

**Recuperación de descartes pesqueros en acuarios públicos:
aplicación a la conservación *ex situ* de elasmobranquios ovíparos.**

**Bycatch recovery in public aquaria:
use in *ex situ* conservation of oviparous elasmobranchs.**

**Autor: Pablo García-Salinas
Tutor: Fco. Javier Aznar Avendaño**



Trabajo fin de máster universitario en acuicultura 2017



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ÍNDICE

Resumen y Palabras clave	3
Abstract and Keywords	4
1. INTRODUCCIÓN:	5
1.1. La clase de los condricios.....	5
1.2. Situación a nivel mundial.	5
1.3. Situación en el Mediterráneo.....	7
1.4. Conservación sostenible	8
1.5. Papel de los acuarios públicos.....	9
1.6. Elasmobranquios y conservación <i>ex situ</i>	10
1.7. Presente proyecto	11
1.8. Especies modelo	12
1.9. Objetivos	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1. Procedencia de las muestras	15
2.2. Obtención de las muestras	16
2.3. Protocolo de obtención.....	16
2.3.1. Extracción inmediata (Ei).....	17
2.3.2. Víscera en agua (Va)	17
2.3.3. Víscera en seco (Vs).....	17
2.3.4. Animal en agua (Aa)	18
2.3.5. Animal en seco (As).....	18
2.3.5. Recuperado (R).....	18
2.4. Disposición en acuario	19
2.5. Toma de datos.....	21
2.6. Análisis estadístico	22
2.6.1 Determinar la viabilidad de los huevos.	22
2.6.2 Determinar la supervivencia de los embriones.....	23
2.6.3 Establecer la tasa de crecimiento embrionaria	24
2.7. Procedimientos extraordinarios.....	24

3. RESULTADOS	24
3.1. Huevos obtenidos	24
3.2. Viabilidad de los huevos	25
3.3. Supervivencia embrionaria.....	28
3.4. Desarrollo embrionario.....	31
4. DISCUSIÓN.....	36
4.1. Obtención y viabilidad de los huevos.....	36
4.2. Supervivencia y crecimiento	39
4.3. Conclusiones	43
5. CONSIDERACIONES FINALES	45
6. AGRADECIMIENTOS.....	46
6. BIBLIOGRAFÍA	47

RESUMEN

El presente estudio evalúa la eficacia de una estrategia de conservación *ex situ*, centrada en la recuperación de huevos de elasmobranquios provenientes de descartes de pesca, empleando dos especies modelo de fácil disponibilidad, *Galeus melastomus* y *Scyliorhinus canicula*. Los huevos han sido obtenidos siguiendo diversos procedimientos que recrean de forma precisa escenarios futuros en los que los pescadores podrían implicarse. A continuación, se han transportado hasta las instalaciones de l'Oceanogràfic de València, para ser incubados empleando metodologías adecuadas para optimizar su desarrollo.

Un total de 396 huevos ha sido obtenido entre ambas especies, con un desarrollo embrionario positivo medio del 62,1%. De estos, la tasa de supervivencia media durante la duración del experimento ha sido del 61,1% para *G. melastomus* y de 81,8% para *S. canicula*, siendo la supervivencia independiente de los procedimientos a los han sido sometidos. El desarrollo de los embriones ha sido adecuado, con curvas de crecimiento similares a las obtenidas en publicaciones previas.

Los datos obtenidos demuestran que la recuperación de huevos obtenidos en descartes pesqueros es factible, tanto extraídos de los úteros de hembras capturadas, como obtenidos del medio mediante redes. El empleo de un acuario público para la conservación *ex situ* permitiría disponer de recursos técnicos y humanos reduciendo el coste y maximizando el alcance del mensaje de conservación entre el público.

PALABRAS CLAVE

Acuario público, conservación *ex situ*, cría en cautividad, descartes, elasmobranquios, *Galeus melastomus*, huevos de tiburón, recuperación, *Scyliorhinus canicula*.

ABSTRACT

The effectiveness of an *ex situ* conservation strategy is evaluated in this in the present study. The intended objective of this strategy is the recovery of bycaught elasmobranch eggs by using two model species, *Galeus melastomus* and *Scyliorhinus canicula*. The eggs have been obtained following diverse procedures that accurately imitate future situations in which the fishermen might be involved. Then, it were transported to l'Oceanogràfic of València facilities, in order to be incubated using adequate methodologies to optimize their development.

An average of 62,1% out of a total of 396 eggs obtained joining both species, had a positive development. The survival rate during the experiment was 61,1% to *G. melastomus* and 81,8% to *S. canicula*, being the survival rate independent of the procedures to which the eggs were treated. The embryo development has been normal, with growth curves similar to those obtained in previous reports.

The data obtained proves that the egg recovery from bycatches is a feasible procedure, for eggs extracted from captured females uteruses as well as for those obtained from the environment by fishing gear. The use of a public aquarium to conduct *ex situ* conservation would ensure the availability of technical and human resources in order to reduce costs while maximize the extent of the conservation message in the visitor.

KEY WORDS

Bycatch, elasmobranch, *ex situ* conservation, *Galeus melastomus*, husbandry, public aquarium, shark eggs, recovery, *Scyliorhinus canicula*.

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. La clase de los condricios.

La clase de los condricios (Chondrichthyes, Huxley 1880) es un grupo antiguo y ecológicamente diverso de peces marinos mandibulados, con esqueleto cartilaginoso como una de sus características principales. El grupo lo conforman dos grandes subclases: los elasmobranquios (Elasmobranchii, Bonaparte 1838), donde se incluye a las rayas y tiburones, y los holocéfalos (Holocephali, Bonaparte 1832), comúnmente denominados quimeras. Desde su origen, hace 420 millones de años, han experimentado un proceso de radiación evolutiva que rápidamente los situó en los niveles más altos de las redes tróficas marinas (Compagno, 1990; Kriwet *et al.*, 2008). Actualmente, con más de 1150 especies, los elasmobranquios son una pieza clave en la regulación de la estructura y función de ecosistemas marinos, tanto a nivel costero como oceánico. Las 50 especies actuales de holocéfalos suelen encontrarse en las aguas profundas de los mares templados (Ferretti *et al.*, 2010; Stevens *et al.*, 2000).

La mayor parte de condricios son animales muy sensibles a los cambios rápidos en el entorno debido a su lenta maduración y gestación, así como la elevada inversión reproductiva en la descendencia (Cortés, 2000). Por consiguiente, las bajas tasas de crecimiento poblacional los convierte en un grupo particularmente sensible a la pesca, con numerosas especies fuertemente dependientes de la supervivencia de los estadios juveniles (Musick, 1999; Cortés, 2002; García *et al.*, 2008; Dulvy and Forrest, 2010).

1.2. Situación a nivel mundial.

En los últimos años las poblaciones de condricios en todo el mundo se han reducido drásticamente (Dulvy *et al.*, 2014). Se estima que, a nivel mundial, casi un tercio de las especies (30,1%) se encuentran en una categoría comprometida según criterios de la IUCN (Tabla 1). En comparación, los condricios tienen el menor porcentaje (23,2%, n = 241 especies) de especies consideradas como de “Preocupación Menor” de todos los grupos de vertebrados (Hoffmann *et al.*, 2010). Dado que no existen datos poblacionales fiables para realizar una correcta evaluación en un 46,8% de las especies (n = 487) (Dulvy *et al.*, 2014; Nieto *et al.*, 2015), el porcentaje global de especies comprometidas podría elevarse hasta un 63% de acuerdo con los criterios actuales.

Tabla 1: Número y porcentaje observado y predicho de especies de condricios en la Lista Roja de la IUCN. CR, Peligro Crítico; EN, En Peligro; VU, Vulnerable; NT, Casi Amenazada; LC, Preocupación Menor; DD, Datos Deficientes. El número de especies amenazadas es la suma total de las categorías CR, EN y VU. El número de especies y número de especies amenazadas se expresa como porcentaje del taxón correspondiente, mientras que el porcentaje de cada especie, en las categorías de la IUCN, se expresa relativo al número total de especies. La categoría “Total Predichos” es una estimación del estado de especies de las que falta información.

Taxón	n° especies (%)	n° amenazadas (%)	CR	EN	VU	NT	LC	DD
Rayas	539 (51,8)	107 (19,9)	14 (1,3)	28 (2,7)	65 (6,2)	62 (6,0)	114 (11,0)	256 (24,6)
Tiburones	465 (44,7)	74 (15,9)	11 (1,1)	15 (1,4)	48 (4,6)	67 (6,4)	115 (11,0)	209 (20,1)
Quimeras	37 (3,6)	0	0	0	0	3 (0,3)	12 (1,2)	22 (2,1)
Total observados	1041	181 (17,4)	25 (2,4)	43 (4,1)	113 (10,9)	132 (12,7)	241 (23,2)	487 (46,8)
Total predichos		249 (23,9)				312 (29,9)	389 (37,4)	91 (8,7)

Además, los datos sugieren que los principales condricios afectados son los elasmobranquios (rayas especialmente), estando los holocéfalos menos amenazados a nivel global.

En aguas europeas, de las 132 especies presentes, el 40,4% se encuentran amenazadas. No obstante, este contingente podría alcanzar el 52,7% de evaluarse negativamente el estatus de las 27 especies con “Datos Deficientes”. Varias especies ya se consideran extintas en ciertas regiones, como las dos especies de peces sierra (*Pristis* spp.) en el Mediterráneo, o próximas a la extinción, como es el caso de las tres especies de angelotes (*Squatina* spp.), o el tiburón blanco (*Carcharodon carcharias* L., 1758). Cabe destacar que las 15 especies de peces (esto es, condricios más osteíctios) en “Peligro Crítico” (CR) en aguas europeas corresponden a elasmobranquios, tal y como ocurre con las 17 de las 22 especies “En Peligro” (EN) y 10 de las 22 “Vulnerables” (Dulvy *et al.*, 2014; Nieto *et al.*, 2015).

La pérdida de hábitat es uno de los motivos para el descenso de poblaciones, especialmente para aquellos animales de hábitos costeros, dulceacuícolas o estuarinos. Su especificidad de hábitat y reducida distribución geográfica los hace especialmente sensibles a la degradación del entorno, por lo que se encuentran entre los animales más amenazados (Stevens *et al.*, 2005).

No obstante, el principal motor detrás del descenso de poblaciones es la sobrepesca, tanto de manera accidental, cuando se capturan animales que no eran la especie objetivo (el descarte, o *by-catch*), como de manera intencionada, mediante

pesquerías específicas (Dulvy *et al.*, 2014; Ellis *et al.*, 2016). De hecho, la industria pesquera está considerada como la actividad global más dañina para el ecosistema marino (Gisslasson, 1995; Pauly y Christensen, 1995). Sólo en tiburones, la descarga en puertos comerciales se ha estimado en 1,4 millones de toneladas anuales, lo que equivale a 100 millones de animales (Worm *et al.*, 2013). La falta de un registro global de datos y la dificultad de identificación de algunas especies hace suponer que en realidad, estos datos están infra estimados, pudiendo suponer hasta 273 millones de individuos al año (Worm *et al.*, 2013; Dulvy *et al.*, 2014).

