta, al menos en el caso de la anguila europea, teniendo en cuenta que su migración se produce a temperaturas de 7-12 °C (Aarestrup *et al.*, 2009).

### **1.7.2. Efecto en la ovulación y la puesta.**

En la mayoría de teleósteos de zonas templadas, el momento de la reproducción está modulado por los cambios estacionales en la duración del día y la temperatura del agua, los cuales actúan en los ritmos reproductivos endógenos (Bromage *et al.* 2001). Asimismo, los cambios estacionales en la temperatura del agua se cree que son una señal secundaria, interactuando con el fotoperíodo para sincronizar las etapas finales de maduración final de los gametos de peces (Van Der Kraak y Pankhurst, 1997).

## INTRODUCCIÓN

Estudios clásicos en lubina (*Dicentrarchus labrax*) demuestran que en los años en que la temperatura del agua del mar es más fría en otoño (y por tanto, adecuada a esta especie), las puestas se adelantan, mientras que cuando las aguas eran cálidas, las puestas se retrasaban hasta que se producía un descenso de temperatura (Zanuy *et al.*, 1986). Algo similar ocurre en el salmón atlántico (*Salmo salar* L.), donde se ha encontrado que la exposición a temperaturas bajas en el agua acelera la ovulación e incluso mejora la supervivencia en el momento de las puestas (Taranger *et al.*, 2003).

Sin embargo, los efectos de la temperatura varían en función de la especie objeto de estudio. En anguila japonesa, se ha observado que tanto la progresión de la maduración final de los oocitos, como la ovulación y la calidad de los huevos, se ven afectados por la temperatura del agua. La mejor calidad de las puestas se ha obtenido aplicando temperaturas entre 20-22 °C en el momento de la ovulación, frente a temperaturas más extremas como 17,5, o 25 °C (Unuma *et al.*, 2012).

Cómo se ha explicado anteriormente, la migración de la anguila europea corresponde a un perfil de temperaturas bajo, y variable entre el día y la noche, mientras que la zona de puesta se encuentra a temperatura más elevada. Por este motivo, la hipótesis planteada en el siguiente trabajo es que la maduración de la anguila podría producirse de forma más adecuada si esta es sometida a cambios frecuentes de temperatura durante la vitelogénesis. Teniendo en cuenta que las temperaturas observadas durante la migración oscilaron entre 7-12 °C del día a la noche (es decir, una diferencia de 5 °C), y al hecho de que se ha conseguido madurar hembras de anguila variando diariamente la temperatura entre 5-15 °C (Mikawa *et al.*, 2008), se decidió ensayar el efecto de un régimen variable semanalmente entre 10 y 15 °C, frente a un régimen constante a 15 °C, en el desarrollo sexual y la ovulación. Para obtener la ovulación, tras 12 primeras semanas de tratamiento hormonal con los diferentes regímenes térmicos, se aumentó la temperatura a 18 °C en ambos grupos, hasta alcanzar el estado de maduración final y ovulación.

## 2. OBJETIVOS:

Ya que es sabido que:

- Las anguilas realizan migraciones verticales diarias en las que sufren cambios de temperatura, mientras viajan durante meses hacia sus áreas de puesta (Aarestrup *et al.*, 2009, Jellyman & Tsukamoto, 2010)

- Se ha conseguido la maduración espontánea (sin inyecciones hormonales) en una hembra de anguila japonesa, únicamente sometiéndola a variaciones diarias de temperatura (Mikawa *et al.*, 2008)

Nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo: es posible que la aplicación de cambios térmicos durante la vitelogénesis genere una maduración de las hembras de anguila más similar a la que ocurre en la naturaleza, y por tanto, podría causar una mayor calidad de las puestas. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue:

- Evaluar el efecto de dos regímenes térmicos (uno variable y uno constante), aplicados durante la vitelogénesis, en la ovulación, y la calidad de las puestas de hembras de anguila europea, *Anguilla anguilla*.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 3.1. Peces del experimento

Un total de 90 hembras de anguila (peso medio  $864 \pm 22$  g) capturadas durante su migración en la laguna de Albufera, se compraron a la Cofradía de Pescadores del Palmar (Valencia) entre noviembre y diciembre de 2011, y se transportaron a las instalaciones del laboratorio de acuicultura en el Universidad Politécnica de Valencia. Antes de su introducción en los tanques de la instalación, las anguilas se sometieron a una desinfección previa con un baño de formol (formalina comercial, 1:5000 v/v), y a una inyección de antibiótico (septrin, sulfametoxazol+trimetoprim) a una dosis de 20 mg/kg. Estos procesos se realizaron para reducir la carga parasitaria y bacteriana que suelen portar las anguilas capturadas en la Albufera de Valencia.

Ocho de las hembras se sacrificaron al llegar a la instalación, como controles, cuando aún estaban en agua dulce. El resto se mantuvieron en un tanque con agua dulce a 10 °C, con recirculación, hasta acumular un número suficiente de peces para el experimento, durante 2-3 semanas. Una vez alcanzado el número suficiente, se incrementó la salinidad de forma progresiva durante 8 días, hasta alcanzar 37 g/l. El incremento se realizó por mezcla con agua de mar procedente de la costa, almacenada en un depósito del Laboratorio de Acuicultura. Durante el tiempo de cambio de salinidad, la temperatura del agua se mantuvo a 15 °C.

Las anguilas se dividieron en 2 grupos de 45 peces, que se mantuvieron durante todo el experimento en 2 tanques de fibra de vidrio de 1500 l con sistemas de refrigeración y recirculación independientes. Los tanques se mantenían tapados con cubiertas negras para mantener la máxima oscuridad posible (mallas de sombra de polietileno, de uso en jardinería). Cada tanque se sometió a un régimen térmico diferente que se describe mas adelante.

Las hembras se mantuvieron en ayuno durante todo el experimento. Antes de iniciar el experimento las hembras se marcaron con microchips (ID-100A Microtransponder, Trovan), que se insertaron en el músculo dorsal cercano a la aleta pectoral, para su identificación individual.

#### 3.2. Tratamientos hormonales

##### 3.2.1 Hembras

Tras la aclimatación a agua salada, las hembras comenzaron a tratarse semanalmente con extracto de hipófisis de carpa (CPE, Catvis, Ltd), que se aplicaba por inyección en el

musculo dorsal, en una dosis de 20 mg/kg de peso corporal. La preparación previa del CPE se realizó por dilución en suero fisiológico (NaCl 0.9 g/100 ml), en una concentración de 0.1 g CPE/ml suero. Tras agitación, la mezcla se centrifugó (3000 rpm, 10 minutos) y el sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso. La dosis usada para cada pez (20 mg/kg peso) se calculó tras pesar a las hembras en la primera inyección semanal, y dicha dosis se mantuvo constante para cada pez durante todo el experimento.

### 3.2.2 Machos

Cinco semanas tras comenzar el tratamiento hormonal de las hembras con CPE, un grupo de 30 machos comenzó a tratarse con hCG recombinante (Ovitrelle, MerckSerono®), de la forma habitual (1.5 IU/ g pez/semana; Pérez *et al.*, 2000). Se mantuvieron en acuarios con agua de mar a 20 °C, y posteriormente se trasladaron a un tanque mayor, a 20 °C, adonde eran transferidas las hembras en fase de maduración final.

Generalmente los machos se inyectaban los miércoles, pero, si se esperaba una puesta otro día de la semana, por ejemplo un martes, entonces los machos se inyectaban 24 h antes para obtener la máxima calidad del esperma (Perez *et al.* 2000).

Dos horas antes del momento previsto para la puesta, se extraía el esperma de todos los machos por masaje abdominal. La evaluación de la motilidad se realizó de forma subjetiva, comprobándose en algunos casos (puestas 1 a 4) por medio de sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analyses) la fiabilidad de las observaciones subjetivas. Se seleccionaron las muestras de esperma de mayor motilidad (> 50%), y se realizó un pool con el semen de 3-4 machos. Se diluyó entonces el semen a una proporción 1/50 o 1/100 con medio diluyente para esperma de anguila (Peñaranda *et al.*, 2010). El semen diluido se mantuvo en refrigerador a 4 °C hasta el momento de la fecundación.

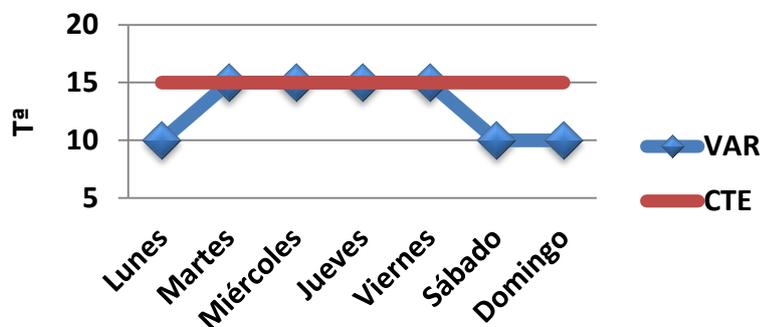
### 3.3 Tratamientos térmicos.

Después de la aclimatación de las anguilas a agua de mar (a 15 °C), se aplicaron 2 regímenes térmicos, denominados *constante* (CTE) y *variable* (VAR). En el régimen térmico CTE, la temperatura del agua se mantenía durante toda la semana a 15 °C.

En el régimen VAR la temperatura se mantenía a 15 °C durante 4 días a la semana (lunes a jueves), manteniéndose los otros 3 (viernes-domingo) a 10 °C. En el gráfico 1 pueden verse los cambios semanales de temperatura.

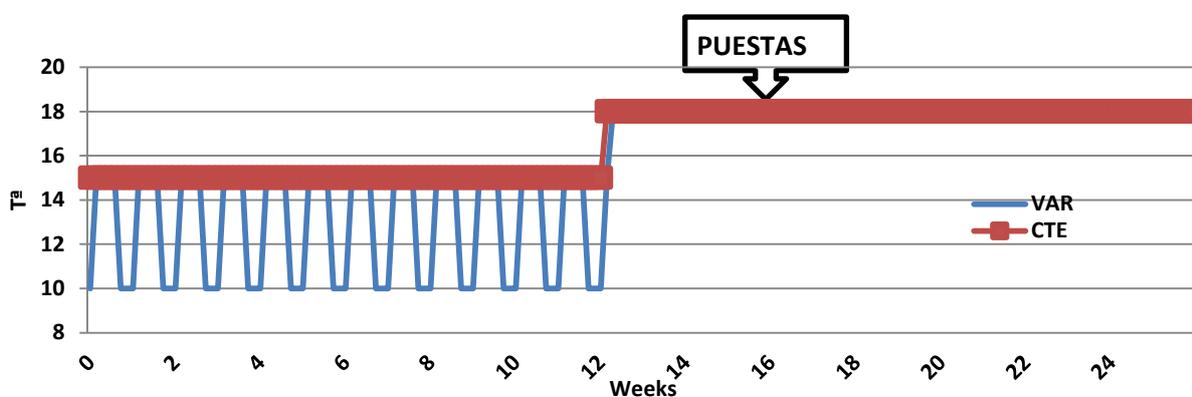
## MATERIAL Y MÉTODOS

Los cambios de temperatura semanal se controlaron mediante un sistema de cuatro enfriadores (2 por tanque), con capacidad de 1200-3000 l/h (Boyu-JAD) acoplados al sistema de recirculación de cada tanque. De ésta forma se podía modificar la temperatura de forma independiente en ambos tanques.



**Fig. 5:** Cambios de temperatura semanales en los regímenes térmicos Constante (CTE) y Variable (VAR).

Estos regímenes térmicos se mantuvieron durante las 12 primeras semanas de tratamiento hormonal. A partir de este momento, y hasta la maduración final, la temperatura de ambos grupos se incrementó a 18 °C (Fig. 6)



**Fig. 6:** Cambios de temperatura a lo largo del experimento, en los regímenes térmicos Constante (CTE) y Variable (VAR).

### 3.4 Muestreos y sacrificio de animales

Cada semana se realizaba la inyección semanal de CPE de las hembras, generalmente los lunes. Para ello, en primer lugar se extraían todas las hembras de un determinado tanque/tratamiento a otros depósitos menores (cubos de 50 l) con agua de mar y aireación. Posteriormente se iba pescando cada hembra con un salabre, se leía el chip con un lector (Trovan Ltd.) y se preparaba la dosis de CPE correspondiente a esa hembra, que se llevaba

anotada en una tabla. Durante las 10 primeras semanas de tratamiento no se registró de nuevo el peso de cada pez, pero a partir de la inyección 10ª, se anotó el peso individual de cada hembra tras cada inyección, para comprobar los cambios de peso relacionados con la maduración final de los ovarios.

Se realizaron sacrificios periódicos durante el experimento para otros estudios fisiológicos que no se muestran en éste trabajo. En total se sacrificaron:

- 8 animales a su llegada a la instalación como: CONTROL DULCE (salinidad 0 g/l.) (n=8)
- 8 animales de cada grupo tanto CTE como VAR, en las semanas 12 y 16 (n=32).
- 8 peces control semana 16 (n=8)
- 8 peces/grupo en estado de migración nuclear (MN) (n=13)

Es decir, un total de 61 animales fueron sacrificados antes de la puesta.

Las puestas se indujeron en 6 hembras de cada grupo experimental. Tras la ovulación, las hembras se sacrificaron; se anotó el peso de los huevos obtenidos, y parámetros biométricos externos (peso total, longitud total, diámetro vertical y horizontal del ojo,) para el posterior cálculo de índice ocular. También se tomaron de muestras de sangre y tejidos para posteriores análisis. Para el cálculo de los índices se usaron las siguientes fórmulas:

- Índice ocular [ $I_o = 100 \pi L_t^{-1} (0.25 (D_h + D_v))^2$ ].  $L_t$  es la longitud total, el  $D_h$  el diámetro horizontal del ojo, y  $D_v$  el diámetro vertical del ojo. Este índice se calculó de acuerdo con Pankhurst (1982).
- Índice gonadosomático IGS=  $100 \text{ Peso gónada} \times \text{Peso total}^{-1}$
- Índice hepatosomático IHS=  $100 \text{ Peso hígado} \times \text{Peso total}^{-1}$
- Índice pseudogonadosomático IPGS=  $[\text{Peso de los huevos ovulados} \times 100] \times [\text{Peso del pez pre-puesta} - \text{peso de los huevos ovulados}]^{-1}$ .