1.3. Situación en el Mediterráneo.

El mar Mediterráneo está actualmente considerado un “punto caliente” mundial en cuanto a amenazas sobre las poblaciones de tiburones y rayas, debido tanto a la explotación litoral como, principalmente, a la sobrepesca (Dulvy *et al.*, 2014). Pese a los esfuerzos de la Comisión General de Pesca del Mediterráneo, o de países como Israel o Croacia, a la cabeza en conservación, la situación ha empeorado en la última década (Nieto *et al.*, 2015). Actualmente se tiene constancia de la presencia de 89 especies de condricios en aguas mediterráneas, incluyendo tanto especies migradoras, especies lesepianas y algunos endemismos (Compagno, 2005; Ebert, 2013, Meléndez, 2017). De las especies presentes, 46 (52%) muestran un estatus de conservación comprometido según datos de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN).

Si bien existen pesquerías dedicadas a la captura de grandes tiburones como la tintorera (*Prionace glauca* (L., 1758)) o el marrajo (*Isurus oxyrinchus* Rafinesque, 1810), la gran mayoría de capturas de elasmobranquios se realiza de manera accidental (como descarte) que, aunque con cierto valor comercial, en repetidas ocasiones acaba siendo arrojado por la borda o vendido localmente (Carbonell, 2002; Megalofonou, 2005; Ferreti, 2008; Dulvy *et al.*, 2014).

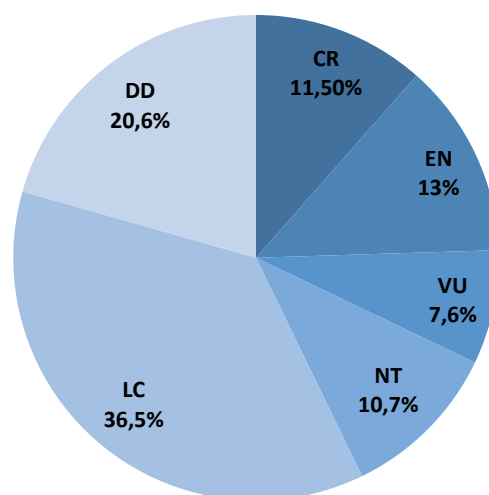


Figura 1: Estatus de conservación de las especies de condricios presentes en las aguas Comunitarias de acuerdo con la Lista Roja de la IUCN. Adaptado de Nieto *et al.*, 2015

De hecho, la reducción de los descartes pesqueros es uno de los temas prioritarios en la Política Común de Pesca de la Unión Europea, y la prohibición de descartar las especies sujetas a regulación pesquera se está implantando por las distintas pesquerías comunitarias. No obstante, de esta prohibición quedarían excluidas aquellas especies cuya viabilidad y supervivencia estuviese garantizada tras la captura (EU, 2013), tal y como sucede en distintas especies de peces (Kerstetter, 2003; Skomla, 2007; Benoît, 2013) incluidos elasmobranquios (Revil *et al.*, 2005; Ellis *et al.*, 2017). Las evaluaciones de impacto se han basado en el análisis de ejemplares de juveniles y adultos. Sin embargo, en el caso de los elasmobranquios ovíparos, una evaluación comprehensiva debería incluir también el impacto sobre los huevos extraídos como descartes de pesca. Sin embargo, la supervivencia de huevos extraídos como descartes de pesca no ha sido evaluada hasta la fecha.

1.4. Conservación sostenible.

Idealmente, la conservación de los recursos naturales se realiza en el medio natural del que forman parte. Este tipo de conservación, denominada *in situ*, tiene como objetivo proteger, mantener y recuperar poblaciones viables, en sus sistemas originales, por lo que se mantienen las mismas dinámicas y procesos evolutivos que les afectaba originalmente y a los que están adaptados (Frankel y Soulé, 1992). No obstante, ésta situación ideal no siempre es alcanzable y las poblaciones pueden verse comprometidas. En aquellas situaciones en las que la viabilidad de una población no puede garantizarse únicamente a través de la conservación *in situ*, ya sea por la competencia con otras especies, destrucción de hábitat, o cualquier otro factor, se puede recurrir al modelo de conservación *ex situ* (Gippoliti, 2012; Pritchard *et al.*, 2012).

La conservación *ex situ* es aquella que implica la protección de organismos, o su progenie, extrayéndolos de su medio natural o aislándolos de los procesos naturales del mismo. En esencia, los individuos son mantenidos en condiciones artificiales, a menudo bajo presiones de selección distintas a aquellas presentes en su hábitat natural (Frankel y Soulé, 1992; IUCN/SSC, 2014). Si bien es cierto que ha existido cierta polémica al respecto, con partidarios y detractores, el debate sobre los dos modelos de conservación carece de sentido, pues tanto la conservación *in situ* como la *ex situ* son dos técnicas complementarias, no excluyentes (Pritchard *et al.*, 2012).

Cualquier modelo de conservación sostenible requiere, en última instancia, de políticas públicas cuyas prioritizaciones y asignación de recursos dependen de que la ciudadanía sea consciente de los problemas. Por tanto, En cualquier modelo de actuación sostenible, la educación juega un papel destacado tanto a nivel global como local (IUCN/SSC, 2014).

Uno de los factores que explican el relativamente bajo status de la conservación marina es la falta de contacto con el medio marino por parte del público (Evans, 1997). Las especies, los hábitats y sus amenazas no pueden ser valorados si son desconocidos, por lo que la educación ambiental es crucial para lograr una conservación a largo plazo (Orr, 1990; Caro *et al.*, 1994). Esto es especialmente importante para animales con una imagen distorsionada, como es el caso de los tiburones, donde es imprescindible aumentar la educación y divulgación (Friedrich *et al.*, 2014; O'Bryhim, 2015).

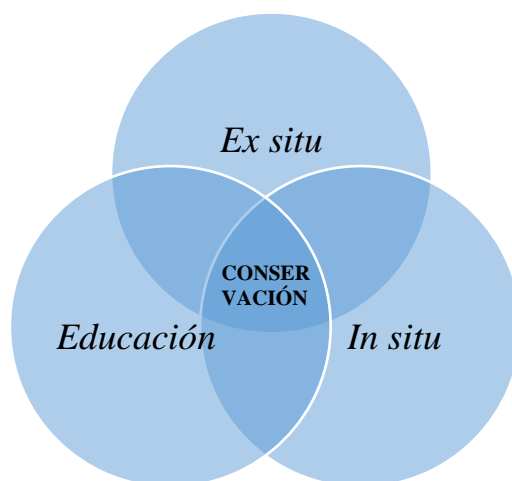


Figura 2: Modelo de conservación sostenible. La conservación sostenible a largo plazo depende de estos tres impulsores. La conservación *in situ*, la conservación *ex situ* y las labores de educación y divulgación que vinculan los proyectos con la sociedad.

1.5. Papel de los acuarios públicos.

En los últimos 40 años, este modelo de conservación a tres niveles ha jugado un papel predominante en los programas de investigación y conservación de muchos parques zoológicos y acuarios de todo el mundo (Penning *et al.*, 2009). La idea tras este cambio es que, mediante la experiencia cercana con animales, la visita puede motivar en el

público el aprendizaje, el cuidado y el interés por la conservación (Yalowitz, 2004 ; Penning et al., 2009).

Según los criterios de la Asociación Mundial de Zoos y Acuarios (WAZA), "uno de los objetivos principales de los zoos y acuarios es dirigir todos los aspectos de su actividad diaria hacia actuaciones que impliquen y destaquen la conservación. La organización y funcionamiento de una institución zoológica deben incluir como principios fundamentales la sostenibilidad, la conservación, y la responsabilidad social y medioambiental, como valores dirigidos a todas las áreas de organización y trabajo, y asumidos y promovidos por todos sus miembros" (WAZA, 2005).

Por razones evidentes, los zoos y acuarios han apostado principalmente por impulsar la conservación *ex situ*, limitando los proyectos de conservación *in situ*, mucho más costosos en general. Aunque la cría y recuperación de individuos para su posterior reintroducción se ha realizado, entre otros, en múltiples especies de mamíferos, aves y reptiles, el objetivo final de la conservación *ex situ* no necesariamente implica la ulterior liberación de individuos en su medio natural (Gippoliti, 2012; Pritchard *et al.*, 2012); la educación y la investigación se consideran también objetivos esenciales que pueden alcanzarse mediante esta estrategia (IUCN/SSC, 2014).

1.6. Elasmobranquios y conservación *ex situ*.

Los intentos previos realizados para reproducir en cautividad diversas especies de tiburones y rayas se han llevado a cabo tanto por el elevado valor de mercado de estos animales, como para evitar tener que extraer del mar especies comunes o emblemáticas, cuya regulación legal, dificulta la obtención de ejemplares (Daly y Jones, 2017). Éste último es el caso del tiburón toro (*Carcharias taurus* Rafinesque, 1810), el tiburón cebrado (*Stegostoma fasciatum* (Hermann, 1783)), la raya de arrecife (*Taeniura lymma* Forsskål, 1775), o los gravemente amenazados peces sierra de dientes pequeños (*Pristis pectinata* Latham, 1794) y peces sierra verdes (*Pristis zijsron* Bleeker, 1851) (Henningsen *et al.*, 2004). Junto con los intereses económicos, en estos casos el fin de la conservación *ex situ* es mantener una base de diversidad genética, realizar labores de investigación y, especialmente, labores de divulgación y educación dentro del medio controlado del acuario, no en el medio natural.

Hasta la fecha, el único caso documentado de un programa de cría *ex situ* de elasmobranquios específicamente para repoblar un área es el proyecto “*Haaien en roggem*

terug in de Noordzee” (“Rayas y Tiburones de vuelta al Mar del Norte”). Iniciado en 2015 y con fecha de finalización en 2019, cuenta con la participación de WWF (*World Wildlife Fund*), *The North Sea Foundation*, *Blue Linked*, *Sportvisserij Nederland* y la *Dutch Shark Society*. El proyecto, todavía en la fase inicial, depende inicialmente de criar animales procedentes de zoos y acuarios, no del medio natural. Tras dos años, ha conseguido criar aproximadamente trescientos ejemplares de *Raja clavata* L. 1758, para su reintroducción y posterior seguimiento en 2017.

Por otra parte, un proyecto de investigación llevado a cabo por *Sharklab Malta* y el *Malta National Aquarium* ha estudiado la viabilidad de los huevos extraídos de hembras comercializadas en mercados, pescadas mediante artes tradicionales. Aunque no hay datos disponibles para especies de aguas profundas o para artes de pesca más agresivos, los resultados son prometedores para especies de aguas más someras como la pintarroja *Scyliorhinus canicula* (L., 1758) y el alitán *Scyliorhinus stellaris* (L., 1758) (Koehler, 2016).

1.7. Presente proyecto.

Como se ha comentado previamente, la gran mayoría de capturas de elasmobranquios se produce como descarte de pesca que, salvo en casos específicos, carece de utilidad (Carbonell, 2002; Megalofonou, 2005). Esto incluye especies de rayas y tiburones ovíparos, algunos de ellos amenazados, que pueden contener huevos viables en su interior. La posibilidad de mantener proyectos de conservación *ex situ* empleando huevos de elasmobranquios, procedentes de descartes pesqueros, no ha sido planteada hasta la fecha, pero podría supondría una oportunidad de recuperación de especies amenazadas. A diferencia de otros proyectos sustentados en la cría controlada de animales, en este caso se trataría de recuperar individuos a través del desarrollo y cuidado de sus fases embrionarias, sin necesidad de recurrir a la reproducción en cautividad.