### 3.5 Inducción a la puesta

Las hembras que, en el momento de la inyección semanal de CPE mostraron el vientre blando y abultado, acompañado por un incremento de peso, se mantuvieron aparte en un cesto de rejilla, dentro del tanque correspondiente, para realizar un seguimiento de su evolución en los días posteriores, sin perturbar al resto de peces del tanque. Si el grado de abultamiento del vientre era importante, también se canularon por medio de jeringas con una

## MATERIAL Y MÉTODOS

abertura de 1.6 mm de diámetro. Se extrajo una muestra de oocitos, que se observaron de inmediato en una lupa Leica MZ16F, con cámara Nikon acoplada. Los oocitos se depositaban en una placa Petri y se añadía suero fisiológico (NaCl 0.9 %) para una observación más clara de los oocitos. Dos días tras la inyección semanal de CPE, las hembras aisladas se pesaron de nuevo y se canularon. Se extrajo una nueva muestra de oocitos, que se observaron en fresco bajo la lupa. Los estados de maduración alcanzados se clasificaron de acuerdo con la escala publicada por Palstra *et al.* 2005. Si los oocitos de una determinada hembra se encontraban en estado de migración nuclear, se procedía al protocolo de inducción de la maduración final de dicha hembra:

- Inyección 2ª (Prime Dose, PD) de CPE (la misma dosis que la semanal). Se suministraba 2 días tras la última inyección semanal de CPE.
- 24 horas tras la PD, se pesaban y canulaban de nuevo; los oocitos se observaban a la lupa. Si el estado de maduración de los oocitos correspondía con un estado de migración nuclear avanzada, se administraba a la hembra una inyección de DHP (Sigma), diluida en etanol y agua 1: 1, a una dosis de 2 µg/g pez (Ohta *et al.* 1997).
- Tras la inyección de DHP, las hembras se transferían a otro tanque de 1500 l a 20°C hasta el momento de la puesta. Durante este periodo, en las puestas 2.1 y 2.2, las hembras se mantuvieron con 5 machos espermiantes, y desde la 3ª a 6ª puestas, las hembras estuvieron acompañadas en éste tanque por 30 machos, la mitad de ellos espermiantes.
- Aproximadamente 12 horas tras la inyección de DHP se esperaba la puesta. Algo antes de las 12 h, las hembras se trasladaban a un cubo, también a 20 °C, desde donde pudiera palpase su vientre y observar la expulsión de oocitos al exterior.

Las 12 puestas totales (de los dos grupos) se realizaron en 6 semanas, en el intervalo comprendido entre la semana 16 a la 23 de tratamientos hormonales (Tabla 1). Cada puesta fue programada para obtener huevos de un máximo de dos hembras, a excepción de las puestas 1 y 3 en las que solo se decidió inducir la puesta en un animal.

### 3.6 Fecundación e incubación

Las hembras se observaron y palparon de forma periódica desde las 11 h tras la inyección de DHP hasta el momento de la ovulación. En algunos casos se produjeron ovulaciones espontáneas en el tanque (puestas 3.1, 3.2) antes del momento previsto, por lo que no se pudo obtener huevos (puesta 3.2), o éstos fueron muy escasos (puesta 3.1). Cuando la hembra comenzaba a liberar oocitos al ser presionada ligeramente en el abdomen, se procedía al stripping o masaje abdominal. En primer lugar, se sedaba muy ligeramente a la hembra, o en algunos casos no fue posible realizar la sedación, ya que la hembra comenzaba a liberar chorros de huevos, de modo que se realizó el stripping sin anestesia. En estos casos, más que un stripping se podría hablar de una puesta espontánea recogida en el momento de producirse.

Antes de comenzar la recolección de huevos, se limpiaba la superficie abdominal con agua destilada para evitar la activación de los huevos con agua de mar. Sobre una bandeja de plástico previamente tarada, se realizaba el stripping, y se anotaba el peso total de los huevos obtenidos. A partir de aquí, parte de la puesta se fecundaba en placas Petri, y el resto en la propia bandeja de recolección. En primer lugar, se añadió a los huevos esperma diluido, y se realizó una mezcla suave. Se añadió entonces agua de mar (temperatura ambiente, 36 g/l; Tabla 1), y tras 5 minutos los huevos se transfirieron a recipientes con agua de mar limpia. El contenido de cada placa Petri se transfirió a vasos de precipitados con 200 ml de agua de mar, para su posterior observación tras 4 h post-fecundación, y los huevos fecundados en la bandeja se transfirieron a recipientes mayores (2-15 l), con aireación suave. La temperatura de incubación osciló entre 18 y 23°C, según las puestas (Tabla 1). Tras 4-6 horas post-fecundación (h.p.f.), se tomaron muestras de los oocitos flotantes de cada puesta, y se realizaron fotografías con una lupa Leica MZ16F (1.6 x) para posteriormente evaluar la tasa de fecundación y el diámetro medio de los huevos fecundados. Se tomaron fotografías suficientes para incluir un número de oocitos entre 200-250. Durante la incubación, se retiraron de forma periódica los huevos muertos (opacos) y se realizaron renovaciones del agua de mar. Las condiciones específicas de cada puesta se detallan en la Tabla 1.

Regimen	Hembra	TAG	Peso (g)	Inyección	Machos	Tº fecundación	Tº incubación
CTE	1	4ACA	845	16	0	17	19
CTE	2.1	4DDB	695	18	5	18	21
CTE	2.2	6B1E	675	18	5	18	21
CTE	3.1	A0AF	631	19	30	20	20
CTE	3.2	322B	936	19	30	20	--
CTE	5.1	090B	775	22	30	20	20
VAR	4.1	4913	745	20	30	18	18
VAR	4.2	E113	960	20	30	18	18
VAR	5.2	4DF4	769	22	30	20	20
VAR	6.1	499F	1445	23	30	22	22
VAR	6.2	8964	726	23	30	22	22
VAR	6.3	6A61	833	23	30	22	22

**Tabla 1:** Condiciones específicas en las que tuvo lugar cada una de las puestas.

### 3.7 Flotabilidad de los huevos

Durante la puesta, una muestra de 20 g de huevos no fecundados fue apartada para el cálculo del porcentaje de flotabilidad. La flotabilidad se calculó usando una probeta de 100 ml, llenándola con 70 ml de agua de mar a 36 g/l. Después de añadir los 20 g de huevos a la probeta, se dejaba reposar en oscuridad durante 10 minutos. Pasado este tiempo se anotaba el nº de ml de huevos flotantes y no flotantes, y se evaluaba el porcentaje de huevos flotantes.

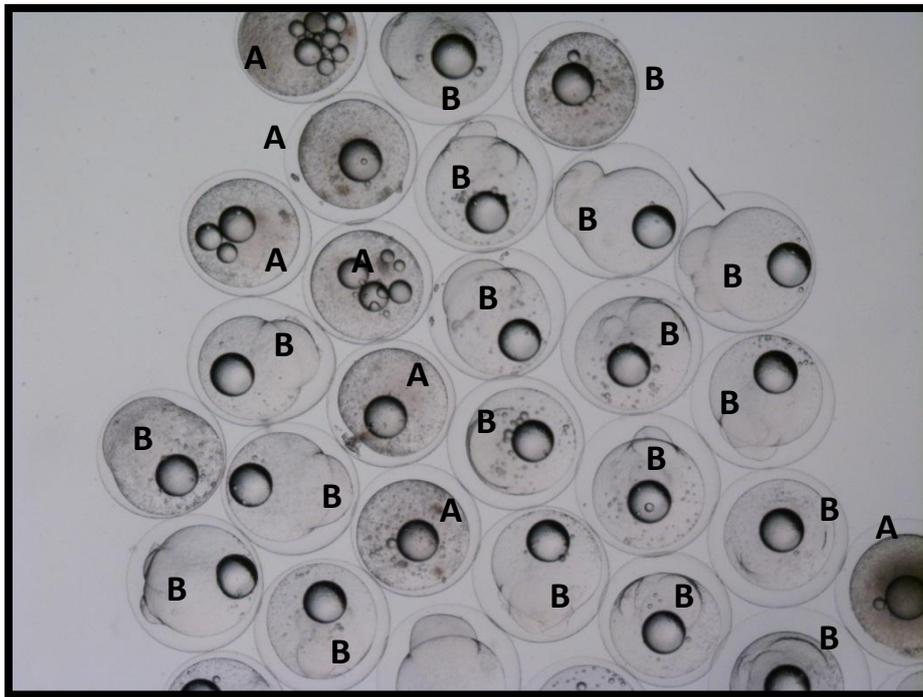
### 3.8 Diámetro de los oocitos pre-fecundación y post-fecundación

#### 3.8.1 Diámetro de los oocitos en fase de pre-ovulación

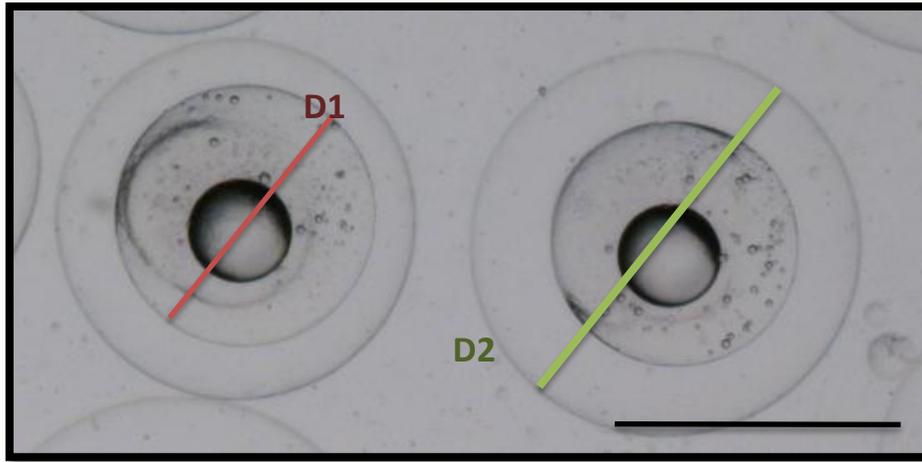
Una muestra de oocitos canulados en el momento de la inyección de CPE2 (o PD) se fotografiaron y midieron. Asimismo, una muestra de oocitos de la misma hembra se fotografió en el momento de la inyección de DHP, 24h más tarde. El número de oocitos medidos en el momento de ambas dosis (CPE2 y DHP) osciló entre 20 y 40, en función de la cantidad de oocitos extraídos por canulación en ese momento. El programa informático utilizado para el cálculo del diámetro fue el ImageJ 1.47.

### 3.8.2 Diámetro de los oocitos post-fecundación

A partir de las imágenes tomadas a las 4-5 horas post-fecundación con una lupa Leica MZ16F, se realizaron diversas medidas en un total de aproximadamente, 100 huevos por puesta. Las medidas se realizaron en huevos fecundados, los cuales se diferenciaban por la aparición de divisiones celulares (Fig. 7). Se tomaron 2 medidas del diámetro de cada oocito, 1) sin espacio perivitelino y 2) con espacio perivitelino y corion (Fig. 8). El programa utilizado para el cálculo de los diámetros fue el software de análisis de imagen ImageJ 1.47.



**Fig. 7:** Puesta 1 de régimen CTE, tomada 4h.p.f. A) Huevos no fecundados, B) Huevos fecundados. Objetivo: 1.6x



**Fig. 8:** Puesta 1 de régimen CTE, tomada 4h.p.f. D1) diámetro del cigoto sin espacio perivitelino, D2) diámetro del cigoto con espacio perivitelino . Escala: 900  $\mu\text{m}$ .

### 3.9 Análisis estadístico

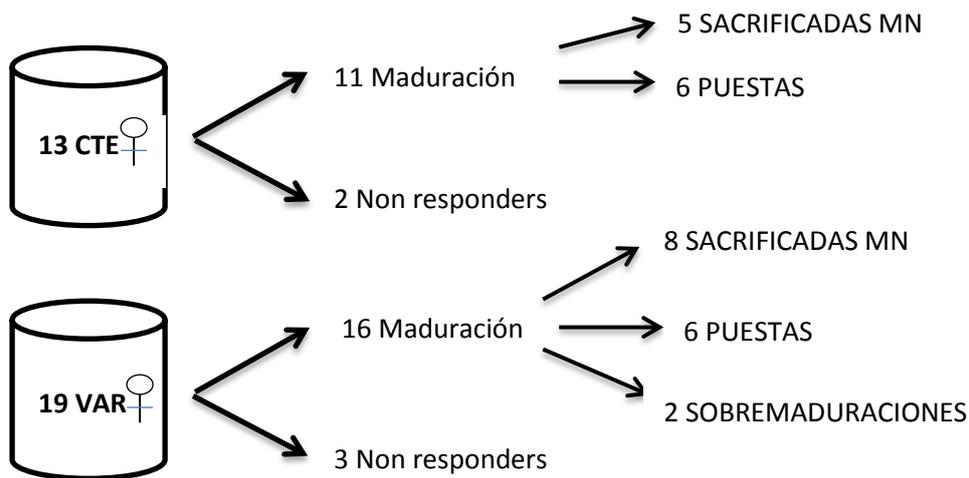
Cada variable se analizó para comprobar su normalidad mediante el coeficiente de asimetría y el de Curtosis como parámetros de referencia. Las variables no normales se transformaron a su logaritmo en base 10 y de nuevo se comprobó la normalidad.

Se realizó un ANOVA de dos vías (muestreo, régimen térmico), seguido por un análisis de rangos múltiples (Test de Newman-Kewls) para la comparación de medias. La homogeneidad de varianzas se estudió con el test de Bartlett. Para todos los tests se consideró un valor  $P < 0.05$  para indicar si las diferencias eran o no significativas. Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con el software Statgraphics Plus® 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MO, USA) y SPSS 15.0 (IBM, software). Los resultados se presentan como la media  $\pm$  error estándar.

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Porcentaje de respuesta a los tratamientos

Aunque el número total de hembras que iniciaron el tratamiento hormonal fue de 45 por tratamiento térmico, sólo una parte se llevó a maduración final y ovulación. Concretamente 13 hembras del grupo CTE y 19 hembras del grupo VAR. De las 13 hembras iniciales del grupo CTE, 11 hembras maduraron, y 2 (18 %) no respondieron a los tratamientos. (Non responders, N.R.); de las 11 hembras que maduraron, 5 hembras fueron sacrificadas en estado de migración nuclear, y en las otras 6 se indujo la puesta. En cuanto al tratamiento VAR, de las 19 hembras iniciales, 16 llegaron al estado de maduración, y 3 no respondieron a los tratamientos; de las 16 hembras que maduraron, se sacrificaron 8 en estado de migración nuclear, y 2 más se sacrificaron cuando ya habían entrado en regresión, tras haber sobremadurado. La puesta se indujo en 6 ejemplares del grupo VAR.



En resumen, en el tratamiento CTE se produjo la maduración del 84.6 % de las hembras, y en el grupo VAR, del 84.2 % de las hembras. En la Tabla 2 se muestra el resumen de las distintas puestas obtenidas en ambos grupos. Finalmente cinco puestas (de seis) fueron analizadas para cada grupo (Tabla 2), ya que hubo una puesta fallida por cada uno de los grupos por causas de sobremaduración o puesta espontánea en el tanque.