Con esta idea, en este trabajo, se intentará desarrollar las herramientas que permitan aprovechar un recurso procedente del descarte pesquero, de forma que su aprovechamiento permita implementar labores de conservación, por parte de acuarios públicos, sustentadas en las tres áreas principales: conservación *ex situ* recuperando los huevos en medio controlado, conservación *in situ* mediante la liberación de los animales, y labores de educación y divulgación a lo largo de todo el proceso, tanto sobre los animales en sí mismos, como de las amenazas que sufren en el medio, especialmente la pesca intensiva.

1.8. Especies modelo.

Puesto que este proyecto no ha sido planteado con anterioridad, no existe un protocolo establecido que permita maximizar la supervivencia de los huevos obtenidos. Para evaluar la promesa de éxito de esta estrategia es interesante utilizar especies modelo con un estatus de conservación de “Preocupación Menor”, que sean fáciles de conseguir y con gran disponibilidad de ejemplares que permita un análisis estadístico robusto.

En el Mediterráneo se han registrado 21 especies de elasmobranquios y 2 de holocéfalos ovíparos (Ebert, 2013; Melendez, 2017), de los cuales únicamente 4 especies presentan un estado de “Preocupación Menor” (Ver tabla 2) (Ellis, 2007; Ellis, 2009; Serena, 2009; Smale, 2009).

Tabla 2: Relación de condriictios ovíparos citados en el Mediterráneo, y su estatus de conservación según la IUCN: CR, Peligro Crítico; EN, En Peligro; VU, Vulnerable; NT, Casi Amenazada; LC, Preocupación Menor; DD, Datos Deficientes.

Especie	Orden	Familia	IUCN Global	IUCN Med.
<i>Dipturus batis</i>	Rajiformes	Rajidae	CR	CR
<i>Dipturus nidarosiensis</i>	Rajiformes	Rajidae	NT	DD
<i>Dipturus oxyrinchus</i>	Rajiformes	Rajidae	NT	NT
<i>Leucoraja circularis</i>	Rajiformes	Rajidae	EN	CR
<i>Leucoraja fullonica</i>	Rajiformes	Rajidae	VU	CR
<i>Leucoraja melitensis</i>	Rajiformes	Rajidae	CR	DD
<i>Leucoraja naevus</i>	Rajiformes	Rajidae	LC	NT
<i>Raja asterias</i>	Rajiformes	Rajidae	NT	NT
<i>Raja africana</i>	Rajiformes	Rajidae	DD	DD
<i>Raja brachyura</i>	Rajiformes	Rajidae	NT	NT
<i>Raja clavata</i>	Rajiformes	Rajidae	NT	NT
<i>Raja miraletus</i>	Rajiformes	Rajidae	LC	LC
<i>Raja montagui</i>	Rajiformes	Rajidae	LC	LC
<i>Raja polystigma</i>	Rajiformes	Rajidae	LC	DD
<i>Raja radula</i>	Rajiformes	Rajidae	EN	DD
<i>Raja undulata</i>	Rajiformes	Rajidae	EN	NT
<i>Rostroraja alba</i>	Rajiformes	Rajidae	EN	EN
<i>Galeus atlanticus</i>	Carcharhiniformes	Pentachidae	NT	NT
<i>Galeus melastomus</i>	Carcharhiniformes	Pentachidae	LC	LC
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	LC	LC
<i>Scyliorhinus stellaris</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	NT	NT
<i>Chimaera monstrosa</i>	Chimaeriformes	Chimaeridae	NT	NT
<i>Hydrolagus mirabilis</i>	Chimaeriformes	Chimaeridae	NT	DD

Tanto *Raja miraletus* Linnaeus, 1758 como *Raja montagui* Fowler 1910 son rayas cuyos individuos adultos poseen cierto valor comercial, por lo que salvo en caso de pequeños tamaños, no constituyen habitualmente parte del descarte de pesca y se

comercializan enteras. Por otra parte, debido a la particular fisionomía de los rajiformes, resulta complicado saber si las hembras están grávidas simplemente palpando al animal, requiriendo de técnicas especializadas como endoscopia o ecografías para ello. En cambio, *Scyliorhinus canicula* (L.1758) y *Galeus melastomus* Rafinesque, 1810, son dos especies de tiburones pescados frecuentemente, cuyo estado grávido es sencillo de confirmar, palpando suavemente la cavidad abdominal (Capapé, *et al.*, 2017) Su valor comercial es escaso, siendo consumidas a nivel local tras el procesado de los individuos, que habitualmente son pelados y eviscerados, por lo que sus vísceras son descartadas. Su consumo es en fresco o salado, ocasionalmente aprovechándose para la fabricación de harina de pescado (Serena y Abella, 1999).

La pintarroja (figura 3) es una de las especies de tiburones mejor estudiadas del mundo debido a su amplia distribución, pequeño tamaño, fácil adaptación a la cautividad y capacidad de reproducción (Dehart, 2004) . Se trata de un pequeño tiburón alargado que puede alcanzar el metro de longitud en aguas atlánticas, pero que en el mar Mediterráneo raramente supera los 60 cm. Su tasa reproductiva es notoria (para un elasmobranquio), oscilando entre los 20 y los 115 huevos al año. Dichos huevos son muy característicos, medianamente rectangulares de poco más de 5 cm de largo y 2 de ancho, con colores amarillentos o pardos y unos zarcillos alargados en sus extremos que la hembra utiliza para fijar los huevos a hidrozoos, gorgonias u otro sustrato. La distribución batimétrica de los individuos parece estar influenciada por la edad y el sexo, pero en general se trata de una especie que se encuentra hasta los 200 m de profundidad, sobre la plataforma continental, si bien hay datos de capturas hasta de 700 m de profundidad (Moreno, 1995; Barrull y Mate, 2002; Compagno *et al.*, 2005; Ebert *et al.*, 2013).

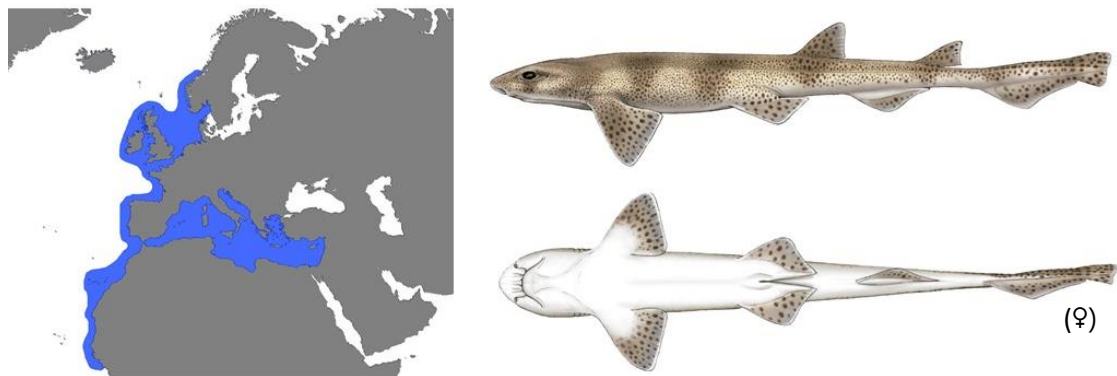


Figura 3: Área de distribución y vista dorsal y ventral de pintarroja, *Scyliorhinus canicula*.
Ilustración de Marc Dando, adaptada de *The Shark Trust Id Card* (2010)

El olayo, *Galeus melastomus* (figura 4) es un tiburón propio de aguas más profundas que la pintarroja, situándose habitualmente entre los 200 y los 500 m de profundidad (que incluye la zona exterior de la plataforma, así como en el talud continental superior). No obstante, los juveniles de ambas especies pueden ver sus rangos solapados. Al igual que la pintarroja, se trata de un tiburón de pequeño tamaño; los ejemplares de mayor talla alcanzan los 60-70 cm (Barrull y Mate, 2002; Compagno *et al.*, 2005; Moreno, 1995). En esta especie los úteros pueden llegar a albergar hasta 14 huevos por evento reproductor. La puesta ocurre a lo largo de todo el año, pero con picos de actividad durante el verano (Tursi *et al.*, 1993, Moreno, 1995). A diferencia de *S. canicula*, su adaptación a la cautividad de ésta especie no ha sido exitoso hasta la fecha, no existiendo registros de ningún acuario que posea ejemplares vivos en medio controlado (American Elasmobranch Society, 2008).

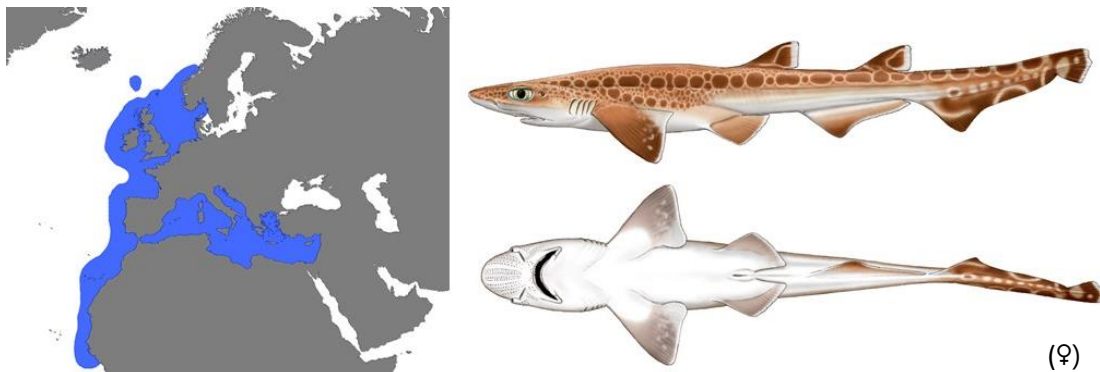


Figura 4: Área de distribución y vista dorsal y ventral del olayo, *Galeus melastomus*.
Ilustración de Marc Dando, adaptada de *The Shark Trust Id Card* (2010)

1.9. Objetivo.

El objetivo de éste estudio es evaluar la eficacia de una estrategia de conservación *ex situ*, que se centre en la recuperación de huevos de elasmobranquios provenientes de descartes de pesca, empleando dos especies modelo de fácil disponibilidad, *Galeus melastomus* y *Scyliorhinus canicula*. Para ello se realizarán seis tratamientos experimentales, que recreen las diferentes maneras posibles de obtención de las muestras y se determinará la influencia de cada tratamiento sobre:

- 1 La viabilidad de los huevos obtenidos, en función del número de embriones que inicie su desarrollo.
- 2 La supervivencia de los embriones, con un desarrollo exitoso, a lo largo del tiempo.
- 3 Las curvas de crecimiento de los distintos embriones, empleando un sistema de etapas en el desarrollo y el peso.

2. MATERIALES Y MÉTODOS:

2.1. Procedencia de las muestras.

Los huevos empleados en el presente estudio se obtuvieron a lo largo de los meses de junio, julio y agosto de 2017, gracias a la colaboración de los patrones y tripulación de dos embarcaciones pesqueras, el “Cap Prim Segón”, con base en el puerto de Xàbia (Alicante) y el “Pausep” con base en el puerto de València.

El “Cap Prim Segón” es un arrastrero de fondo dirigido principalmente a la captura de gamba roja (*Aristeus antennatus*, Risso 1826) en el Canal de Ibiza (Mar Balear), con una profundidad de captura entre los 600 y 800 m. El “Pausep” es un arrastrero que faena en el Golfo de València y tiene como objetivo de diversas especies según temporada, pescando en profundidades que oscilan entre los 100 y los 400 m.

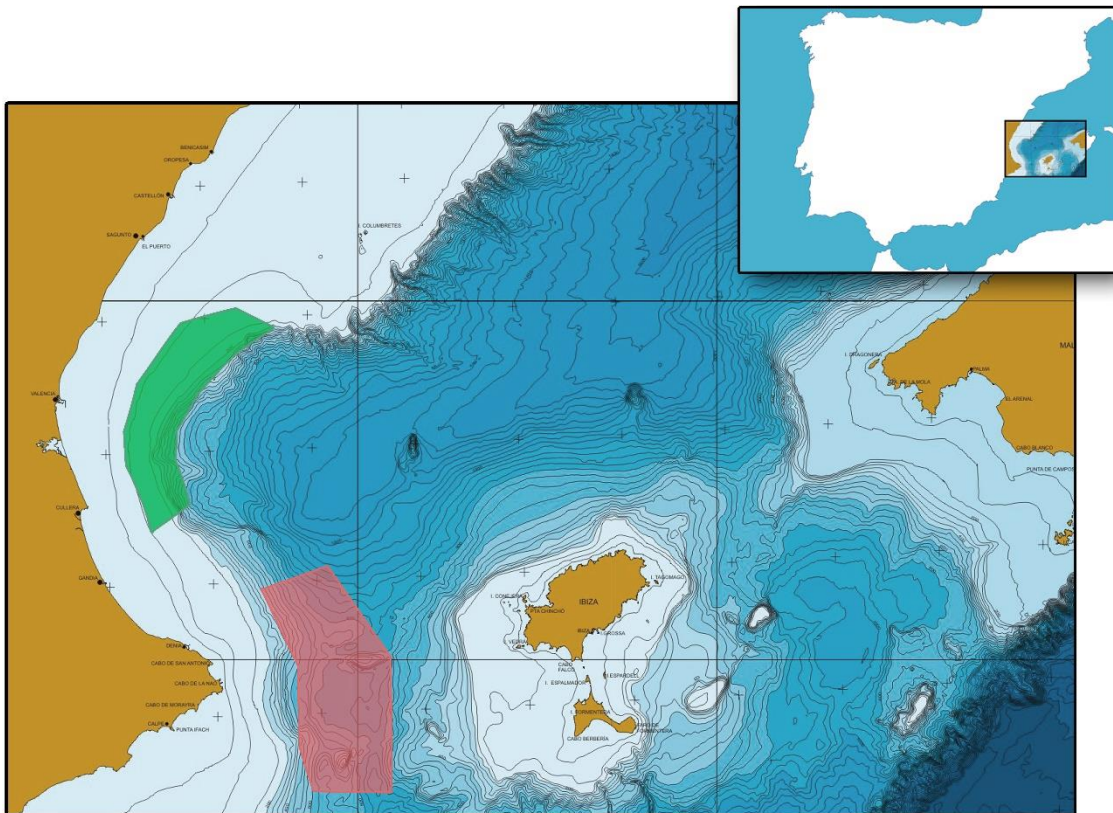


Figura 5: Zonas de pesca donde se han obtenido los huevos. El área sombreada en rojo muestra la zona cubierta por la embarcación “Cap Prim Segón”, el área sombreada en verde muestra la zona cubierta por la embarcación “Pausep”. Mapa modificado a partir de datos del Grupo de trabajo ZEE (2001).

2.2. Obtención de las muestras.

Los huevos se obtuvieron de las dos especies de tiburones objetivo (*Galeus melastomus* y *Scyliorhinus canicula*). Es de destacar que no se consiguió ningún huevo viable de rayas durante los meses de muestreo. Ambas especies tienen escaso valor comercial, pero se comercia con ellas de manera local en los puertos de origen. Para su comercialización, los animales son pelados y eviscerados, pudiendo venderse la carne en fresco o tras un secado al sol de varios días.



Figura 6: *Galeus melastomus* eviscerado y pelado para su comercialización. Frecuentemente la moixa u olayo es descargado y erróneamente etiquetado como pintarroja o musola. Imagen obtenida en Puerto de València.

La recogida de los huevos se logró mediante la colaboración con los pescadores, quienes capturaban y procesaban a los adultos o los huevos y los entregaban en el puerto de destino, o bien mediante embarque del autor de este trabajo, quien los recogía personalmente. Siempre que fue posible, se tomó la temperatura del agua en la que se transportaron las muestras una vez llegadas a puerto, mediante un medidor digital.

2.3. Protocolo de obtención.

Los huevos se obtuvieron tanto del interior de los úteros de hembras fecundadas como directamente de las redes, debido al arrastre de puestas ya depositadas en el medio. En el primer caso se trataba de huevos fecundados pero sin embrión visible; en el segundo, de huevos con los embriones en distinto estado de maduración.

En ambas especies, tras la capturas de las hembras grávidas se plantearon seis tratamientos experimentales que podrían repercutir en la supervivencia de los huevos. Los tratamientos se ordenan a continuación por nivel de esfuerzo y coste económico necesario para realizarlos. Así, la “extracción inmediata” requeriría que hubiese personal específico embarcado, siendo por ello el más costoso, mientras que la recogida de “animales en seco” sólo necesitaría llevar los animales a puerto una vez pescados. En la figura 9 se muestra un resumen de protocolo de tratamientos descrito a continuación.

- 2.3.1. Extracción inmediata (Ei):** En este caso, el autor del trabajo se embarcó en el arrastrero “Cap Prim Según” durante cuatro jornadas (no fue posible hacerlo en el “Pausep”). Inmediatamente tras las capturas, se seleccionó a las hembras grávidas ya fallecidas y, mediante masaje abdominal o la extracción de los úteros, se obtuvieron los huevos, introduciéndose en un recipiente isotérmico con agua de mar a 18°C. La misma temperatura del acuario de destino. Las hembras ya desovadas se devolvieron a los pescadores para su limpieza previa a comercialización. Este tratamiento únicamente pudo realizarse para *Galeus melastomus* pues no se capturó ninguna hembra grávida de *S. canicula* durante los embarques.
- 2.3.2. Viscera en agua (Va):** En este caso, el animal era pelado y eviscerado por los propios pescadores, descartándose las vísceras en un recipiente con agua de mar a una temperatura media estimada de 25,45C (17,4-37,6°C; *Desv. est.*=4,22; n=37) (figura 7A). Los huevos eran extraídos al llegar la embarcación al puerto mediante incisiones en los úteros antes de ser introducidos en un recipiente isotérmico con agua de mar a 18°C.
- 2.3.3. Vísceras en seco (Vs):** En este caso, el animal era procesado del mismo modo por los pescadores, pero las vísceras eran introducidas en bolsas de plástico manteniéndose hidratadas únicamente mediante la humedad de las propias muestras (figura 7B). Al llegar a puerto, los huevos eran extraídos mediante incisiones en los úteros e introducidos en un recipiente isotérmico con agua de mar a 18°C.



Figura 7: Ejemplo de preparación de las muestras tal y como llegaban a puerto para ser recogidas.
A: Vísceras en agua. Se pueden apreciar algunos huevos en el interior de los úteros junto a un ejemplar de *Bathypterois dubius*. B: Vísceras en seco sobre la cubierta del pesquero. Se pueden apreciar los úteros con huevos en su interior al haber sido retirado todo el músculo y piel superior.

2.3.4. Animal en agua (Aa): En este caso el animal no era procesado y directamente era introducido en un recipiente con agua de mar a temperatura ambiente media estimada de $25,5^{\circ}\text{C}$ ($17,4-37,6^{\circ}\text{C}$; *Desv. est.*=4,22; $n=37$). Al llegar a puerto los huevos eran extraídos mediante masaje abdominal o extracción de úteros, e introducidos en un recipiente isotérmico con agua de mar a 18°C . La extracción del útero se podía realizar fácilmente separando el cuerno uterino (Figura 8A) del animal y realizando un corte suave (Figura 8B) con cuidado de no dañar la cápsula del huevo (Figura 8C).

2.3.5. Animal en seco (As): En este caso el animal no era procesado y se dejaba en la cubierta del barco sin recibir ningún tipo de cuidado especial. Al llegar a puerto los huevos eran extraídos mediante masaje abdominal o extracción de úteros, y se introducían en un recipiente isotérmico con agua de mar a 18°C .

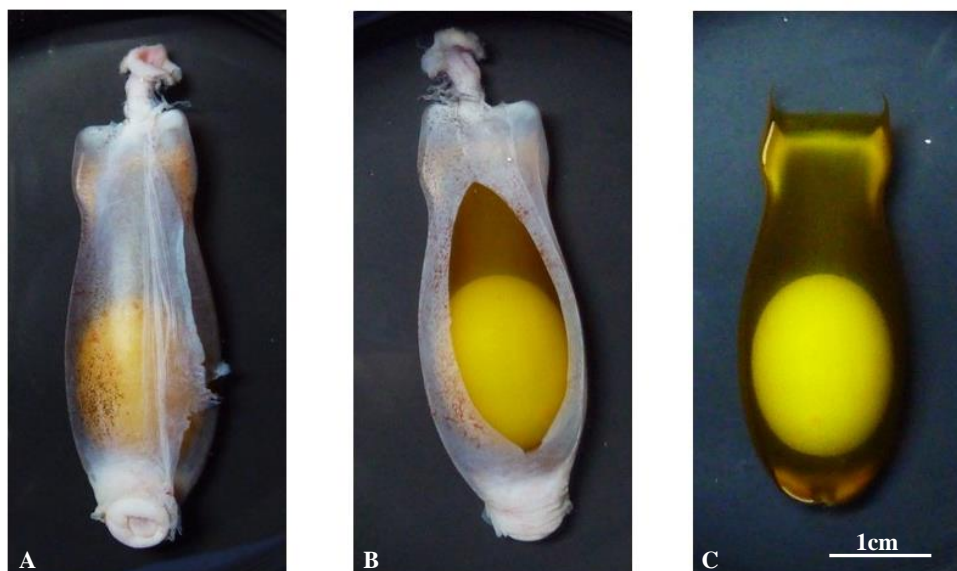


Figura 8: Proceso de extracción de un huevo de *Galeus melastomus* desde el útero.

A: útero con huevo en su interior. B: incisión realizada en la pared uterina para la extracción del huevo. C: huevo obtenido del útero.

2.3.6. Recuperado (R): En esta categoría se englobaron aquellos huevos extraídos directamente del medio natural mediante redes de pesca. Los pescadores conservaron los huevos en recipientes con agua a temperatura ambiente media estimada de $25,5^{\circ}\text{C}$ ($17,4-37,6^{\circ}\text{C}$; *Desv. est.*=4,22; $n=37$). Al llegar al puerto los huevos fueron recogidos y transportados a un acuario mediante un recipiente isotérmico con agua de mar a 18°C .