## RESULTADOS

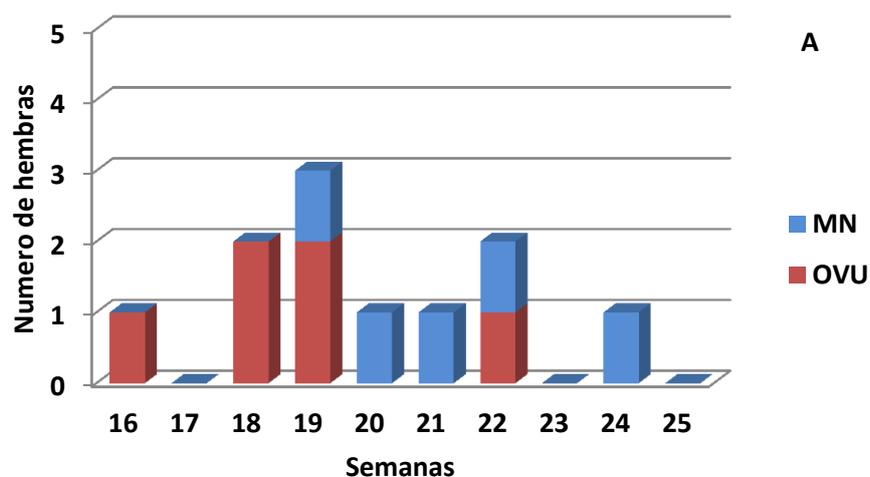
Puesta	Semana	Régimen	Incremento de peso (%)	Tiempo de latencia	Peso huevos (g)	Tasa de fecundación (%)	Estado máximo
1	16	CTE	102.0	15 h 30'	261.7	82,47	Gástrula
2.1	18	CTE	114.0	14 h 30'	261.2	73,79	Gástrula
2.2	18	CTE	116.2	14 h 22'	270	91,7	Gástrula
3.1	19	CTE	106.2	12 h	110	70,67	Gástrula
4.1	20	VAR	102.2	12 h	331.6	79,89	Larva eclosionada
4.2	20	VAR	101.5	13 h 10'	162.5	98,4	Neurula temprana
5.1	22	CTE	113	12 h	285	40,45	Neurula temprana
5.2	22	VAR	114.8	17 h 05'	270	39,58	larva eclos.
6.1	23	VAR	95.6	10 h 56'	404	76,8	larva eclos.
6.2	23	VAR	94.6	12 h 05'	246.5	82,75	larva eclos.

**Tabla 2:** Parámetros preovulatorios (Incremento de peso), ovulatorios (tiempo de latencia, peso de los huevos ovulados) y post-fecundación (% de fecundación, estado de desarrollo embrionario máximo observado) de las diferentes puestas obtenidas. (% Incremento de peso= peso final\*100\* peso inicial<sup>-1</sup>)

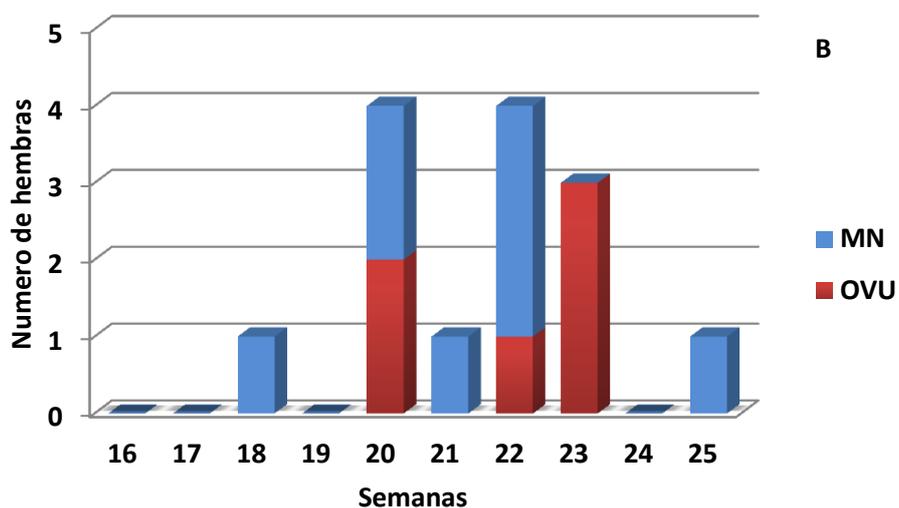
### 4.2 Tiempo de maduración y ovulación

En la Figura 9 puede observarse las semanas de aparición de hembras maduras (en estado de migración nuclear) y las ovulaciones obtenidas de cada grupo de tratamiento a lo largo del tiempo. La primera ovulación se obtuvo en el grupo CTE en la semana 16ª de tratamiento hormonal (tras 4 semanas a 18°C). La primera ovulación de hembras del grupo VAR se observó 2 semanas más tarde.

## Régimen constante:



## Régimen variable:



**Fig. 9:** Tiempo de aparición de hembras en estado de migración nuclear (MN) y hembras en las que se indujo la ovulación (OVU), tanto en régimen constante (A), como en variable (B).

En el grupo CTE, la mayor concentración de hembras maduras se produjo en las semanas 18-22ª de tratamiento hormonal, mientras que en el grupo VAR apareció algo más tarde, con un máximo de hembras maduras tras 20-23 semanas de tratamiento con inyecciones semanales de CPE.

Al comparar el tiempo medio de hasta alcanzar la ovulación, aparecieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre ambos tratamientos, con una media de  $18.7 \pm 0.7$  semanas en el grupo CTE, frente a  $21.8 \pm 0.7$  semanas en el grupo VAR.

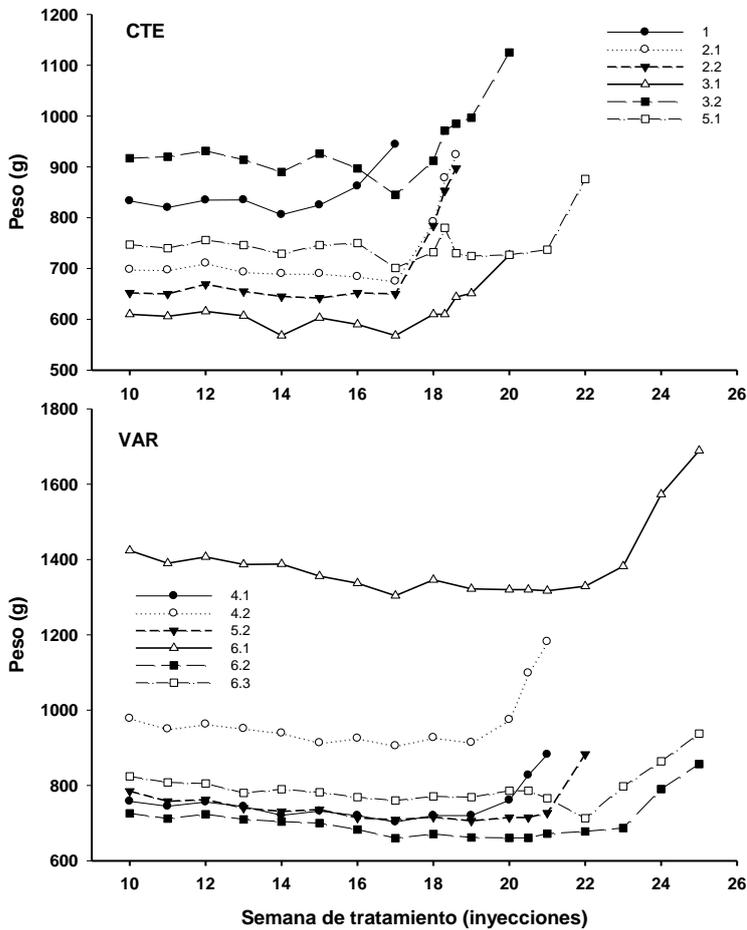
Todas las hembras que se inyectaron con DHP presentaron respuesta ovulatoria, sin excepción.

## RESULTADOS

### 4.3. Evolución del peso correspondiente a hembras que ovularon

#### 4.3.1 Cambios en el peso previos a la puesta

En la Figura 10 puede verse la evolución del peso corporal de las hembras que realizaron puestas de ambos grupos.

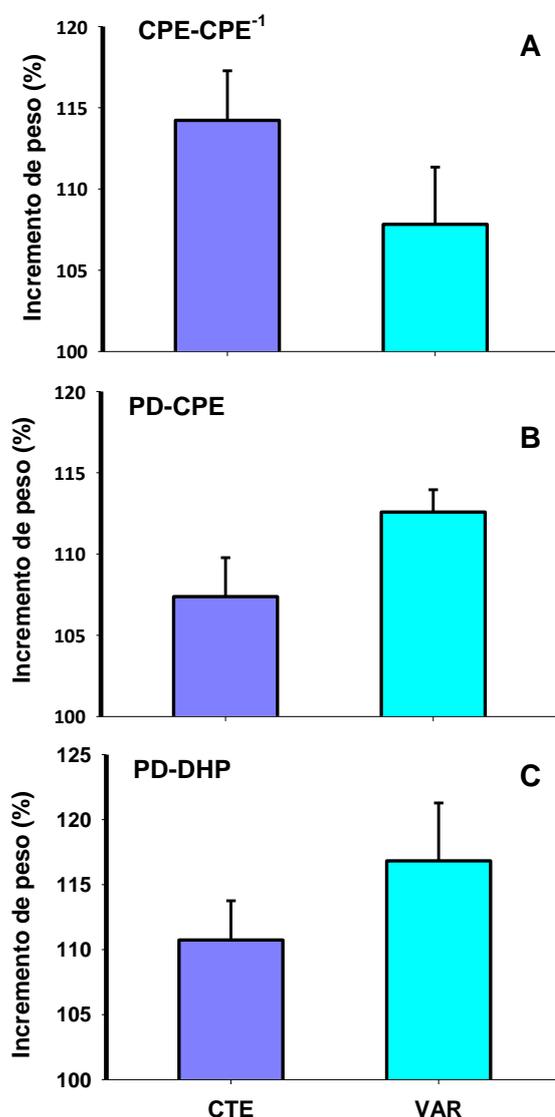


**Fig. 10:** Evolución del peso individual (g) de las hembras que originaron puestas

Según muestra el gráfico, en general todas las hembras sufrieron un incremento de peso desde las semanas previas a la ovulación. En la mayoría de los casos el incremento de peso comenzó 2 semanas antes de la ovulación, aunque en algunos casos el periodo de aumento fue más largo (4 semanas, hembras 3.1, 3.2 régimen CTE) o más corto, de sólo 1 semana (hembra 5.1 régimen constante, hembras 5.2, 6.2 del régimen VAR).

#### 4.3.2 Incremento del peso durante la maduración final

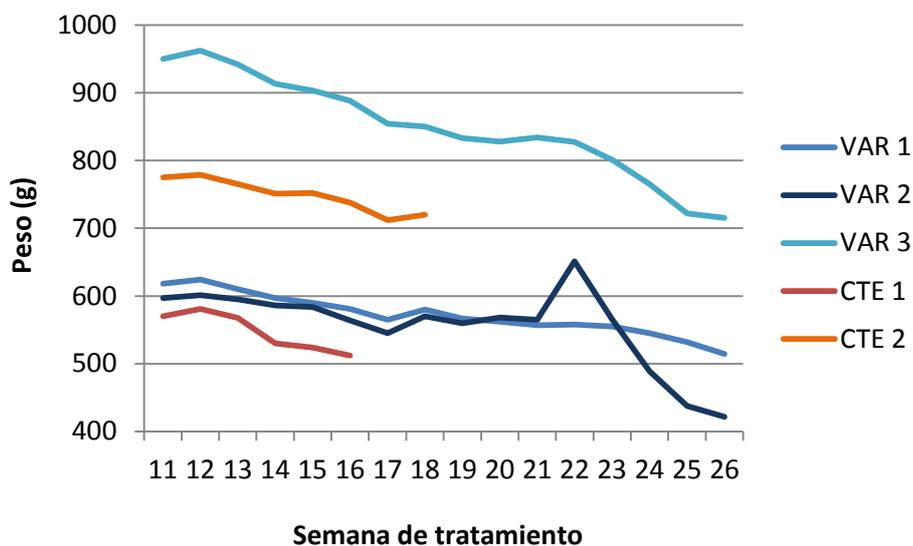
No hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las variaciones de peso previas a la puesta entre ambos grupos (Figura 11), aunque se observaba una tendencia: las hembras del grupo CTE parecían incrementar más su peso respecto a la semana previa a la ovulación (Fig.11. A), mientras que los incrementos de peso en la misma semana de la puesta (incremento desde la inyección de CPE semanal hasta la Prime Dose (PD), o el incremento desde la PD hasta la inyección de DHP) parecían mayores en el grupo que siguió el régimen térmico VAR.



**Figura 11.** Incremento del peso relativo de las hembras que ovularon. (A): desde la inyección semanal de la semana previa, hasta la inyección semanal en la semana de ovulación (7d). (B): desde la inyección semanal de CPE hasta la Prime Dose (2ª inyección de CPE), (48h). (C): desde la Prime Dose hasta la inyección de DHP (24h más tarde).

#### 4.4. Evolución del peso de las hembras que no maduraron

En la figura 12 puede verse la evolución del peso de las hembras que no maduraron sexualmente en respuesta al tratamiento hormonal. En general, se aprecia una disminución progresiva del peso a lo largo del tiempo.