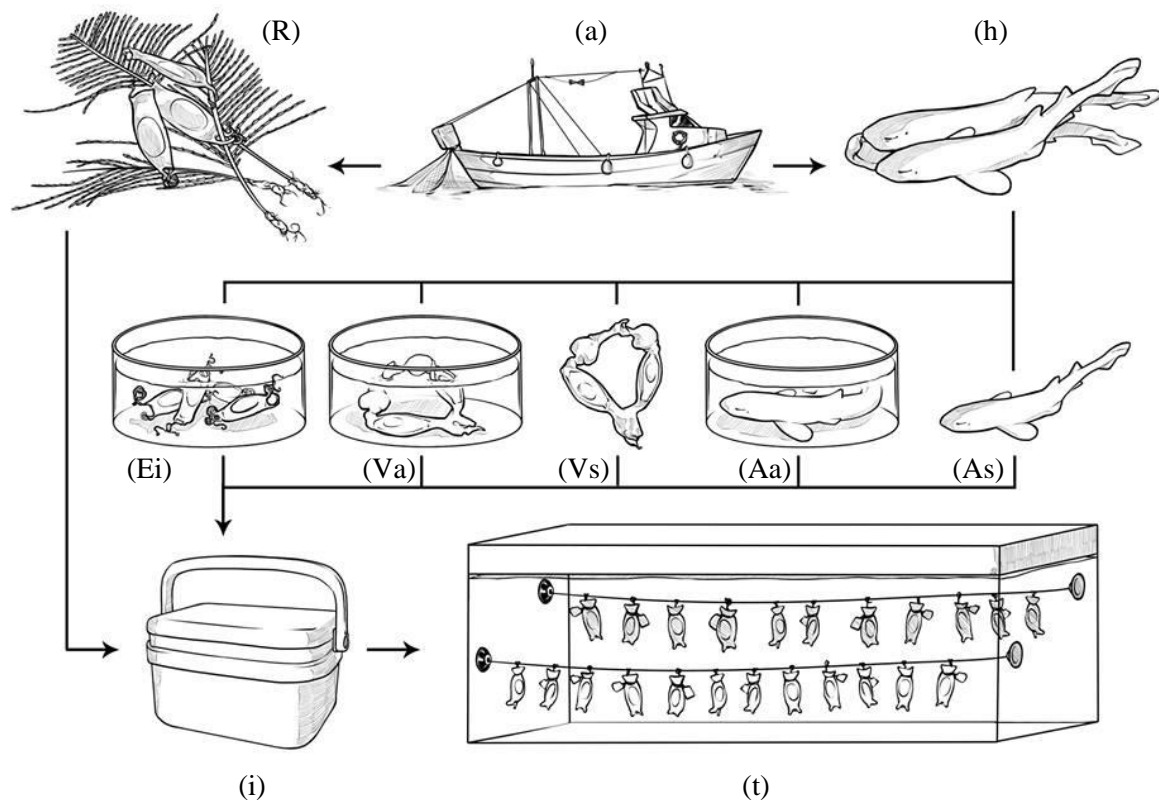


Figura 9: Esquema de los distintos tratamientos planteados y del procedimiento seguido durante la toma de muestras. El barco (a) podía recoger huevos del medio natural (R) o hembras grávidas (h). En el primer caso (R), los huevos eran transportados en un recipiente isotérmico con agua proporcionado a los pescadores (i) hasta su disposición en un acuario (t). En el segundo caso (h), se podía hacer una extracción inmediata de los huevos (Ei) o llevar hasta puerto bien las vísceras en agua (Va) o en seco (Vs) o los animales en agua (Aa) o en seco (As). Al llegar a puerto los huevos eran extraídos e introducidos en un recipiente isotérmico con agua y trasladados a un acuario. Ilustración de Vicent Gisbert Cardona.

2.4. Disposición en acuario.

Los huevos se transportaron a l'Oceanogràfic de València, donde se dispuso de dos sistemas de acuarios independientes, con agua recirculada a diferentes temperaturas ($18,3\pm 3^{\circ}\text{C}$ y $16,9\pm 2^{\circ}\text{C}$) situados en el Área de Cuarentena y Azul Profundo, respectivamente.

-Acuario de Cuarentena: se trata de un tanque rectangular de vidrio, con unas dimensiones de $150\times 50\times 65\text{cm}$ con un total de 487,5 litros. El tanque recibía agua de un sistema de recirculación mayor, siendo el sistema total de con un total de 26.000 litros. El sistema de filtración lo componía un filtro de arena, *skimmer* de proteínas, filtración biológica y filtro UV. Los parámetros del agua fueron monitorizados por el personal de l'Oceanogràfic durante la duración del experimento (Tabla 3).

-Acuario de Azul Profundo: se trata de un tanque de rectangular de plástico opaco, con unas dimensiones de 70x90x90 cm y un volumen total de 441 litros. El tanque recibía agua de un sistema de recirculación mayor, con un total de 12.000 litros. El sistema de filtración lo componía un filtro de arena, *skimmer* de proteínas, filtración biológica y filtro UV. Los parámetros del agua fueron monitorizados por el personal de l'Ocenogràfic durante la duración del experimento (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros del agua en los dos sistemas disponibles.

	T ^a (°C)	pH	O ₂ (% sat.)	Densidad (kg/m ³)
Azul Profundo	16,9	8	96	1026
Cuarentena	18,3	8,1	94	1024

Se tendieron una serie de líneas de nailon longitudinales en el interior de los acuarios desde las que se colgaron los huevos mediante bridas de sujeción de nailon (Figura 12B). Los huevos de las dos especies se asignaron aleatoriamente en los acuarios y las líneas para evitar los efectos de variables de confusión potenciales, como el tipo de acuario, la cercanía a la entrada de agua, la corriente, luminosidad, etc. (Hurlbert, 1984). Cada huevo fue etiquetado mediante un etiqueta especial de nailon, en la que se anotó la especie, el puerto de origen, la fecha de captura, el tipo de tratamiento (Ei, Vs, Va, As, As o R) y un número de identificación.



Figura 12: Aclimatación y disposición en acuario. A: los huevos se depositaron sobre bandejas flotantes para permitir aclimatarse a la temperatura del acuario destino. B: antes de ser introducidos fueron etiquetados y dispuestos aleatoriamente.

Previo a su introducción, los huevos permanecieron en unas bandejas de aclimatación flotantes hasta igualar las temperaturas de la cuba de transporte y la del

acuario de destino (Figura 12A). Cada huevo se pesó con anterioridad a ser introducido en el acuario. En ambos casos se consiguió un número suficientemente elevado de huevos, por lo que se decidió añadir la manipulación de las muestras como variable adicional. De esta manera, se pretendía saber si el hecho de pesar, medir y tocar los huevos a lo largo del proceso de mantenimiento afectaba a los embriones. Por tanto, se seleccionó un grupo de huevos, aleatoriamente, que no podía ser manipulado en absoluto una vez dispuestos en el acuario.

La iluminación de los acuarios se mantuvo al mínimo durante todo el desarrollo del experimento, permaneciendo en sombra (no absoluta oscuridad) durante todo el tiempo posible. Únicamente se empleó luz fluorescente y una linterna sumergible para revisar el estado de los huevos o para las labores de limpieza del acuario (sifonado de fondo y rascado de cristales).

2.5. Toma de datos.

Los huevos se revisaron diariamente para controlar que no había problemas de desarrollo, tales como disgregación del vitelo, turbidez interna, crecimiento de un biofilm externo, inmovilidad y palidez, o acumulación de sangre sobre la membrana vitelina o los extremos del embrión. Para ello se empleó un proceso conocido como ovoscopía (o *candling* en inglés), consistente en situar una fuente de luz detrás del huevo y observar el desarrollo gracias a la luz que pasa a través (Figura 13).

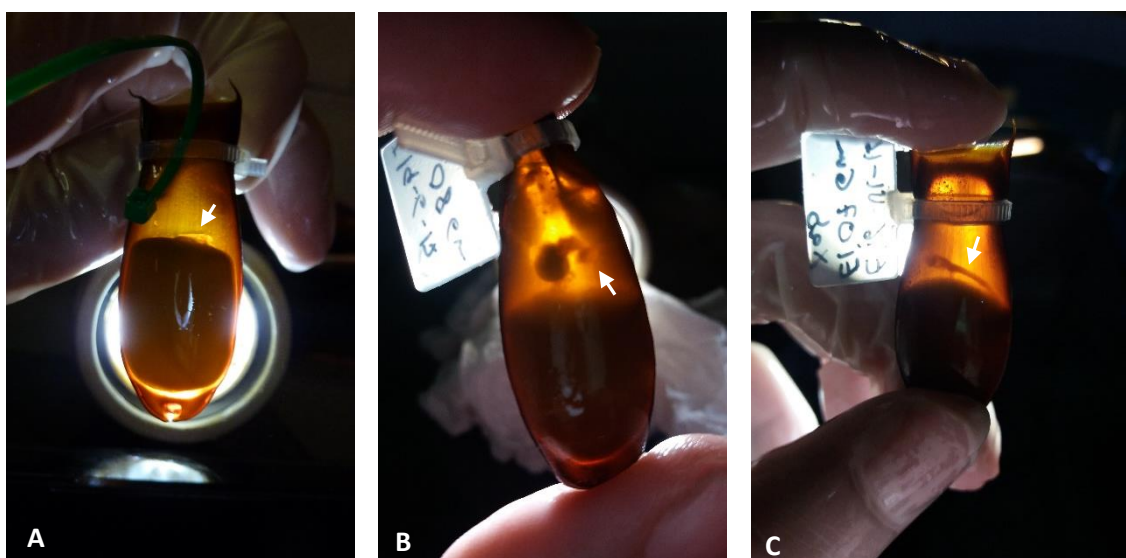


Figura 13: Uso de ovoscopía para detectar diferentes estados. A: primera observación de un embrión (flecha) en estadio 18 (aproximadamente 4,6 mm). B: Vitelo disgregado y turbidez, huevo inviable pese a que existe desarrollo embrionario (flecha). C: embrión desarrollándose con normalidad en estadio 26 (flecha).

Para determinar el desarrollo de los huevos a lo largo del tiempo se adoptaron dos procedimientos. En primer lugar, se escogieron aleatoriamente 10 huevos de cada tratamiento y se pesaron cada 7 días mediante una balanza de precisión ($g \pm 0.1$) extrayéndolos del agua. No obstante, en un momento determinado del desarrollo embrionario, el huevo deja de estar sellado al medio y se abre al exterior (pre-eclosión). Puesto que para pesar el huevo se necesitaba sacarlo del agua, el proceso sólo pudo realizarse hasta el momento en que el huevo se abría al exterior, tras lo cual la salida de agua del interior del huevo era inevitable.

En segundo lugar, al inicio del proceso experimental se planteó la posibilidad de realizar fotografías para medir los embriones. Por desgracia, una vez alcanzado cierto tamaño (aproximadamente 15 mm) los embriones pasaban gran parte del tiempo en movimiento o enrollados sobre sí mismos, lo que imposibilitaba cualquier medida fiable. En su lugar, se empleó el modelo por fases propuesto por Ballard *et al.* (1993) para establecer el desarrollo de los animales, utilizando 10 embriones de cada tratamiento al azar. El modelo consta de 34 etapas o hitos del desarrollo que atraviesa el embrión desde la implantación del blastodisco hasta la eclosión. Para aquellas etapas que requerían una observación interna del embrión se recurrió a una estima aproximada empleando las figuras proporcionadas por los autores en su estudio. Cada huevo fue revisado a los 7 días y su estado de desarrollo evaluado.

En general, aquellos huevos considerados inviábiles, así como los embriones que murieron durante el desarrollo fueron retirados de inmediato y conservados en formol PBS al 4% para realizar un estudio patológico posterior. Los embriones inviábiles pero en buen estado de conservación se aprovecharon para realizar fotografías detalladas, empleando una lupa binocular Leica modelo LED5000 SLI. Tras esto, se procedió a establecer la longitud de las diversas partes del embrión mediante el software de análisis de imagen *ImageJ 1.50b*.

2.6. Análisis estadístico.

El análisis de los datos obtenidos se empleó para lograr tres objetivos específicos:

2.3.7. Determinar la viabilidad de los huevos.

El primer paso fue determinar si los tratamientos experimentales empleados para la obtención de los huevos (Ei, Aa, As, Va, Vs, R) afectaban su viabilidad, entendiendo ésta como la posibilidad de desarrollo del embrión. Es decir, un huevo se consideró viable si

en su interior desarrollaba un embrión durante el tiempo que permaneció en el acuario. Si, por el contrario, el huevo no mostraba indicios de desarrollo embrionario se consideró inviable. Al alcanzar la etapa 17 de desarrollo el embrión era fácilmente reconocible, por lo que se consideraba que empezaba su desarrollo y el huevo se identificaba como viable. Además de los tratamientos experimentales, se observó cómo afectaban otras variables tales como la zona de captura (Xàbia o València), el peso del huevo y la manipulación o no de las muestras sobre el desarrollo del embrión una vez introducidas dentro del acuario. La hipótesis de partida fue considerar que la protección de los huevos hasta llegar al acuario jugaba un papel determinante en la supervivencia, por lo que la supervivencia sería mayor en aquellos huevos extraídos inmediatamente (Ei), seguido de aquellos conservados en el animal en agua (Aa), aquellos en el animal en seco (As), los guardados en las vísceras en agua (Va), las vísceras en seco (Vs) y finalmente los recuperados del medio enganchados en las redes (R). Para determinar el efecto de estos predictores sobre la viabilidad o no de los huevos en cada especie se emplearon Modelos Lineales Generalizados (MGLs), con una estructura de error de la distribución binomial (huevo viable o no) y una función de vínculo (*logit link function*). Los predictores considerados fueron “tratamiento” (factor fijo; 6 niveles), “manipulación” (factor fijo; 2 niveles), “puerto” (factor aleatorio; 2 niveles), y peso inicial del huevo (covariable fija). En el modelo se consideraron inicialmente las interacciones entre pares de predictores. Las interacciones no significativas se eliminaron de los modelos finales para incrementar la sensibilidad del análisis e interpretar correctamente los efectos principales (Engqvist, 2005). Respecto al factor “tratamiento”, la hipótesis de que la viabilidad de los huevos disminuiría de Ei hasta R se investigó mediante contrastes polinomiales.

2.3.8. Determinar la supervivencia de los embriones.

De aquellos huevos con un desarrollo embrionario positivo se analizó la supervivencia de los embriones hasta la finalización del experimento. Para ello, también se usaron MLGs como en el análisis previo, con los mismos predictores. La variable dependiente en este caso fue también binomial (vivo/muerto al final del experimento), así como los predictores considerados.

2.3.9. Establecer la tasa de crecimiento embrionario.

Finalmente, se modelizó el efecto potencial de los diversos tratamientos sobre la tasa de crecimiento de los embriones mediante Modelos Mixtos Lineales. Como variables dependientes alternativas se utilizaron el peso y de etapa de desarrollo. Como predictores se utilizaron “tratamiento” (factor fijo; 6 niveles) y “tiempo” (factor fijo; 6-8 niveles, dependiendo de la especie –véanse los Resultados; los niveles correspondían a cada registro semanal de peso y etapa de desarrollo). “Individuo” se incluyó como un factor aleatorio. Un análisis preliminar indicó que la estructura de covarianza con menor AIC fue, en todos los modelos, la de Componentes de Varianza, que es la que se presenta (Singer, 1998).

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el *software* IBM SPSS Statistics para Windows, V. 22.0.

2.7 Procedimientos extraordinarios.

Al detectarse problemas en el desarrollo de algunos de los huevos, se realizaron análisis para intentar discernir la causa. Para ello se realizaron frotis, con isopos estériles, del exterior y el interior de la cápsula de huevos, antes de que se abrieran al medio. Y se realizaron preparaciones sobre portaobjetos con tinción de Gram y cultivos sobre Columbia Blood Agar, TCBS y HBIA e incubados durante 21 días a 18 °C.

3. RESULTADOS.

3.1. Huevos obtenidos.

Tras finalizar los días de muestreo se obtuvo un total de 396 huevos de tiburones de las dos especies objetivo (266 de *Galeus melastomus* y 130 de *Scyliorhinus canicula*). La frecuencia de obtención de huevos fue muy diferente en las dos zonas de muestreo, no obteniéndose ningún huevo de *Scyliorhinus canicula* en Xàbia, mientras que en València se obtuvo de ambas especies. En ninguna zona de muestreo se logró recuperar (Tratamiento “R”) del medio natural un huevo de *G. melastomus*, obteniéndose todos del interior de hembras grávidas (tabla 4).

Tabla 4: Relación de muestras obtenidas por cada zona de muestreo. Número de huevos obtenido en cada área, en función de si fueron extraídos del interior de las hembras (“Extracción”) o directamente del medio natural (“Recuperados”). La columna “TOTAL” muestra la suma de todos los huevos obtenidos, independientemente de la especie, mientras que en los paréntesis se muestra para cada especie.

	<i>Xàbia</i>		<i>València</i>		<i>TOTAL</i>
	Extracción	Recuperados	Extracción	Recuperados	
<i>Galeus melastomus</i>	174	0	92	0	396 (266)
<i>Scyliorhinus canicula</i>	0	0	54	76	(130)

El periodo de muestreo fue diferente en las dos zonas. Así, en *Xàbia* se realizaron 4 embarques durante dos semanas consecutivas de junio, permitiendo obtener 174 huevos de *G. melastomus* en un corto periodo de tiempo (66,5 huevos/días (52-78)). En *València* se acudió al puerto todos los días durante los meses de julio y agosto, obteniéndose 92 de *G. melastomus* (1,5 huevos/ día (0-45) y 130 (2,1 huevos/día de (0-26)) de *S. canicula*.



Figura 14: Huevo de *S. canicula* recuperado con redes de arrastre. El embrión, en estadio 32, estaba muerto al llegar a puerto, por lo que fue descartado del estudio.

De los huevos 130 recuperados de *S. canicula*, 54 se obtuvieron de interior de hembras grávidas y no presentaban desarrollo embrionario mientras que 76 huevos más fueron recuperados del medio. Todos aquellos huevos recuperados (21 huevos) con un desarrollo a partir de la etapa 30 llegaban a puerto fallecidos, algunos con indicios de haber intentado salir del huevo. Además, se obtuvo 12 cápsulas vacías y un huevo de *G. melastomus* que carecía de vitelo, estando relleno únicamente de una sustancia hialina gelatinosa. Puesto que el objetivo final consistía en determinar la viabilidad de supervivencia, todos estos huevos inválidos fueron descartados.

3.2. Viabilidad de los huevos.

Tras la colocación en el acuario, los huevos se revisaron diariamente para monitorizar su estado. No todos los huevos alcanzaron una etapa que permitiera apreciar el desarrollo del embrión. A las 48 horas tras la colocación, algunos de los huevos eran claramente inviábiles, con el vitelo desplazado hacia la parte inferior del huevo y mostrando signos de degeneración, incluso viéndose restos del blastodisco sobre la membrana vitelina. En otras ocasiones, a pesar de no mostrar signos de degeneración evidentes, el embrión no

llegó a desarrollarse, ya fuera por tratarse de huevos no fecundados o de huevos con crecimiento detenido. En *G. melastomus* los embriones alcanzaron la fase 17 a los 10,08 días (2-18, n=157, *Desv.est.*=7,23) pudiendo ser visibles fácilmente. En cambio, en *S. canicula* los embriones alcanzaron la fase 17 a los 15,83 (10-21, n=30; *Desv. est.*=2,8). De los 76 huevos de ésta especie recuperados del medio, 16 no mostraban inicialmente desarrollo embrionario, pero pasados 7,9 días (5-14; n=8; *Desv. est.*=1) 8 de ellos alcanzaron el estadio 17 en el acuario. Los otros 60 presentaban un desarrollo variable, con fases embrionarias comprendidas entre las etapas 17 y 32.

La viabilidad de los huevos (Figura 15) se determinó en base a la aparición, o no, de desarrollo embrionario. En total de 396 huevos mantenidos, 336 llegaron a las instalaciones sin que se pudiese apreciar embrión en su interior. No obstante, el embrión empezó su desarrollo de forma exitosa en un total de en 222 de dichos huevos, obteniéndose una viabilidad del 56,06% (tabla 5).

Tabla 5: Efecto del tratamiento sobre la viabilidad. La viabilidad de los huevos se representa como aparición exitosa del embrión en un huevo. Del total de huevos no sin embrión visible al inicio del experimento, se muestra el número total y porcentaje de huevos donde se acaba desarrollando. En la columna de tratamiento: “Ei” = Extracción inmediata; “Aa” = Animal en agua; “As” = Animal en seco; “Va” = Viscera en agua; “Vs” = Viscera en seco; “R”= Recuperado del medio.

<i>Tratamiento</i>	<i>Galeus melastomus</i>				<i>Scyliorhinus canicula</i>			
	Desarrollo embrión		Sin desarrollo		Desarrollo embrión		Sin desarrollo	
	Huevos	%	Huevos	%	Huevos	%	Huevos	%
<i>Ei</i>	24	72,73	9	27,27	0	0,00	0	0,00
<i>Aa</i>	54	75,00	18	25,00	11	78,57	3	21,43
<i>As</i>	31	63,27	18	36,73	9	69,23	4	30,77
<i>Va</i>	44	57,14	33	42,86	10	62,50	6	37,50
<i>Vs</i>	21	60,00	14	40,00	4	36,36	7	63,64
<i>R</i>	0	0,00	0	0,00	8	50,00	8	50,00
TOTAL	174	65,41	92	34,59	42	60,00	28	40,00

Galeus melastomus.

Por especies, la viabilidad de *G. melastomus* fue de 65,41%, con 174 huevos empezando el desarrollo embrionario. Respecto a la influencia de las distintas variables, los datos (tabla 6) indicaron que ni la manipulación ($p=0,369$), ni el peso inicial ($p=0,286$) afectaba a la viabilidad de los huevos analizados. En cambio, el área de origen si mostró una significativa ($p=0,003$) diferencia de viabilidad, con el área de Xàbia siendo más propicia que la de València. Las implicaciones de esto se evalúan en el apartado de “Discusión”.

Con respecto a la hipótesis inicial (la viabilidad de los huevos disminuiría de al pasar desde el tratamiento Ei hasta el R), no pudo ser aceptada para *G. melastomus* ($p=0,231$), pese a que gráficamente hay cierta concordancia con la hipótesis inicial planteada (tabla 7).

Scyliorhinus canicula.