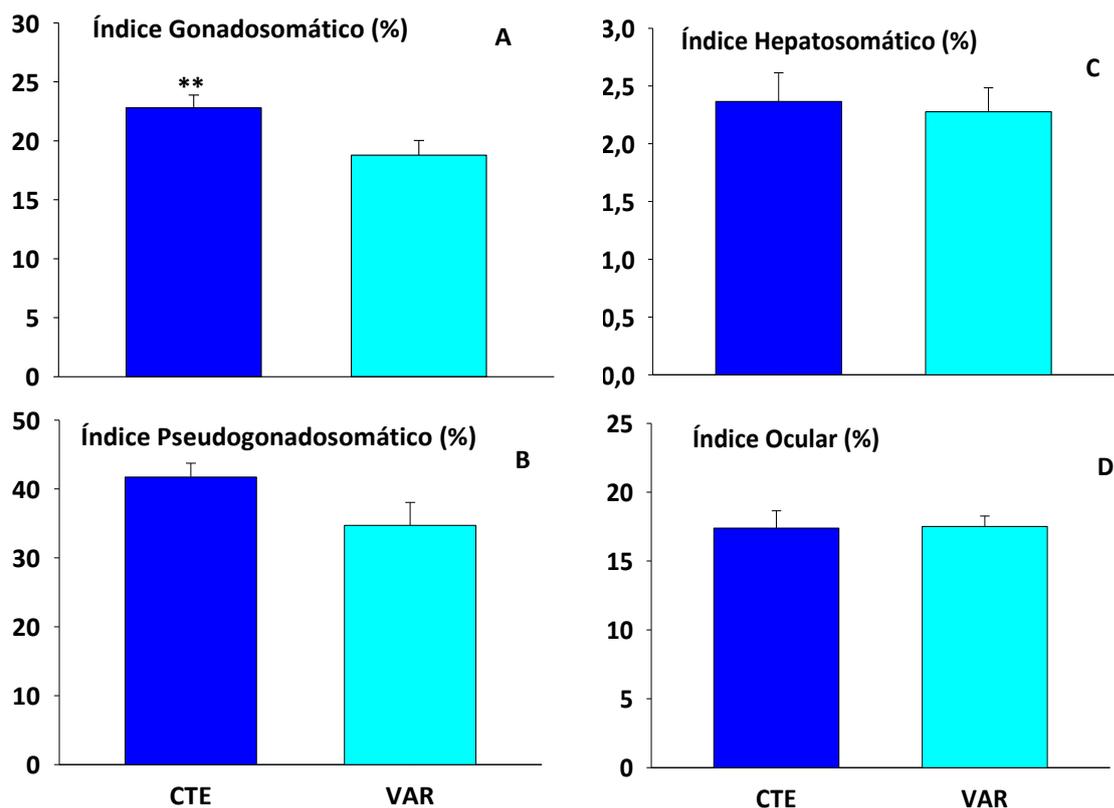


**Fig. 12:** Evolución del peso en los peces que no respondieron a los tratamientos hormonales en ambos grupos.

Las hembras 1 y 2 del grupo constante se eliminaron del experimento en las semanas 16 y 18, respectivamente. La única hembra que experimentó un pico de incremento de peso fue la hembra 2 del grupo VAR.

#### 4.5 índices biométricos de las hembras en post-ovulación

Tras la ovulación, solo se observaron diferencias significativas entre regímenes térmicos en el índice gonadosomático (Figura 13), el cual fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en el grupo CTE, en comparación con el grupo VAR. Es decir, que las hembras del grupo CTE retuvieron un mayor porcentaje de su gónada tras la puesta que las del grupo VAR.



**Fig. 13:** Índices biométricos correspondientes a hembras ovuladas, de los 2 tratamientos térmicos.

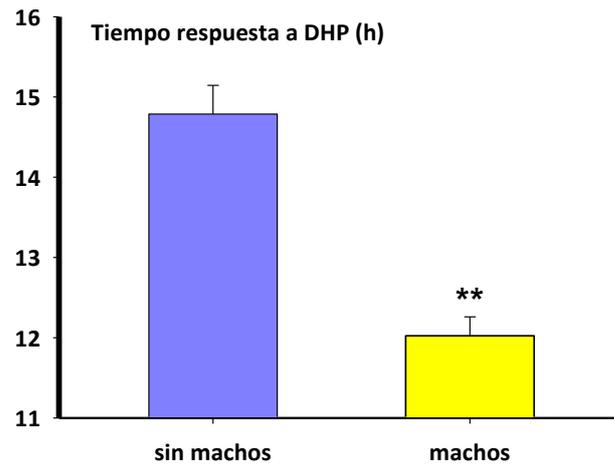
#### 4.6 Tiempo de respuesta a la inyección de DHP

El tiempo de respuesta ovulatoria a la inyección de DHP (Figura 14) no se vio afectado por el tratamiento térmico recibido, pero sí por la presencia de machos acompañando a las hembras en las últimas 10-12 horas previas a la ovulación ( $p < 0.01$ ). Las hembras que maduraron con abundante presencia de machos (30 machos, durante las últimas 10-14 horas antes de la puesta) ovularon tras una media de 12 horas tras la inyección de DHP, mientras

## RESULTADOS

que las que no estuvieron acompañadas por machos, o con sólo 5 machos, tardaron una media de casi 15 h en ovular.

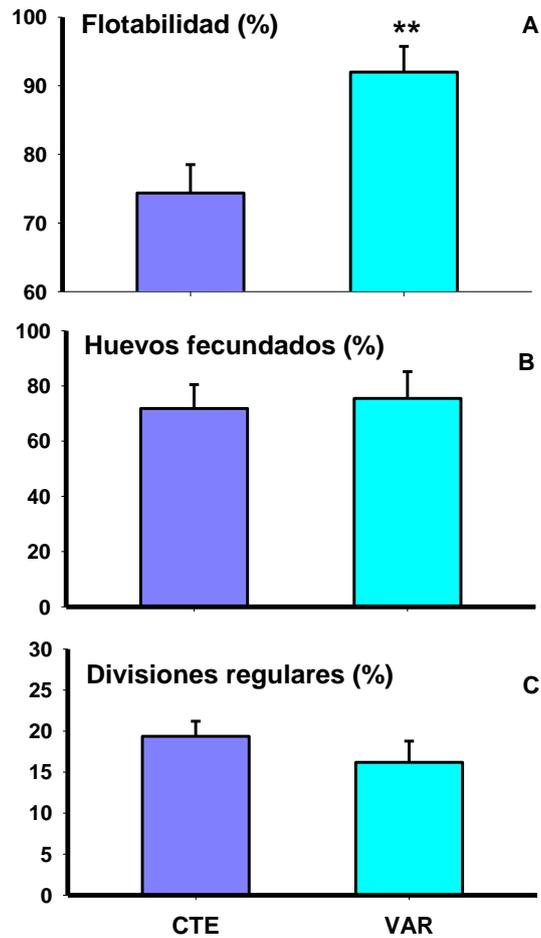
Además, aunque no se anotaron los datos de forma sistemática, las puestas con machos abundantes parecían ser espontáneas, ya que en muchos casos la hembra expulsaba los huevos por sí misma, de modo que nuestra labor se restringía a sujetar el animal mientras realizaba la puesta, más que a presionarle el abdomen para que expulsara los huevos.



**Fig. 14:** Tiempo de respuesta ovulatoria a la inyección de DHP, en ausencia de machos (sólo 5 machos en las últimas 2-3 h), o en presencia de 30 machos durante las 10-14 h previas a la puesta. (Excluido el dato de la hembra 5.2, mas inmadura de lo habitual). (n=3, n=7)

### 4.7 Calidad de las puestas: flotabilidad, tasa de fecundación, % de huevos con divisiones regulares.

El porcentaje de huevos flotantes (Fig.15.A) en las puestas del grupo VAR fue significativamente superior al de las puestas del grupo CTE ( $p < 0.05$ ), con una media de 92 % frente a 74,4 % en el grupo CTE. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la tasa de fecundación, superior al 60 % en ambos casos, o en porcentaje de embriones con divisiones regulares, que estuvo en torno al 16-20 %.

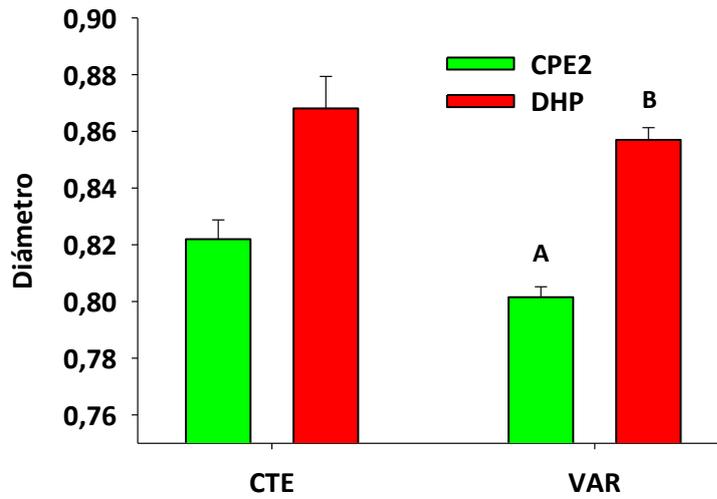


**Fig. 15:** Flotabilidad (A), tasa de fecundación (B) y porcentaje de embriones con divisiones regulares (C) en las puestas obtenidas con diferentes regímenes térmicos.

#### 4.8. Tamaño de los oocitos: diámetros

##### 4.8.1. Incrementos de diámetro previos a la ovulación

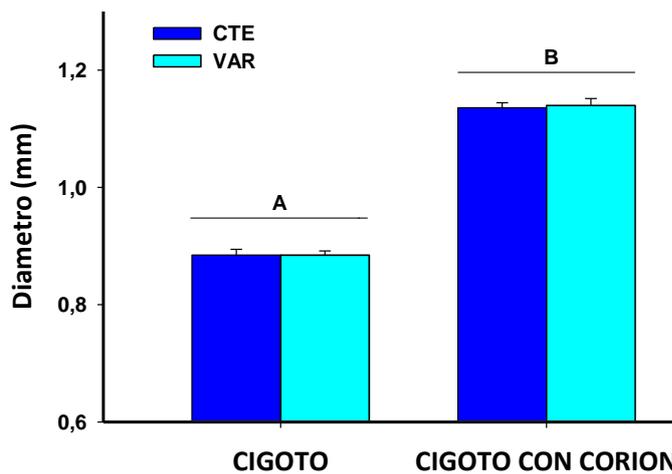
Al comparar el aumento de tamaño del huevo en las últimas 24h antes de la ovulación (entre la 2ª dosis de CPE = PD y la inyección de DHP), en el grupo VAR se produjo un aumento del tamaño significativo ( $p < 0.05$ ; Fig. 16), mientras que en el grupo CTE las diferencias no fueron significativas.



**Fig. 16:** Diámetro medido de los oocitos, en el momento correspondiente a la dosis de CPE2 y DHP, obtenidos con los diferentes regímenes térmicos.

**4.8.2. Diámetro de los huevos embrionados a las 4h post-fecundación.**

Como muestra la Figura 17, no se observaron diferencias en el diámetro del cigoto (sin espacio perivitelino) o el diámetro total del cigoto entre ambos grupos, CTE y VAR.



**Fig. 17:** Diámetro medio de los cigotos, 4h post-fecundación, obtenidos con los dos regímenes térmicos. Diámetro del cigoto, y diámetro total, incluyendo el espacio perivitelino.

#### 4.9. Desarrollo embrionario

Cuatro de cinco puestas del grupo VAR dieron lugar a larvas que eclosionaron, (Fig.18: 17 y 18), mientras que en el grupo CTE el desarrollo se detuvo en estado de gástrula en cuatro de las cinco puestas (Fig. 18: 12).

Las puestas comenzaron a observarse 4 horas post-fecundación, con el objetivo de observar los embriones en estado de mórula. Sin embargo, algunos estados previos aparecieron al mismo tiempo; estados de 4 células (Fig. 18: 1, 18: 2), de 8 células (Fig. 18: 3), o 16 células (Fig. 18: 4). En la Tabla 3 puede verse los tiempos de aparición de los diferentes estados embrionarios.

Los estados de mórula (definidos por un nº de células entre 32-64), con formas redondeadas u ovoides (Fig. 18: 5, 18: 6) aparecieron entre las 4-5 h.p.f. Los estados de blástula (Fig. 18: 7, 18: 8, 18: 9), que se definen por un nº de células >128, con aspecto redondeado y células poco visibles, se observaron entre las 5 h 40' y las 6 h 46' p.f. La gastrulación (Fig. 18: 10) comenzó a las 6 h 40' (puestas 1, 2.1) y se observó hasta las 9 h 20' p. f. (puestas 4.1, 4.2). Un estado tardío de gastrulación, el de anillo germinal, se observó entre las 6 h 46' (hembra 2.1, Fig. 18: 11) hasta las 13 h.p.f (Fig. 18:12).

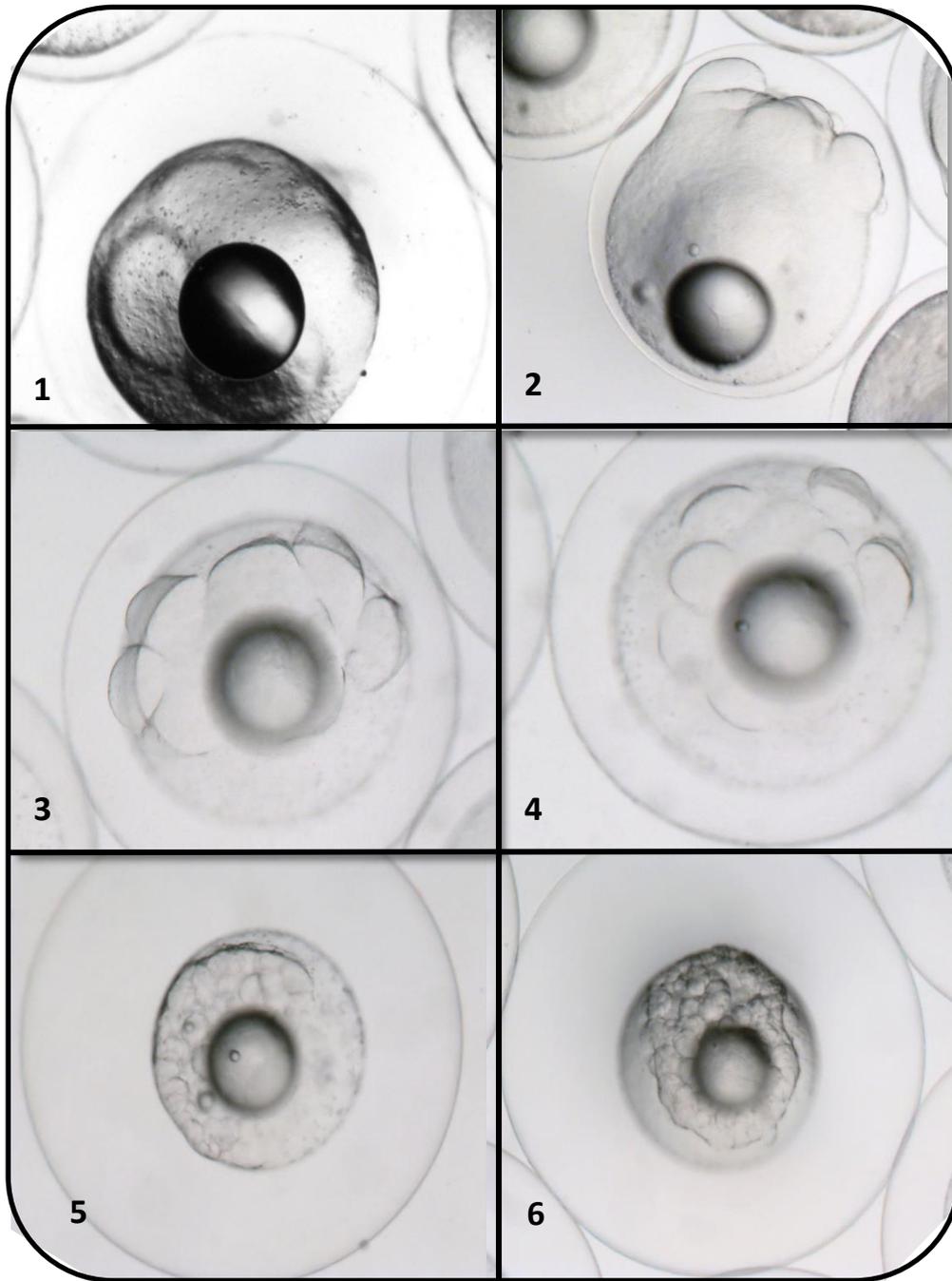
Tiempo	Estado de desarrollo
3 h 40- 5 h 30'	Primeras divisiones o estado de 4,8, 16 células
4 h 20' - 5 h.30' h.p.f	Mórula
5 h 40'-6 h 46' p.f	Blástula o blastodisco
6.40-9.20 h.p.f	Gástrula
6 h 46'-13 h.p.f.	Gástrula: anillo germinal
30 h.p.f.	Segmentación
35 h.p.f.	Cola libre
41 h 48' p.f. (5.2)	Corazón latiendo
34 h. 40' p.f. (6.1)	Movimientos embrión
35 h.40' p.f. (6.1)	Mucha vibración embriones
41 h 48' (5.2) 38 h 16' (6.1) 36 h 45' (6.2)	Eclosión

**Tabla 3.** Desarrollo embrionario de la anguila en el presente experimento.

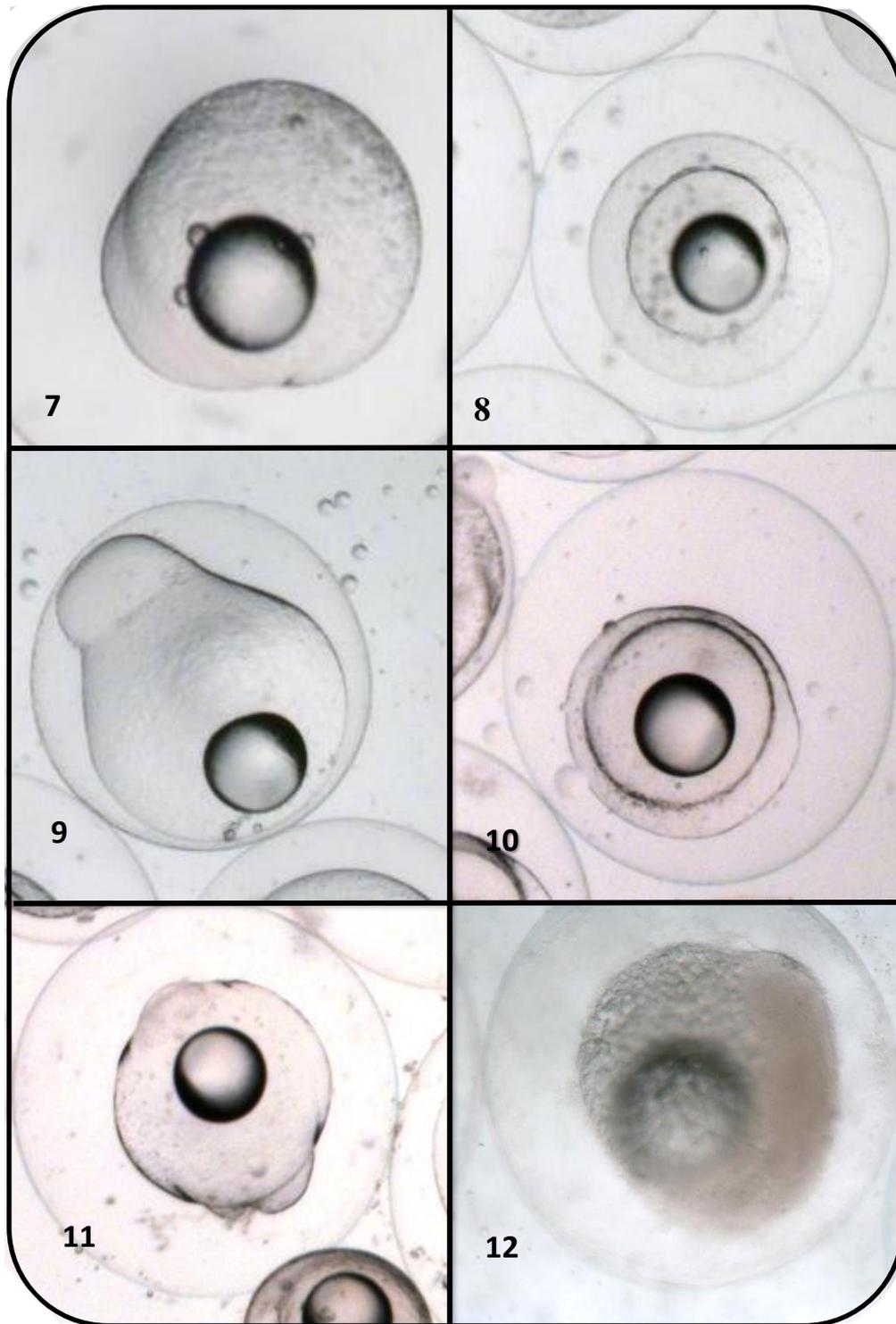
## RESULTADOS

La segmentación, con aparición de somitas y notocorda claramente visible, se observó a las 30 h.p.f (Fig. 18: 13, hembra 5.1). A las 35 h.p.f, el embrión presentaba una segmentación más completa, y la cola parcialmente libre (Fig. 18: 14, hembra 6.2). En una hembra (5.1), se observaron latidos del corazón justo tras la eclosión, 42 h.p.f. (hembra 5.2). Sin embargo, en los embriones de la puesta 6.1, se apreció latido del corazón 2 h 30' antes de la eclosión, al mismo tiempo que los embriones comenzaban a vibrar. Las vibraciones de los embriones comenzaron 3 h 44' antes de la eclosión, y se volvieron más frecuentes desde 2 h 40' antes de la eclosión.

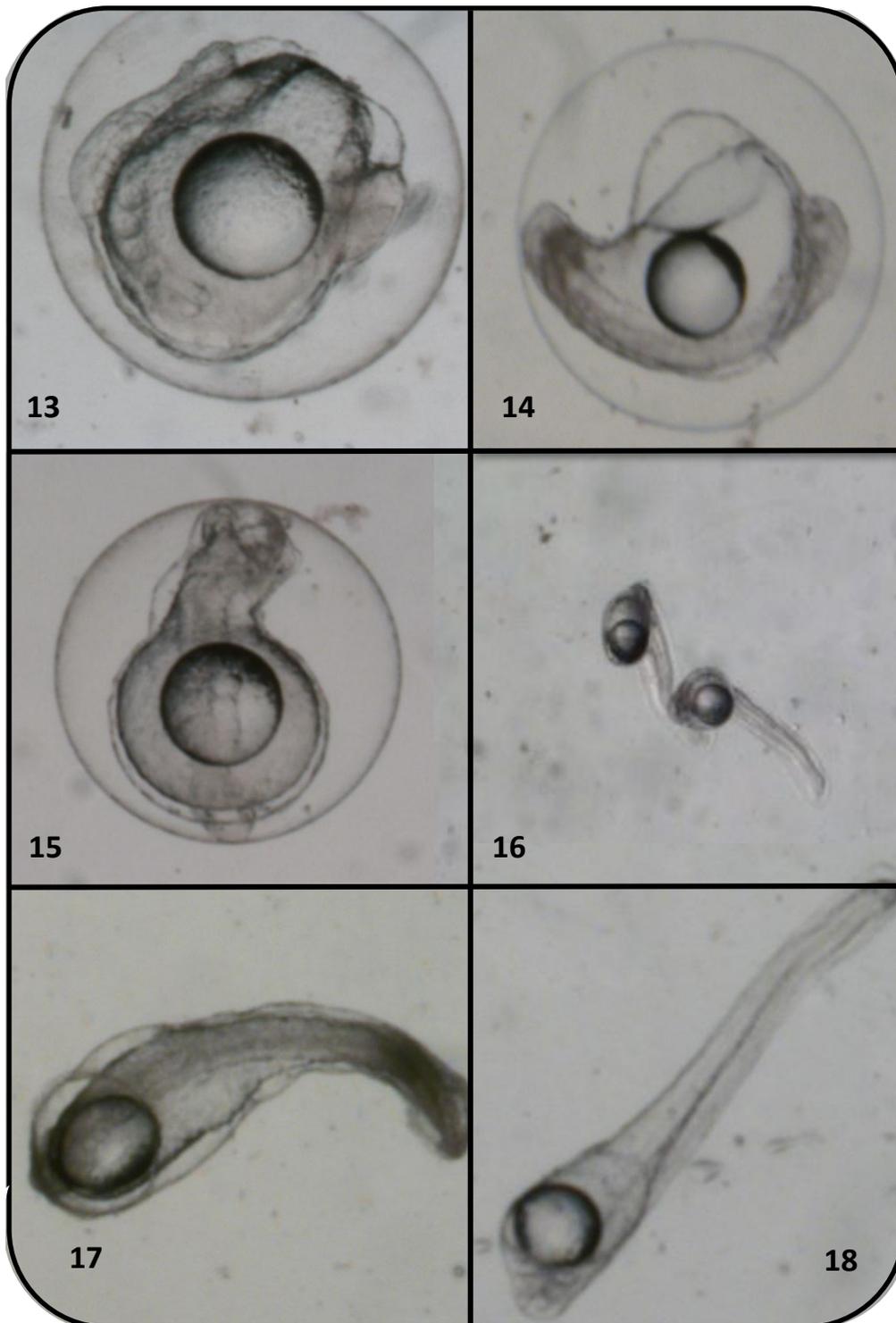
El momento de eclosión de las larvas no pudo observarse en la puesta 4.1, ya que habían muerto unas horas antes de su observación, a las 62 h.p.f. En las otras 3 puestas que originaron larvas, la eclosión se produjo a las 42 h.p.f. (hembra 5.2, a 22°C), y a las 37-38 h (hembras 6.1, 6.2, a 22°C).



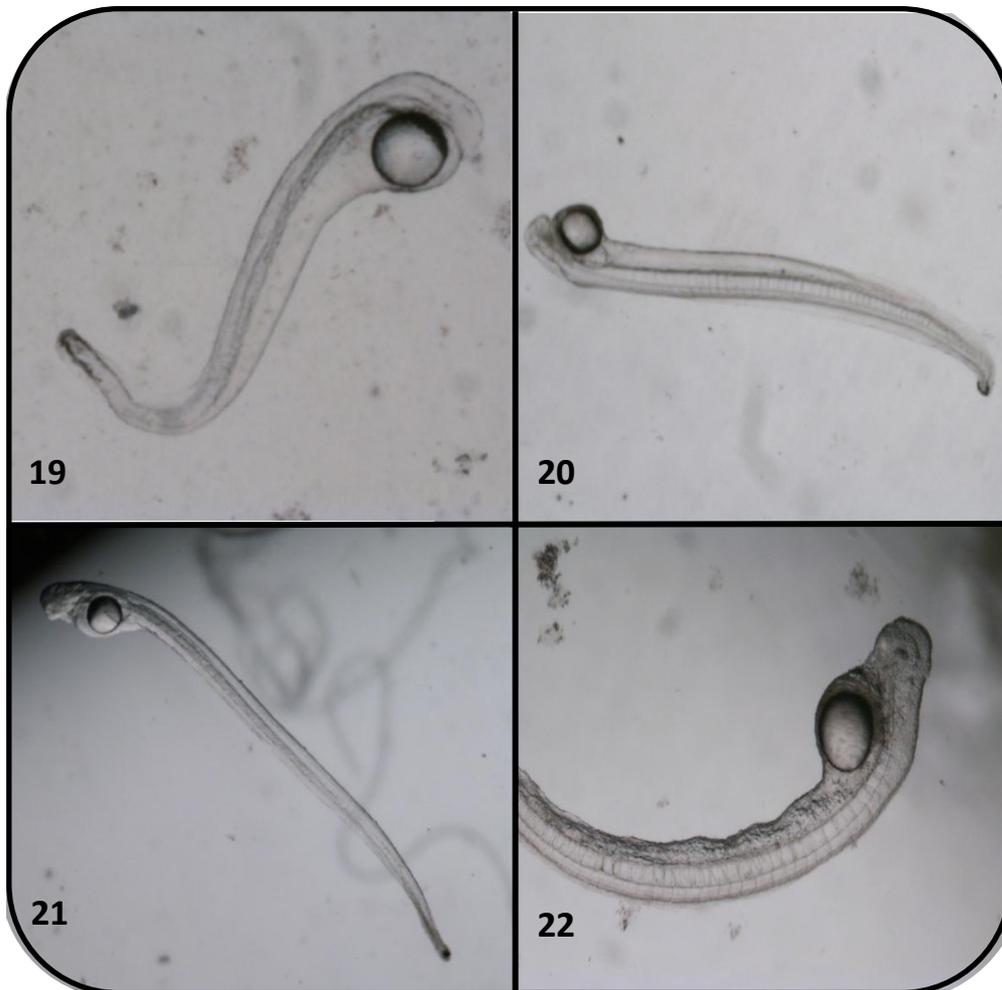
**Fig. 18** (1): estado de 4 células (hembra 2.1, 5 h.p.f., 18°C). (2): estado 4 células, vista lateral (hembra 1, 5h 30' p.f. 17°C). (3): estado de 8 células (hembra 1, 6h 21' p.f. 19°C). (4): estado 16 células (hembra 1, 4h 17' p.f. 17°C). (5): mórula de células grandes, 5 h 52 p.f. (hembra 3.1, 20°C). (6): mórula oblonga, 6 h 12 p.f., (hembra 3.1, 20°C).



**Fig. 18:** (7): blástula, vista lateral, 6 h 14' p.f. (hembra 3.1, 20°C), (8): blástula, vista dorsal, 6 h 46' p.f. (hembra 1, 19°C), (9): blástula, vista lateral, 6 h 46' p.f. (hembra 1, 19°C) (10): inicio gastrulación, 6 h 37' p.f. (hembra 2.1, 21°C), (11): gastrulación, anillo germinal, 6 h 37' p.f. , (hembra 2.1, 21°C) (12): gastrulación, anillo germinal, 13 h 04' p.f. (hembra 4.2, 18°C).



**Fig. 18:** (13): estado de segmentación, 30 h 15' p.f. (hembra 5.1, 20°C), (14): embrión, , 35 h 21' p.f.( hembra 6.2, 22°C), (15): embrión, 35 h 08' p.f., (hembra 5.1, 20°C), (16): justo tras eclosión, 38 h 16' p.f (hembra 6.1, 22°C),., (17): larva, 3 h post-eclosión (hembra 6.1, 22°C), (18): larva 5 h post-eclosión, (hembra 6.1, 22°C).



**Fig. 18:** (19): larva 21 h 15' post-eclosión, (20): larva 49 h 45' post-eclosión, (21): larva 74 h 20' post-eclosión, (22): larva de 96 h, muerta.