La viabilidad de *S. canicula* fue del 60%, con 42 casos mostrando desarrollo embrionario. Las distintas variables y tratamientos no influyeron significativamente en el inicio del desarrollo embrionario, salvo el peso inicial ($p=0,019$) que muestra una relación positiva con la viabilidad. De nuevo no hay una influencia clara entre la viabilidad de los huevos y el tratamiento ($p=0,193$), pero en este caso

Tabla 6: Resultados estadísticos obtenidos. Se estudió el efecto sobre la viabilidad de los huevos que tenía el tipo de tratamiento (Ei, Aa, As, Va, Vs y R), la manipulación, el peso inicial y la zona de origen. Las interacciones entre los diversos factores fueron descartadas por restar precisión al modelo

Viabilidad en <i>G. melastomus</i>			
	Chi-cuadrado de Wald	gl	Sig.
Tratamiento	4,385	4	0,356
Manipulación	0,806	1	0,369
Área de origen	9,097	1	0,003
Peso inicial	1,140	1	0,286
Viabilidad en <i>S. canicula</i>			
	Chi-cuadrado de Wald	gl	Sig.
Tratamiento	6,081	4	0,193
Manipulación	2,582	1	0,108
Peso inicial	5,491	1	0,019

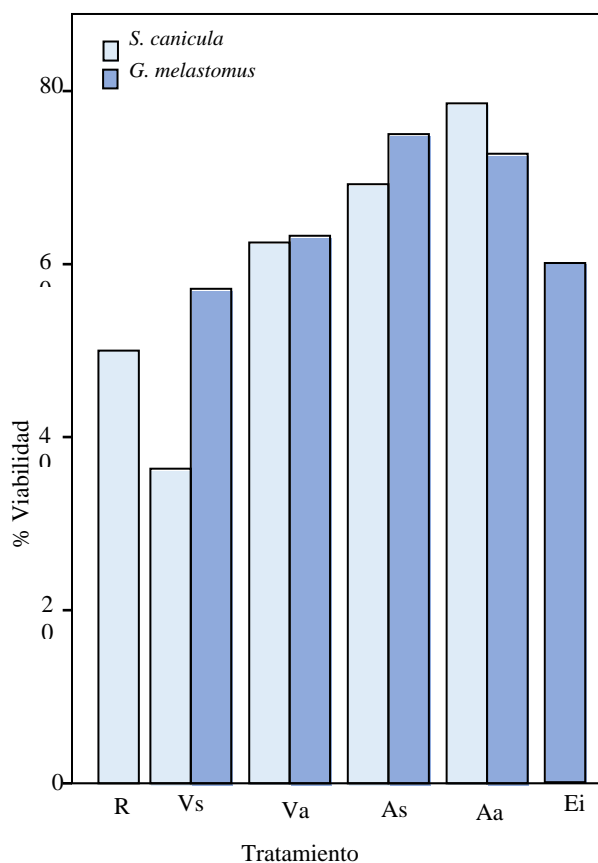


Figura 15. Viabilidad de los huevos obtenidos. Se representa, para ambas especies, el porcentaje de éxito en el desarrollo del embrión en función de cada tratamiento

sí parece cumplirse la hipótesis planteada ($p=0.043$) y hay un decrecimiento en el porcentaje de viabilidad desde los tratamientos más protectores hasta los más sencillos (tabla 7).

Tabla 7: Resultado de los contrastes polinómicos. Con el fin de comprobar la hipótesis inicial se analizó si existía una relación lineal entre los porcentajes de supervivencia de los distintos tratamientos. Para *G. melastomus* no se ha podido comprobar que la viabilidad disminuya desde Ei hasta Vs, pero en el caso de *S. canicula* sí parece haber una disminución desde Aa hasta R.

<i>Galeus melastomus</i>					
<i>Contraste polinómico</i>	Estimación de contraste	Error estándar	Chi-cuadrado de Wald	gl	Sig.
<i>Lineal</i>	-0,10	0,086	1,435	1	0,231
<i>Cuadrático</i>	0,04	0,085	0,209	1	0,648
<i>Cúbico</i>	0,08	0,066	1,458	1	0,227
<i>Scyliorhinus canicula</i>					
<i>Contraste polinómico</i>	Estimación de contraste	Error estándar	Chi-cuadrado de Wald	gl	Sig.
<i>Lineal</i>	-0,28	0,137	4,081	1	0,043
<i>Cuadrático</i>	0,11	0,137	0,601	1	0,438
<i>Cúbico</i>	-0,12	0,143	0,690	1	0,406

3.3. Supervivencia embrionaria.

De los 266 huevos viables algunos se introdujeron con posterioridad a la fecha límite del experimento, por lo que sólo 221 (anteriores a la fecha) se emplearon para calcular la supervivencia de los embriones. De éstos, el 68,33% de los huevos (151) sobrevivió hasta el momento final establecido (tabla 8).

Tabla 8: Efecto del tratamiento sobre la supervivencia. La supervivencia de los embriones se estimó en función de si alcanzaban la fecha límite del experimento. Se muestra el total de embriones que sobrevivieron frente a los que fallecieron. En la columna de tratamiento: “Ei” = Extracción inmediata; “Aa” = Animal en agua; “As” = Animal en seco; “Va” = Viscera en agua; “Vs” = Viscera en seco; “R”= Recuperado del medio.

<i>Tratamiento</i>	<i>Galeus melastomus</i>				<i>Scyliorhinus canicula</i>			
	Supervivencia		Mortalidad		Supervivencia		Mortalidad	
	Embrión	%	Embrión	%	Embrión	%	Embrión	%
<i>Ei</i>	13	54,17	11	45,83	0	0,00	0	0,00
<i>Aa</i>	24	63,16	14	36,84	10	100,00	0	0,00
<i>As</i>	23	74,19	8	25,81	9	81,82	2	18,18
<i>Va</i>	17	56,67	13	43,33	9	90,00	1	10,00
<i>Vs</i>	11	52,38	10	47,62	2	40,00	3	60,00
<i>R</i>	0	0,00	0	0,00	31	80,49	8	19,51
TOTAL	88	61,11	56	38,89	63	81,82	14	18,18

Galeus melastomus.

Se empleó un total de 144 huevos de *G. melastomus* para estudiar la supervivencia de los embriones. De éstos, el 61,11% (88 embriones) llegaron con vida hasta la fecha límite, mientras que 56 animales no lograron un desarrollo exitoso. Ni los tratamientos experimentales ($p=0,375$) ni las variables analizadas ($p=0,274$ manipulación; $p=0,108$ peso) influyeron significativamente en la supervivencia de los embriones (tabla 9), que fue de 41,35 días (7-55, *Des.est.* = 12,88; $n=144$) de media (Figura 17). Por motivos ajenos al autor, la etapa final del experimento tuvo que adelantarse, finalizando la de *G. melastomus* antes de los previsto, hasta una duración total de 55 días.

Scyliorhinus canicula.

De los 77 huevos viables de ésta especie, el 81,82% (63 embriones) sobrevivió hasta la etapa final del experimento, fallando únicamente 14 embriones. Ni los tratamientos experimentales ($p=0,701$) ni las variables analizadas ($p=0,275$ manipulación; $p=0,765$ peso) influyeron significativamente en la supervivencia de los embriones (tabla 9). No obstante, sí hay una aparente asociación lineal ($p=0,01$) (tabla 10) entre la hipótesis planteada y los datos de supervivencia de los embriones (Figura 17). La vida media de los animales durante el experimento, de 77 días de duración, fue de 36,14 días (8-74, *Desv.est.* = 15,3; $n=77$) (Figura 16).

Tabla 9: Resultados estadísticos obtenidos para la supervivencia. Se estudió el efecto sobre supervivencia de los embriones en función de cada tratamiento (Ei, Aa, As, Va, Vs y R), la manipulación y el peso inicial. Las interacciones entre los diversos factores fueron descartadas por restar precisión al modelo

	<i>Supervivencia S. canicula</i>			<i>Supervivencia G. melastomus</i>		
	Chi-cuadrado de Wald	gl	Sig.	Chi-cuadrado de Wald	gl	Sig.
<i>(Interceptación)</i>	2,171	1	0,141	,000	1	0,999
<i>Peso inicial</i>	2,581	1	0,108	,089	1	0,765
<i>Manipulación</i>	1,199	1	0,274	1,193	1	0,275
<i>Tratamiento</i>	4,238	4	0,375	2,187	4	0,701

Tabla 10: Resultado de los contrastes polinómicos sobre la supervivencia. Con el fin de comprobar la hipótesis inicial se analizó si existía una relación lineal entre los porcentajes de supervivencia de los distintos tratamientos. Para *G. melastomus* no se ha podido comprobar que la supervivencia disminuya desde Ei hasta Vs, pero en el caso de *S. canicula* si parece haber una disminución desde Aa hasta R.

<i>Galeus melastomus</i>					
Contraste polinómico	Estimación de contraste	Error estándar	Chi-cuadrado de Wald	gl	Sig.
Lineal	-0,05	0,104	0,253	1	0,615
Cuadrático	0,14	0,098	2,190	1	0,139
Cúbico	0,04	0,092	0,166	1	0,684
Orden 4	-0,12	0,087	1,934	1	0,164
<i>Scyliorhinus canicula</i>					
Contraste polinómico	Estimación de contraste	Error estándar	Chi-cuadrado de Wald	gl	Sig.
Lineal	0,23	0,070	11,176	1	0,001
Cuadrático	-0,13	0,068	3,486	1	0,062
Cúbico	0,01	0,110	0,011	1	0,916
Orden 4	0,03	0,080	0,117	1	0,732

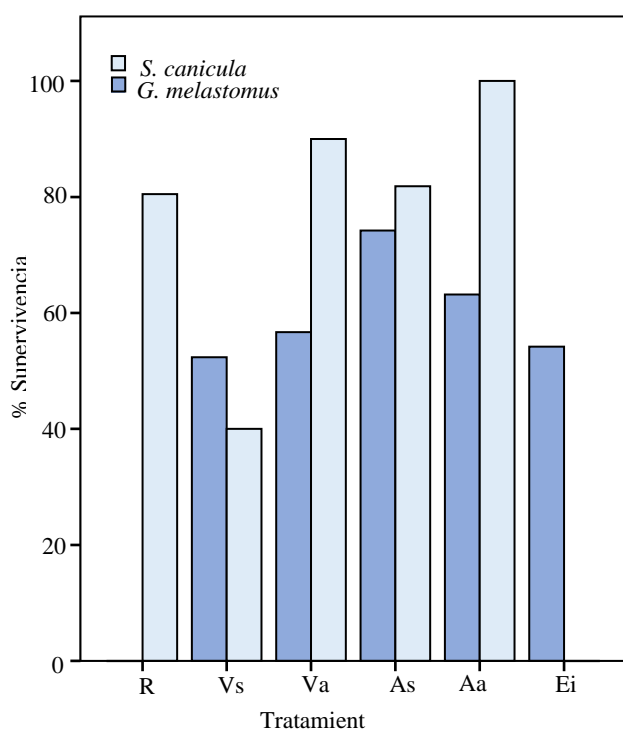


Figura 17: Supervivencia de los embriones. Porcentaje de embriones que supervivientes en función de cada uno de los tratamientos, de ambas especies, durante la duración del experimento.