#### **4.10. Larvas obtenidas**

En la puesta 4.1 (grupo VAR), que se observó a las 62 h.p.f. los embriones y larvas habían muerto en el momento de su observación; se pudieron ver en total 12 larvas que habían eclosionado, y otras 7 que habían muerto antes de la eclosión. Se examinó un gran número de muestras, y se observó aproximadamente una larva por cada 200 oocitos examinados, lo que supondría un % de eclosión de aproximadamente 0.5 %.

Las larvas se encontraban en el fondo del incubador o de las botellas de incubación. El agua de mar se había renovado a 10 h.p.f. a 13 h 30 p.f., y a 34 h.p.f. Posiblemente habría hecho falta una renovación de agua mar más frecuente.

En la puesta 5.2 (grupo VAR) se observó la eclosión de unas 7 larvas 42 h. post-fecundación, aunque no se realizó un muestreo exhaustivo. En este caso se había renovado el agua de un modo más frecuente, con 5 renovaciones hasta el momento de eclosión. Aunque la puesta 5.1 (grupo VAR) se realizó en las mismas condiciones, en la misma noche, el máximo desarrollo observado fue de larvas bien desarrolladas (2 larvas), pero que no llegaron a eclosionar.

De las últimas 2 puestas (6.1 Y 6.2) se obtuvo un gran número de embriones en estados avanzados que eclosionaron. Tan solo en las botellas de cultivo (donde se habían incubado 3 ml de huevos de cada puesta), se observó un total de 95 larvas eclosionadas de la puesta 6.1 (Fig. 19), y un total de 54 larvas de la puesta 6.2. Aunque la eclosión comenzó a las 37-38 h.p.f, la mayor eclosión se observó a las 40-41 h.p.f. En el momento de la eclosión, las larvas medían 1.45 mm. Un día después de la eclosión (19-20 horas post-eclosión), median 2.5 mm (Fig. 18: 19); dos días tras la eclosión median 3.5 mm (48 h. post eclosión), a los 3 días (96 h) median 4.3 mm (Fig. 18: 21), y habían reabsorbido gran parte de su saco vitelino. Desde la eclosión se produjo una gran mortalidad, ya que a las 24 tras eclosión sólo 46 larvas (12 de la puesta 6.2, 24 de la puesta 6.1) seguían vivas (11 %), a las 48 h sólo vivían 5 (3.3 %), y a las 96 h solo 2 habían sobrevivido (1.3 %).



**Fig. 19:** Larvas de la puesta 6.1.

### 5. DISCUSIÓN

Está bien documentado que la temperatura puede tener un profundo impacto en diversos aspectos de la reproducción de los peces, ya que puede afectar a los niveles de hormonas durante el ciclo reproductivo (Pankhurst *et al.* 1996; van der Kraak, Pankhurst y 1996; Suquet *et al.* 2005). Las perturbaciones térmicas experimentadas por los reproductores durante su ciclo reproductor pueden conducir a futuras anomalías en características reproductivas como la fertilidad, la fecundidad y la calidad de los huevos, así como en el desarrollo gonadal (Brown *et al.* 1995). Diversos estudios han demostrado que la maduración final de ovocitos, la ovulación y el momento del desove de los peces teleósteos cautivos eran particularmente sensibles a cambios de temperatura (Gillet 1991; Taranger y Hansen 1993; Van der Kraak Pankhurst y 1996; Tveiten *et al.* 2000).

En este trabajo se aplicaron diferentes regímenes térmicos desde el estado de previtelogénesis, al inicio, hasta el estado de vitelogénesis media. En la semana 12 de tratamiento hormonal, cuando finalizaron los 2 tratamientos térmicos, todas las hembras de ambos grupos que fueron sacrificadas se encontraban en fase de vitelogénesis media, sin diferencias significativas en el IGS (media  $8.5 \pm 2$ ) o en el diámetro de los oocitos (media  $341 \pm 27$   $\mu\text{m}$ ).

#### *Tiempo de maduración y ovulación*

En este trabajo se ha observado que el mantenimiento a temperatura constante de 15°C no incrementa la velocidad de desarrollo hasta alcanzar el estado de vitelogénesis media (semana 12, datos no mostrados), pero sin embargo, generó un adelanto en el momento de la puesta, respecto a las hembras que se sometieron a variaciones entre 10-15°C en el mismo período. Es decir, que la velocidad de desarrollo es similar en ambos regímenes hasta alcanzar cierto estado (vitelogénesis media), a partir del cual la temperatura más alta genera una mayor velocidad de desarrollo, es decir, una progresión más rápida hacia la maduración final de los oocitos. En trabajos previos también hemos observado que la progresión hasta el estado de vitelogénesis media es similar a temperaturas de 15 y 18-20 °C (Pérez *et al.*, 2011, Mazzeo *et al.*, en revisión), pero a partir de esta etapa, las temperaturas más altas causan una aceleración en el desarrollo sexual de hembras de anguila. Los resultados del presente trabajo apoyan la hipótesis de que la temperatura afecta de un modo diferente en función del estado de desarrollo sexual de las hembras. Las menores temperaturas experimentadas por el grupo VAR no retrasan el desarrollo hasta vitelogénesis media, pero si retrasan la llegada de la

maduración final y ovulación. La temperatura podría usarse como modulador de la maduración sexual de las hembras en condiciones de laboratorio o hatcheries, por ejemplo, para producir puestas de una forma escalonada, evitando así acumulación de un gran número de puestas al mismo tiempo, y facilitando así el manejo de las mismas.

El tiempo medio hasta alcanzar la ovulación en el presente experimento fue de 18,7 y 21,8 semanas, en los grupos CTE y VAR, respectivamente. Nuestros resultados confirman los de Palstra *et al.* (2005), de que la anguila europea muestra una amplia variabilidad individual y una respuesta mucho más lenta a la estimulación hormonal, frente a la anguila japonesa. Sin embargo, hay que destacar que la anguila japonesa se madura a mayor temperatura, 20 °C, al igual que la anguila europea. Es decir, que en condiciones de maduración a temperatura alta y constante, las puestas de anguila europea se producen tras 10-11 semanas de tratamiento hormonal (Pérez *et al.*, 2008), mientras que cuando se maduran con regímenes variables de temperatura que comienzan con temperaturas bajas (este experimento, Pérez *et al.*, 2011), la ovulación se produce a partir de 16-17 semanas de tratamiento.

#### *Incremento de peso anterior a las puestas*

En estudios previos (Ohta *et al.*, 2003, Tanaka *et al.*, 2003) se ha considerado que un incremento de peso (respecto al inicio del tratamiento hormonal) del 110 % o mayor era adecuado para inducir la puesta de las hembras de anguila. En el presente experimento, este incremento de peso fue en muchos casos inferior al 110 %, y en el caso de las hembras que originaron mayor número de larvas, su incremento de peso fue menor al 100 % respecto al inicio. Estas hembras habían madurado al cabo de 23 semanas de tratamiento, durante las cuales no se alimentaron, mientras que la anguila japonesa madura en un periodo muy inferior, entre 10-11 semanas, por lo que la pérdida de peso debida al ayuno es inferior, y por tanto, el incremento de peso observado durante la maduración final es mayor. Dada la calidad de las puestas obtenida de hembras que no habían incrementado su peso desde el inicio, consideramos que, en la anguila europea, un criterio más fiable para la inducción de la puesta debe basarse en el incremento de peso respecto a la semana previa (entre 101 y 120 % en las mejores puestas) y no frente al inicio del experimento. También son útiles como indicadores los incrementos de peso en la última semana, es decir, el incremento de peso entre la inyección semanal de CPE y la prime dose (110 % de media), o la variación desde la PD hasta la inyección de DHP (106 % de media).

## DISCUSIÓN

### *Tiempo de latencia tras la inyección de DHP*

El tiempo de latencia, es decir, el tiempo que transcurre entre la inyección de DHP y la respuesta ovulatoria, fue de 12-14 horas en todas las puestas, a excepción de las puestas 1 y 5.2 que se produjeron 15:30 y 17 horas respectivamente tras la inyección de DHP. En esta última hembra, 5.2, el estado de desarrollo de los oocitos en el momento de la inyección DHP fue algo más temprano de lo habitual, lo que explicaría el retraso en el tiempo de puesta de esta hembra en comparación a las demás.

Además, pese a que el tiempo de latencia no se vio afectado por el tratamiento térmico, si se observó un efecto en la presencia o no de los machos en el mismo. En este trabajo se ha comprobado que una presencia abundante de machos (30 machos), da lugar a una respuesta más temprana (12h) que una presencia menor (5 machos), la cual resultó más tardía (15h).

Esta diferencia entre la presencia abundante o no de machos, también fue observada en el proceso de puesta, ya que como ya se ha mencionado en los resultados la presencia abundante de machos (30 aproximadamente) da lugar a puestas espontáneas, en los que no hacía falta recurrir al masaje abdominal para la expulsión de los huevos.

Es muy probable que el efecto de la presencia de machos en la ovulación se deba a la liberación de feromonas por parte de estos, ya que en otras especies se ha comprobado que las feromonas juegan un papel esencial en la sincronización de las puestas de machos y hembras. En el arenque, por ejemplo, se ha demostrado que una feromona presente en el esperma inducía la puesta de las hembras (Carolsfeld *et al.* 1997).

### *Flotabilidad y porcentaje de fecundación*

Los huevos pelágicos de peces flotan en el agua de mar debido a su elevada cantidad de agua. Así, mientras que los huevos demersales tienen contenidos en agua de 60-70 %, los huevos pelágicos de especies marinas tienen un contenido de agua muy elevado (cerca de 92%), y un contenido de lípidos de 10-17 % del peso seco. Cerca del 90 % de la flotabilidad de estos huevos en el agua de mar se debe al contenido acuoso, y solo un 10 % al contenido lipídico (Craik & Harvey, 1987). El elevado contenido en agua de los huevos pelágicos se debe a una entrada masiva de agua en el interior de los oocitos durante la maduración meiótica que se produce tras la vitelogénesis y antes de la ovulación. La entrada de agua (hidratación del huevo) se debe fundamentalmente al incremento de aminoácidos libres generados por la

ruptura proteolítica parcial de proteínas derivadas de la vitelogenina (revisado por Babin *et al.*, 2007).

La flotabilidad de los huevos se ha empleado tradicionalmente como un indicador de calidad en los huevos de diversas especies marinas pelágicas, incluyendo la anguila japonesa (Seoka *et al.*, 2003). Se ha comprobado que el porcentaje de huevos flotantes, medidos varias horas tras la fecundación, se correlaciona positivamente con la tasa de eclosión de los huevos. Esto se debe a que los huevos no fecundados y los huevos fecundados que han cesado su desarrollo pierden su flotabilidad tras un tiempo.

En el presente estudio se observó una mayor flotabilidad (medida inmediatamente tras fecundación) en los huevos procedentes de hembras del régimen VAR, a pesar de que todos ellos se incubaron en las mismas condiciones de salinidad (36 g/l). Además, el grupo VAR, mostró un mayor incremento en el diámetro de los oocitos previo a la ovulación, calculado entre el momento de dosis de CPE2 y DHP, lo que sugiere una mayor hidratación de los oocitos del grupo VAR previa a la puesta. Esto podría deberse a un efecto de los regímenes térmicos en alguno de los procesos que afectan a la hidratación, es decir, a diferencias en la proteólisis de componentes del vitelo, que causa el gradiente osmótico favorable a la entrada de agua, o bien a diferencias en la membrana externa del huevo o corion, implicada en la regulación osmótica del mismo. Esto concuerda con Unuma *et al.* (2005) en anguila japonesa, quienes sugieren que el hundimiento de los oocitos tras la fecundación artificial puede deberse a fallos en la maduración final o bien a la incapacidad de osmoregulación de los huevos.

Cabe destacar que, en cualquier caso, la flotabilidad fue elevada en ambos grupos, ya que todas las puestas (excepto las que se evaluaron de forma tardía, con la mayor parte de la puesta liberada en el tanque) presentaron una flotabilidad superior al 60 %. En experimentos previos, con diferentes protocolos de maduración final, y temperatura constante de 20°C durante toda la maduración, solo se obtuvieron huevos flotantes en un 40-50 % de las puestas (Pérez, datos no publicados), mientras que en el resto de puestas, los oocitos caían inmediatamente al fondo del recipiente tras la fecundación. Así pues, el protocolo empleado para la maduración final permite obtener una elevada calidad de las puestas, ya que reduce el número de hembras que sufren una sobremaduración de los huevos.

La tasa de fecundación osciló entre el 70 y el 98% de forma general, siendo la puesta con mayor porcentaje de fecundación la correspondiente a la hembra 4.2, perteneciente al

## DISCUSIÓN

grupo VAR. Sin embargo, no hubo diferencias entre tratamientos térmicos en cuanto al porcentaje de fecundación, a pesar de las diferencias encontradas en flotabilidad. Esto puede deberse a que la tasa de fecundación se midió únicamente en muestras de los huevos flotantes al cabo de 4-6 h.p.f. Es posible que si la tasa de fecundación se hubiera medido sobre todos los oocitos presentes a 4 h.p.f., y no sólo sobre los flotantes, se hubiera observado en conjunto una mayor tasa de fecundación en las puestas del grupo VAR.

### *Estados de desarrollo máximo alcanzados en los embriones*

Como se puede observar en los resultados obtenidos en la tabla 2, no existe una relación directa entre la tasa de fecundación y el estado de desarrollo máximo alcanzado. Es decir, que hembras con una mayor tasa de fecundación alcanzaron un menor desarrollo embrionario que otras hembras con un menor ratio de fecundación, realizándose la puesta bajo las mismas condiciones (por ejemplo en las puestas 4 y 6).

Sin embargo, sí parece existir una relación entre el estado máximo de desarrollo alcanzado y el hecho de haber modificado la temperatura de incubación en las primeras 4 horas pos-fecundación. Si se compara el estado de desarrollo alcanzado por las hembras del grupo CTE, se puede observar que la hembra con un mayor grado de desarrollo embrionario (5.1), corresponde a la hembra cuya temperatura de fecundación e incubación fue la misma (20°C). Asimismo, en el grupo VAR, todas las puestas que estuvieron bajo las mismas condiciones térmicas en las primeras 4 h.p.f desarrollaron larvas, mientras que en un caso, donde la temperatura se incrementó 1.5°C (puesta 4.2), el desarrollo máximo fue hasta neurula (final de gastrulación). Asimismo, una excepción fue la puesta 3.1 (grupo CTE), que, aunque no experimentó cambios de temperatura, únicamente originó un desarrollo hasta estado de gástrula. Hay que destacar que esta puesta se produjo parcialmente en el tanque, de modo que solo pudo obtenerse una pequeña porción de los huevos liberados, con baja flotabilidad, lo que habría afectado a su calidad. Así, nuestros resultados sugieren que es necesario mantener las puestas, al menos durante las 4-5 primeras horas de incubación sin modificar la temperatura, y con la mínima manipulación posible.

En nuestro estudio, cuatro de las cinco hembras del grupo VAR dieron lugar a larvas eclosionadas, en comparación con el grupo CTE del cual únicamente una de las puestas originó larvas, pero que no llegaron a eclosionar. El hecho de que 3 de las 5 puestas estudiadas del grupo CTE se incubaran en condiciones diferentes (modificando la temperatura en las primeras

horas pos-fecundación) impide diferenciar entre el efecto debido al régimen térmico y el efecto debido a las condiciones de incubación.

Respecto a la velocidad del desarrollo embrionario, es bien conocido que su velocidad se encuentra directamente relacionada con la temperatura de incubación. En el presente estudio se observó la eclosión de las larvas a las 38-42 h.p.f, tras incubación a 22 °C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en anguila japonesa (Anh *et al.*, 2012), donde la eclosión a 22 °C se producía tras 35-43 h.p.f. Esto parece indicar que ambas especies presentan una velocidad de desarrollo embrionario similar.

#### *Método de maduración final*

##### *Incremento de temperatura*

El método empleado durante la maduración final de la anguila incluyó el paso desde una temperatura de 18°C a 20°C en el momento de la última inyección de MIS, para inducir la puesta. Este método para la maduración final ya se había empleado en numerosas ocasiones para inducir la puesta de la anguila japonesa (incremento de temperatura en 2°C, Ohta *et al.*, 1996, Yokishawa, 2012), y fue usado previamente por Palstra *et al.* (2005) en anguila europea. En un estudio en anguila japonesa se comparó la calidad de las puestas obtenidas tras incrementos finales de temperatura de 0°C (18-18°C), 4°C (18-22°C), 9°C (18-27°C), y -4°C (18-14°C), y sólo se obtuvieron puestas en el rango de temperaturas entre 18 y 22°C, siendo el porcentaje de puestas inferior a 18°C, cuando no se había incrementado la temperatura (Yokishawa, 2012). Así pues, el método empleado, de mantenimiento de las hembras a 18°C y subida posterior de 2 °C, parece adecuado para la inducción de la puesta, que se produjo en el 100 % de las hembras del presente experimento.

##### *Utilización de machos en la maduración final*

La estabulación con machos durante la maduración final parece que es la práctica habitual en la maduración de anguila japonesa (Kagawa *et al.*, 2013). De hecho, al método de inducción a la puesta que se basa en la elevación 2 °C de temperatura, y estabulación con machos espermiantes al mismo tiempo, se le denomina “spontaneous spawning method”, o *método de puesta espontánea*, frente al método denominado “stripping-insemination method”, o *método de masaje abdominal y fecundación*, donde no se eleva la temperatura y

## DISCUSIÓN

las hembras no se establecen con machos (Horie *et al.*, 2008). Horie *et al.* (2008) demostró que la tasa de fecundación, eclosión, y supervivencia larvaria a los 5 días, eran mayores en los huevos procedentes de anguila japonesa tratada con el *método de puesta espontánea* frente al *método de masaje abdominal y fecundación*. No existen trabajos, sin embargo, que diferencien el efecto debido a la presencia de machos con el efecto debido al incremento en 2°C la temperatura. En el presente estudio, la puesta 1 (grupo CTE) se realizó en ausencia de machos, y las puestas 2.1 y 2.2 (grupo CTE), con sólo 5 machos espermiantes. El resto de puestas se realizaron con 30 machos, de los cuales aproximadamente 15 producían esperma. La presencia de una mayor cantidad de machos redujo el tiempo de respuesta al DHP (15 h 30' sin machos, 14 h 25' con 5 machos, y 12 h de media en las puestas con 30 machos). Sin embargo, no parecía existir un efecto de la presencia de machos en la tasa de fecundación observada, aunque todas las puestas que originaron larvas habían contado con la presencia de machos. Al igual que ocurría con el incremento de temperatura en la incubación, es muy posible que este factor haya influido en la calidad de las puestas. Puesto que 3 de las 5 puestas del grupo CTE se realizaron sin/con pocos machos, esto dificulta la valoración del efecto de los 2 tratamientos térmicos en la calidad de las puestas.

Es bien sabido que la inyección de DHP es un método eficaz para la inducción de la ovulación en la anguila japonesa (Ohta *et al.* 1996, 1997; Kagawa *et al.* 1997; Tanaka *et al.* 2000; Kagawa 2003). Sin embargo, no se ha estudiado el efecto superpuesto que tiene el incremento de temperatura de 2°C simultáneo a la aplicación de la inyección de DHP. Sería interesante estudiar, a nivel hormonal y fisiológico, el efecto del incremento de la temperatura sobre la acción de esta hormona en la ovulación.

Sin embargo, para reforzar la idea de una posible diferencia en cuanto a la calidad de las puestas entre un tratamiento térmico u otro, sería conveniente realizar análisis de esteroides en plasma sanguíneo, ya que se ha demostrado que la temperatura elevada actúa sobre el folículo ovárico, produciendo una reducción de la síntesis de estradiol (E2), lo que afecta negativamente a la vitelogénesis del huevo (Watts *et al.*, 2004).

En resumen, se ha comprobado que el régimen térmico afecta al tiempo necesario para que se produzca la ovulación y a la flotabilidad de las puestas. Sería necesario realizar un experimento similar intentando mantener constante las condiciones de la maduración final (presencia de machos), así como las condiciones de incubación, para poder confirmar un efecto positivo de la aplicación de regímenes de temperatura variables sobre la calidad de las puestas



## 6. CONCLUSIONES

- ✓ El mantenimiento de hembras de anguila a temperatura constante de 15°C durante la vitelogénesis genera un adelanto en el momento de la puesta respecto a hembras sometidas a variaciones de temperatura entre 10-15°C en el mismo período.
- ✓ En el caso de la anguila europea un criterio fiable para la inducción de la puesta debe basarse en el incremento de peso respecto a la semana previa a la ovulación, antes que en el incremento de peso con respecto al peso al inicio del tratamiento hormonal.
- ✓ La presencia abundante de machos junto con las hembras, en las 12h previas a la puesta reduce el tiempo de respuesta ovulatoria de las hembras de anguila a la inyección del esteroide inductor de la maduración DHP.
- ✓ Es recomendable no modificar la temperatura del agua de incubación durante las 4-5 primeras horas post-fecundación, para obtener el máximo desarrollo embrionario.
- ✓ El tratamiento térmico con variaciones semanales de temperatura originó una mejor calidad de las puestas, en cuanto al porcentaje de flotabilidad de las mismas.



**BIBLIOGRAFÍA**

- Aarestrup, K., Økland, F., Hansen, M.M., Righton, D., Gargan, P., Castonguay, M., Bernatchez, L., Howey, P., Sparholt, H., Pedersen, M.I., McKinley, R.S. (2009). Oceanic spawning migration of the European Eel (*Anguilla anguilla*). *Science* 325: 1660.
- Asturiano, J. F., Pérez, L., Tomás, A., Zegrari, S., Espinós, F. J., Jover, M. (2002). Inducción hormonal de la maduración gonadal y la puesta en hembras de anguila europea *Anguilla anguilla* L., 1758: cambios morfológicos y desarrollo oocitario. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 18 (1-4): 127-137.
- Arai T, Otake T, Tsukamoto K. (2000). Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels, *Anguilla rostrata* and *A. anguilla*, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. *Marine Biology* 137:39–45.
- Bast H. D., Klinkhardt M. B., (1988). Catch of a silver eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) in the Iberian Basin (Northeast Atlantic) (Teleostei: Anguillidae). *Zoologischer Anzeiger* 221: 386–398.
- Bobe J., Labbé C., (2009). Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*. In press.
- Boëtius, I. & Boëtius, J., (1967). Studies in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.) Experimental induction of the male sexual cycle, its relation to temperature and other factors. *Meddelelser fra Danmarks Fiskeri-Og Havundersogelser* 4 (11): 339-405.
- Boëtius, I., Boëtius, J., (1980). Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1: 1-28.
- Bordajandi, L. R., Gómez, G., Fernández, M. A., Abad, E., Rivera, J., González, M. J. (2003). Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). *Chemosphere*, 53 (2): 163-171.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J.R.C., Duston, J., Barker, G., 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100, 141–166.
- Bromage, N., Porter, M., Randal, C., (2001). The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin, *Aquaculture* 197: 63–98.
- Brooks, S., Tyler, C.R. and Sumpter, J.P. (1997) Egg quality in fish: what makes a good egg? *Rev. Fish Biol. Fish.* **7**, 387–416.
- Brown NP, Bromage NR, Shields RJ (1995) The effect of temperature on egg viability in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). In: Goetz FW, Thomas P (eds) Proceedings of the 5th international symposium on reproductive physiology of fish, Austin, 1995.
- Carnevali, O., R. Carletta, A. Cambi, A. Vita y N. Bromage. 1999a. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: involvement of two lysosomal proteinases. *Biol. Reprod.* 60: 140-146.
- Carnevali, O., S. Centonze, S. Brooks, I. Marota y J. P. Sumpter. 1999b. Molecular cloning and expression of ovarian cathepsin D in seabream, *Sparus aurata*. *Biol. Reprod.* 61: 785-791.
- Carolsfeld, J., Tester, M., Kreiberg, H., and Sherwood, N. M. (1997). Pheromone-induced spawning of Pacific herring. 1. Behavioral characterization. *Hormones and Behavior*, 31: 256–268.
- Clark, R.W., Henderson-Arzapalo, A. & Sullivan, C.V. (2005). Disparate effects of constant and annually-cycling daylength and water temperature on reproductive migration of striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture* **249**, 497-513.
- Dou, S. Z. *et al.* (2008) Temperature influence on the spawning performance of artificially-matured Japanese eel, *Anguilla japonica*, in captivity. *Environ. Biol. Fish.* **82**, 151–164.

## BIBLIOGRAFÍA

- Durif, C., Dufour, S., & Elie, P. (2005). The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *Journal of Fish Biology* 66: 1025-1043.
- Edwing, W., Mc Whorter, A., Escobar, M. and Lubin, A. (1965) : *Edwardsiella*, a new genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. *Int. Bull. bact. Nomencl. Taxon.*, 15, 33-38.
- Elvira, B. (1991). La anguilla pide paso. *Quercus*, 63: 31-35.
- FAO. Estadísticas de Acuicultura y Pesca, <http://www.fao.org>
- Fonds, M., (1979). Laboratory observations on the influence of temperature and salinity on development of the eggs and growth of the larvae of *Solea solea (Pisces)*. *Mar. Ecol. Prog., Ser.* 1: 91-99.
- Fauvel, C., Omnès, M.-H., Suquet, M., Normant, Y., 1993. Reliable assessment of overripening in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a simple pH measurement. *Aquaculture* 117, 107–113.
- Fricke H., Kaese R. (1995). Tracking of artificially matured eels (*Anguilla anguilla*) in the Sargasso Sea and the problem of the Eel's Spawning Site. *Naturwissenschaften* 82: 32– 36.
- García-López, A., Pascual, E., Sarasquete, C. & Martínez-Rodríguez, G. (2006). Disruption of gonadal maturation in cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) by continuous light and/or constant temperature regimes. *Aquaculture* 261: 789–798.
- Gillet, C., 1991. Egg production in an Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) brood stock: effects of temperature on the timing of spawning and the quality of eggs. *Aquat. Living Resour.* 4, 109–116.
- Horie, N., Utoh, T., Mikawa, N., Yamada, Y., Okamura, A., Tanaka, S., Tsukamoto, K., (2008). Influence of artificial fertilization methods of the hormone-treated Japanese eel *Anguilla japonica* upon the quality of eggs and larvae: comparison between stripping-

- insemination and spontaneous spawning methods (in Japanese). *Nippon Suisan Gakkaishi* 74, 26–35.
- ICES, International Council for the Exploration of the Sea (2001). ICES Cooperative Research Report, Nº 246.
  - Jellyman D, Tsukamoto K (2010) Vertical migrations may control maturation in migrating female *Anguilla dieffenbachii*. *Marine Ecology Progress Series* 404: 241–247.
  - King H.R, Pankhurst N. W., Watts M., (2007) Reproductive sensitivity to elevated water temperatures in female Atlantic salmon is heightened at certain stages of vitellogenesis. *Journal of Fish Biology*: 70, 190–205
  - Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Okuzawa, K., Inuma, N., (1997). Induced ovulation of 17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the artificially matured Japanese eel, with special reference to ovulation time. *Fisheries Science* 63, 365–367.
  - Kagawa, H., (2003). Artificial induction of oocyte maturation and ovulation. In: Aida, K., Tsukamoto, K., Yamauchi, Y. (Eds.), *Eel Biology*. Springer, Tokyo, pp. 401–414.
  - Kleckner R.C. et McCleave J.D., (1985). Spatial and temporal distribution of American eel larvae in relation to North Atlantic Ocean current system. *Dana*, 4: 67-92.
  - Kjorsvik, E., Mangor-Jensen, A. & Holmefjord, I. (1990). Egg quality in fishes. *Advances in Marine Biology* 26, 71–113.
  - LaFleur, G. J., Jr., B. M. Byrne, C. Haux, R. M. Greenberg y R. A. Wallace. (1995). Liver-derived cDNAs: vitellogenin and vitelline envelope protein precursors (choriogenins). En: *Proceedings of the 5th International Symposium of Reproductive Physiology of Fish* (2-8 de julio, 1995. Austin, Texas, EE UU). F. W. Goetz y P. Thomas (eds.): 336-338. University of Texas. Austin (Texas), EE UU.
  - Lee, B. H., E. H. Lim, T. J. Lam y J. L. Ding. (1994) vitellogenin cDNA clones from *Oreochromis aureus* (Steindacher). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34: 75-83.

## BIBLIOGRAFÍA

- Liu, W.H., Stickney, R.R. and Smith, S.D., (1991). A note on the artificial spawning of Pacific halibut. *Prog Fish-Cult.*, 53: 189-192.
- Lobón-Cerviá, J. (1991). La extinción de la anguila o el paradigma de la calamidad. *Quercus*, 63: 36-37.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., Patzer, R.A., 2007. Distribution of lipid droplets is an indicator of egg quality in brown trout, *Salmo trutta fario*. *Aquaculture* 273, 744–747.
- Manabe, R., Aoyama, J., Watanabe, K., Kawai, M., Miller, M.J., Tsukamoto, K. (2011). First observations of the oceanic migration of Japanese eel, from pop-up archival transmitting tags. *Marine Ecology Progress Series* 437: 229-240.
- Mariottini Y, De Wysiecki ML, Lange, CE. (2006). Desarrollo postembrionario de *Ronderosia bergi* (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae) bajo condiciones controladas. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 65 (1-2), 81-85
- Mazzeo, I., Peñaranda, D.S., Gallego, V., Baloché, S., Nourizadeh-Lillabadi, R., Tveiten, H., Dufour, S., Asturiano, J.F., Weltzien, F.-A., Pérez. L. Effect of thermal regime on the expression of key reproductive genes during hormonally-induced vitellogenesis in the European eel: effects in liver and ovary. En preparación.
- Lecomte-Finiger, R. (1994). Les stades larvaires (leptocéphales et civelles) de l'anguille uropéenne: migrations et métamorphose. *Année Biologique* 33: 1–17.
- Matsubara, T., N. Ohkubo, T. Andoh, C. V. Sullivan y A. Hara. (1999). Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev. Biol.* 213: 18-32.
- Mikawa, N., Horie, N., Yamada, Y., Utoh, T., Okamura, A., Tanaka, S., Tsukamoto, K (2008). Maturation induction in the female Japanese eel without treatment and improvement of the fertilization protocol. *World Aquaculture, Busan (Korea)*. Book of abstracts.

- Modig, C., Modesto, T., Canario, A., Cerda, J., von Hofsten, J., Olsson, P.-E. (2006). Molecular characterization and expression pattern of zona pellucida proteins in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Biology of Reproduction* 75: 717–725.
- Nielsen, S. y P. Agre. (1995). The aquaporin family of water channels in kidney. *Kidney Int.* 48: 1057-1068.
- Ohta, H., <, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Hirose, K., (1996). Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17,20h-dihydroxy-4- pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla Japonica*. *Aquaculture* 139: 291– 301.
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Iinuma, N., Hirose, K., (1997). Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla Japonica*. *Fish Physiology and Biochemistry* 17: 163– 169.
- Oka, H.P., 1979. Studies on the artificial maturation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*-III. On the relation between the changes in body weight and the oogenesis during the course of maturation. *Bulletin of Shizuoka Prefecture Fisheries Experiment Station* 13, 101–111 (in Japanese with English summary).
- Palstra . A.P., van Ginneken, V., Murk A.J., van den Thillart, G. (2006). Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? *Naturwissenschaften* DOI 10.1007/s00114-005-0080-z
- Palstra, A.P., van Ginneken, V., van den Thillart, G. (2005). Artificial reproduction of the European silver eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 249: 533-547.
- Pedersen, B.H. (2003). Induced sexual maturation of the European eel (*Anguilla anguilla*) and fertilisation of the eggs. *Aquaculture* 224: 323–338.
- Pedersen, B.H. (2004). Fertilisation of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 237: 461–473.

## BIBLIOGRAFÍA

- Peñaranda, D.S., Pérez, L., Gallego, V., Barrera, R., Jover, M., Asturiano, J.F. (2010). European eel sperm diluent for short-term storage. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 407-415.
- Pérez, L., J.F. Asturiano, A. Tomás, S. Zegrari, R. Barrera, F.J. Espinós, J.C. Navarro y M. Jover. (2000). Induction of spermiation in the male European eel: assesment of sperm quality throughout treatment. *Journal of Fish Biology*, 57:1488-1504.
- Pérez, L., Barrera, R., Asturiano., J.F., Jover, M. (2004). Producción de anguilas: pasado, presente y futuro. *Aquatic* 20: 51-78.
- Pérez, L., D.S. Peñaranda., S. Dufour., S. Baloché., A.P. Palstra., G.E.E.j.M Van Den Thillart., J.F. Asturiano. (2011). Influence of temperature regime on endocrine parameters and vitellogenesis during experimental maturation of European eel (*Anguilla anguilla*) females. *General and Comparative Endocrinology* 174: 51-59.
- Polzonetti-Magni A.M., Mosconi G., Soverchia L., Kikuyama S., Carnevali O., (2004) Multihormonal control of vitellogenesis in lower vertebrates, *Int. Rev. Cytol.* 239 1–46.
- Riemann, L., Alfredson, H., Hansen, M., Als, T.D., Nielsen, T.G., Munk, P., Aarestrup, K., Maes, G., Sparholz, H., Petersen, M.I., Bachler, M., Castonguay, M. (2010).Qualitative assesment of the dieto f European eel larvae in the Sargasso Sea resolved by DNA barcoding. *Biology Letters*, Published online.
- Saito, K., Lokman, P.M., Young, G., Ozaki, Y., Matsubara, H., Okumura, H., Kazeto, Y., Yoshiura, Y., Aida, K., Adachi, S., Yamauchi, K., (2003). Follicle-stimulating hormone b, luteinizing hormone b and glycoprotein hormone a subunit mRNA levels in artificially maturing Japanese eel *Anguilla japonica* and naturally maturing New Zealand longfinned eel *Anguilla dieffenbachii*. *Fish. Sci.* 69, 146–153.
- Santos, J.M.; Ferreira, M.T.; Godinho, F.N.; Bochechas, J. (2002). Performance of fish lift recently built at the Touvedo Dam on the Lima River, Portugal. *Journal of Applied Ichthyology*,18(2):118-123.



- Sato, N., Kawazoe, I., Suzuki, Y. & Aida, K., (2006). Effects of temperature on vitellogenesis in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science* 72, 961-966.
- Sarasquete, C., Gutierrez, M. (2005). New tetrachromic VOF stain (Type III-G.S.) for normal and pathological fish tissues. *European Journal of Histochemistry* 49 (2): 211-227.
- Selman, K., R. A. Wallace y J. Cerdà. 2001. Bafilomycin A1 inhibits proteolytic cleavage and hydration but not yolk crystal disassembly and meiosis during maturation of sea bass oocytes. *J. Exp. Zool.* 290: 265-278.
- Selman, K., R. A. Wallace y X. Qi. (1993). Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Morphol.* 218: 203-224.
- Seoka, M., Yamada, S., Iwata, Y., Yanagisawa, T., Nakagawa, T., Kumai, H., (2003). Differences in the biochemical content of buoyant and non-buoyant eggs of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 216, 355–362.
- Schmidt, J., (1922). The breeding places of the eel. *Philosophical Transactions Royal Society of London Series B* 211: 179-208.
- Schmitz, M., Aroua, S., Vidal, B., Le Belle, N., Elie, P., Dufour, S., (2005). Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. *Neuroendocrinology* 81, 107–119.
- Suquet M, Normant Y, Gaignon JL, Quemener L, Fauvel C (2005) Effect of water temperature on individual reproductive activity of pollack (*Pollachius pollachius*). *Aquaculture* 243: 113–120.
- Suetake H., Okubo K., Sato N., Yoshiura Y., Suzuki Y., Aida K., (2002). Differential expression of two gonadotropin (GTH) b subunit genes during ovarian maturation induced by repeated injection of salmon GTH in the Japanese eel *Anguilla japonica*, *Fish. Sci.* 68 290–298.



## BIBLIOGRAFÍA

- Tanaka, H., Ohta, H., Kagawa, H., (2000). Development of techniques for artificial induction of maturation and rearing larvae of Japanese eel. *Nippon Suisan Gakkaishi* 66, 623–626 (in Japanese).
- Tanaka, H., Kagawa, H., Ohta, H., Unuma, T., Nomura, K. (2003). The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry* 28:493-497.
- Taranger, G.L., Hansen, T., (1993). Ovulation and egg survival following exposure of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodstock to different water temperatures. *Aquacult. Fish. Manage.* 24, 151–156.
- Taranger, G.L., Vikingstad, E., Klenke, U., Mayer, I., Stefansson, S.O., Norberg, B., Hansen, T., Zohar, Y., Andersson, E., (2003). Effects of photoperiod temperature and GnRHa treatment on the reproductive physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) broodstock. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 403–406.
- Tesch F.W., (1978). Telemetric observations on the spawning migration of the eel (*Anguilla anguilla*) west of the European continental shelf. *Environmental Biology of Fishes* 3: 203–209.
- Tesch F.W., (1989). Changes in swimming depth and direction of silver eels (*Anguilla anguilla* L.) from the continental shelf to the deep sea. *Aquatic Living Resources* 2: 9–20.
- Tveiten, H., Scott, A. P. & Johnsen, H. K. (2000). Plasma-sulfated C21-steroids increase during the periovulatory period in female common wolffish and are influenced by temperature during vitellogenesis. *General and Comparative Endocrinology* 117, 464–473.
- Unuma, T., Kondo, S., Tanaka, H., Kagawa, K., Nomura, K., Ohta, H., (2005). Relationship between egg specific gravity and egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 246, 493–500.



- Van der Kraak, G., Pankhurst, N.W., (1996). Temperature effects on the reproductive performance of fish. In: Wood, C.M., McDonald, D.G. (Eds.), *Global Warming: Implications for freshwater and Marine Fish*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 159–176.
- Van Der Kraak, G. & Pankhurst, N.W. (1997). Temperature effects on the reproductive performance of fish. In *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish*, (Wood, C.M. & McDonald, D.G., eds), *Society for Experimental Biology Seminar Series 61*, 159-176. Cambridge: Cambridge University Press.
- Van Ginneken., V.J.T., Maes, G.E., (2005). The European eel (*Anguilla anguilla*. L), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15: 367–398.
- Wallace, R. A. y K. Selman. (1978). Oogenesis in *Fundulus heteroclitus* I. Preliminary observations on oocyte maturation in vivo and in vitro. *Dev. Biol.* 62: 354-369.
- Wallace, R. A. y K.Selman. 1979. Physiological aspects of oogenesis in two species of sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus* L., and *Apeltes quadracus* (Mitchell). *J. Fish Biol.* 14: 551-564.
- Wallace, R. A., y Selman, K. (1981). The reproductive activity of *Fundulus heteroclitus* females from Woods Hole, Massachusetts, as compared with more southern locations. *Copeia* 1981: 212-214.
- Wallace, R. A. (1985). Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. En: *Developmental Biology*. L. W. Browder (ed.): 127-177. Plenum. Nueva York.
- Watts, M., Pankhurst, N.W. & King, H.R. (2004). Maintenance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) at elevated temperature inhibits cytochrome P450 aromatase activity in isolated ovarian follicles. *General and Comparative Endocrinology* **135**, 381-390.



## BIBLIOGRAFÍA

- Yoshikawa, M. (2012). Improvement in hatching rates in the Japanese eel *Anguilla japonica* by the control of rearing temperatures in the late stage of maturation in the female parents. *Aquaculture* 338–341 (2012) 223–227.

**ANEXOS:**

**ABREVIATURAS USADAS:**

- CPE: carp pituitary extract; extracto de hipófisis de carpa
- DHP: dihidrotestosterona, 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone
- FSH: hormona folículo estimulante
- hCG rec: gonadotropina coriónica humana
- h.p.f.: horas post-fecundación
- LH: hormona luteinizante
- MIS: esteroide inductor de la maduración
- IU: unidades internacionales

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS:

- INTRODUCCIÓN:

**Fig. 1.** Metamorfosis de la anguila europea de izquierda a derecha: A) leptocéfalo, B) anguila sin pigmentar, C) anguila amarilla, D) anguila plateada.....Pág. 3

**Fig. 2.** Esquema del ciclo biológico de la anguila europea. (según proyecto INDICANG, adaptado de Schmidt 1922. Klechner & Mac Cleave, 1985).....Pág. 4

**Fig. 3.** Esquema del protocolo de inducción hormonal de la maduración en machos y hembras de anguila japonesa. (Ohta *et al.*, 1997).....Pág. 6

**Fig.4.** Esquema de la disposición de los blastómeros tras las 5 primeras divisiones (Tomado de Kimmel et al., 1995).....Pág.11
  
- MATERIAL Y MÉTODOS:

**Fig. 5:** Cambios de temperatura semanales en los regímenes térmicos Constante (CTE) y Variable (VAR).....Pág.18

**Fig. 6:** Cambios de temperatura a lo largo del experimento, en los regímenes térmicos Constante (CTE) y Variable (VAR).....Pág.18

**Tabla 1:** Condiciones específicas en las que tuvo lugar cada una de las puestas....Pág.22

**Fig. 7:** Puesta 1 de régimen CTE, tomada 4h.p.f. A) Huevos no fecundados, B) Huevos fecundado. Objetivo: 1.6x.....Pág.23

**Fig. 8:** Puesta 1 de régimen CTE, tomada 4h.p.f. D1) diámetro del oocito sin espacio perivitelino, D2) diámetro total del huevo. Escala: 900  $\mu\text{m}$ .....Pág.24
  
- RESULTADOS:

**Tabla 2:** Parámetros preovulatorios (Incremento de peso), ovulatorios (tiempo de latencia) y post-fecundación (% de fecundación, estado de desarrollo máximo observado). % Incremento de peso:  $\text{peso final} \times 100 \div \text{peso inicial} - 1$ ..... Pág. 26

**Fig. 9:** Tiempo de aparición de hembras en estado de migración nuclear (MN) y hembras en las que se indujo la ovulación (Ovul), tanto en régimen constante (A), como en variable (B).....Pág. 27

**Fig. 10:** Evolución del peso individual (g) de las hembras que originaron puestas..... Pág. 28

**Fig. 11.** Incremento del peso relativo de las hembras que ovularon. (A): desde la inyección semanal de la semana previa, hasta la inyección semanal en la semana de ovulación (7d). (B): desde la inyección semanal de CPE hasta la Prime Dose (2ª

inyección de CPE), (48h). (C): desde la Prime Dose hasta la inyección de DHP (24h más tarde).....	Pág. 29
<b>Fig. 12:</b> Evolución del peso en los peces que no respondieron a los tratamientos hormonales en ambos grupos.....	Pág. 30
<b>Fig. 13:</b> Índices biométricos correspondientes a hembras ovuladas, de los 2 tratamientos térmicos.....	Pág. 31
<b>Fig. 14:</b> Tiempo de respuesta ovulatoria a la inyección de DHP, en ausencia de machos (sólo 5 machos en las últimas 2-3 h), o en presencia de 30 machos durante las 10-14 h previas a la puesta. (Excluido el dato de la hembra 5.2, mas inmadura de lo habitual). (n=3, n=7).....	Pág. 32
<b>Fig. 15:</b> Flotabilidad (A), tasa de fecundación (B) y porcentaje de embriones con divisiones regulares (C) en las puestas obtenidas con diferentes regímenes térmicos.....	Pág. 33
<b>Fig. 16:</b> Diámetro medido de los oocitos, en el momento correspondiente a la dosis de CPE2 y DHP, obtenidos en los diferentes regímenes térmicos.....	Pág. 34
<b>Fig. 17:</b> Diámetro medio de los oocitos, 4h post-fecundación, obtenidos con los regímenes térmicos. Diámetro del ooplasma, y diámetro total, incluyendo el espacio perivitelino. ....	Pág. 34
<b>Tabla 3.</b> Desarrollo embrionario de la anguila en el presente experimento.....	Pág. 35
<b>Fig. 19:</b> Larvas de la puesta 6.1.....	Pág. 41