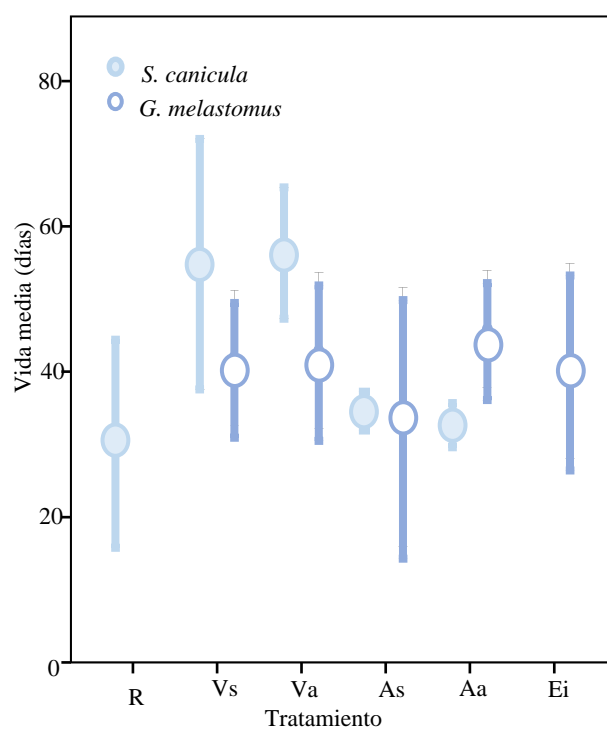


Figura 16: Vida media de los embriones. Media del tiempo, medido en días, que sobrevivieron los embriones en cada tratamiento. Barras de error +/- 1 Desv. est.

3.4. Desarrollo embrionario.

Se realizaron curvas de crecimiento para diez embriones, en cada uno de los tratamientos, seleccionados aleatoriamente al inicio del proceso experimental. Para ello se tomó datos del peso (g) y del desarrollo embrionario (etapas) siguiendo Ballard *et al.* 1993. Cada medida se realizó con un intervalo de 7 días tras la introducción del animal en el acuario.

Peso:

El peso medio inicial de los huevos fue de 4,14 g (3,2-5; $n=266$; $Desv. est.=0,316$) para *G. melastomus* y de 4,27 g (2,8-5; $n=130$; $Desv. est.=0,397$) para *S. canicula* (Figura 18) En ninguna de las dos especies el peso varió de manera significativa ($p=0,979$ para *G. melastomus* y $p=0,653$ para *S. canicula*) a lo largo del tiempo de crecimiento, desde que se introdujo en el acuario hasta el momento en que el huevo se abrió al medio (Figura 19).

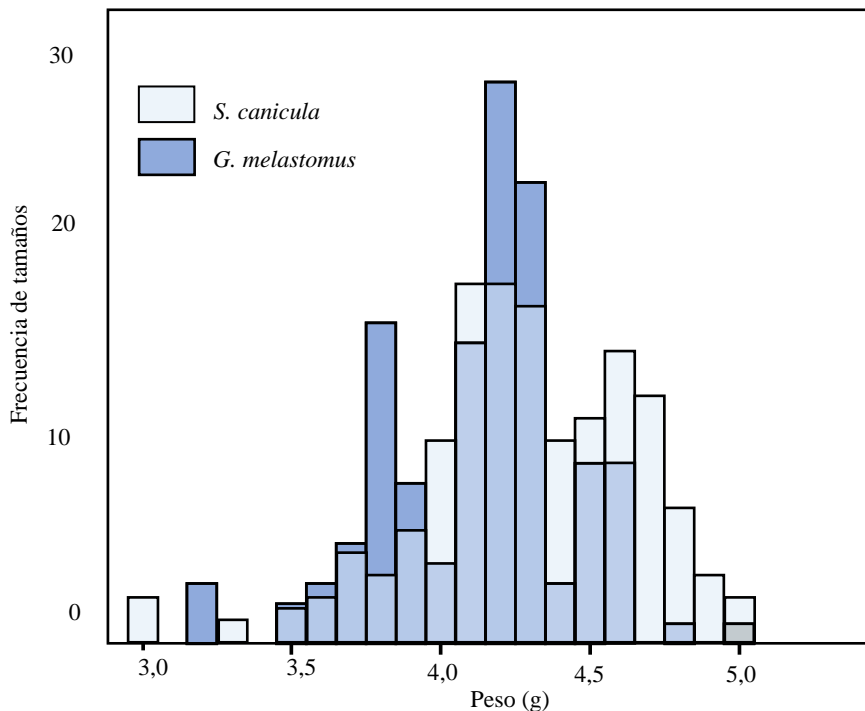


Figura 19: Frecuencia de distribución del peso inicial. Distribución del peso inicial (g) medido al llegar los huevos al acuario. La mayor frecuencia de pesos mayores en *S. canicula* explica el peso medio mayor.

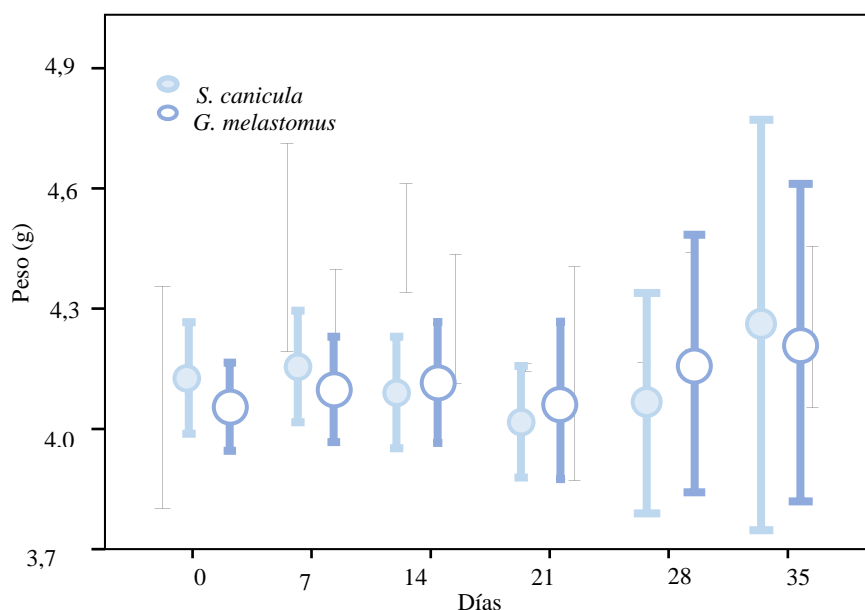


Figura 19: Evolución del peso a lo largo del desarrollo embrionario. Peso (g) de los huevos desde que se introdujeron en el acuario hasta que se alcanzó la fase de pre-eclosión, cuando la cápsula se abre. Las mediciones se realizaron semanalmente. Barras de error +/- 1 *Desv est.*

Etapas:

Tras su introducción en el acuario, a los huevos sin embrión detectable se les asignó la etapa 4 de desarrollo embrionario al ser la que, en la naturaleza, antecede a la puesta. El desarrollo embrionario en ambas especies mostró un crecimiento curvilíneo positivo, con incremento medio de 0,59 etapas/día (4,11 etapas/semana, *Desv.est.*: 4,48; n=37) para *G. melastomus* y un incremento medio de 0,49 etapas/día (3,43 etapas/semana, *Desv.est.*:4,29; n=42) para *S. canicula*.

Galeus melastomus.

Puesto que todos los huevos eran manipulados, sólo se evaluó la influencia de los distintos tratamientos, con respecto al tiempo, en el desarrollo embrionario. Mientras que los diversos tratamientos no mostraron alterar significativamente el desarrollo de los animales ($p= 0,710$) (tabla 11), si se observó que en las primeras semanas de desarrollo el crecimiento ocurría a un ritmo diferente ($p<<0,01$), sustancialmente más rápido que durante el resto del tiempo (tabla 12, Figura 20). El mínimo estadio embrionario asignado a *G. melastomus* fue la etapa 4, mientras que el máximo fue la etapa 31.

Tabla 11: Resultado de los Modelos Mixtos Lineales. Resultado obtenido para los *mixed models* para las variables dependientes “Etapa de desarrollo” y “Peso durante el desarrollo” para *G. melastomus*. Mientras que el peso no se ve influido ni por el tiempo transcurrido ni por el tipo de tratamiento, se aprecia que el tiempo es muy significativo para determinar la etapa de desarrollo, no así el tipo de tratamiento.

<i>Galeus melastomus</i>								
<i>Origen</i>	Etapa de desarrollo				Peso durante el desarrollo			
	gl de numerador	gl de denominador	F	Sig.	gl de numerador	gl de denominador	F	Sig.
<i>Interceptación</i>	1	30,729	760,418	0,00	1	32,791	7500,46	0,00
<i>Tratamiento</i>	4	26,759	0,536	0,71	4	32,072	0,813	0,52
<i>Tiempo</i>	7	107,073	93,553	0,00	5	117,271	0,293	0,91

Tabla 12: Estimación de efectos fijos para la variable dependiente “Etapa de desarrollo”. Sólo se reproduce esta tabla (y no la de peso durante el desarrollo) por ser la única dependiente que se ve afectada por un factor, en este caso el tiempo transcurrido ($p < 0.01$), durante las primeras semanas de desarrollo.

<i>Parámetro</i>	Etapa de desarrollo <i>Galeus melastomus</i>						
	Estimación	Error estándar	gl	t	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
<i>Interceptación</i>	29,343163	2,656278	65,158	11,047	,000	24,038452	34,647874
<i>Vs</i>	-,648756	2,710811	26,399	-,239	,813	-6,216809	4,919297
<i>Va</i>	,744517	3,104222	26,066	,240	,812	-5,635514	7,124549
<i>As</i>	-2,280286	2,713612	26,484	-,840	,408	-7,853234	3,292662
<i>Aa</i>	-2,636081	2,784658	26,636	-,947	,352	-8,353381	3,081219
<i>Ei</i>	0 ^b	0					
<i>Dia 0</i>	-12,383381	1,676467	106,845	-7,387	,000	-15,706837	-9,059926
<i>Dia 7</i>	-8,034635	1,679741	106,491	-4,783	,000	-11,364707	-4,704563
<i>Dia 14</i>	-5,438349	1,681787	106,451	-3,234	,002	-8,772492	-2,104206
<i>Dia 21</i>	-2,477819	1,687667	106,423	-1,468	,145	-5,823630	,867993
<i>Dia 28</i>	-1,163685	1,710792	106,482	-,680	,498	-4,555320	2,227949
<i>Dia 35</i>	1,442753	1,738591	106,820	,830	,408	-2,003868	4,889374
<i>Dia 42</i>	,125966	1,817878	106,066	,069	,945	-3,478128	3,730060
<i>Dia 49</i>	0 ^b	0					

Scyliorhinus canicula:

En el caso de ésta especie se observó el mismo crecimiento rápido significativamente distinto ($p < 0,01$) en las primeras semanas de desarrollo que en *G. melastomus* (tabla 13). Además, el tratamiento R resultó influir en el crecimiento de manera evidente ($p < 0,01$), evidenciándose las diferencias en las etapas iniciales del desarrollo (tabla 14, Figura 20). En cambio, el resto de tratamientos no afectó significativamente al

crecimiento curvilíneo de los embriones. El mínimo estadio embrionario asignado en *S. canicula* fue la etapa 4, siendo el máximo la etapa 32.

Tabla 13: Resultado de los Modelos Mixtos Lineales. Resultado obtenido para los *mixed models* para las variables dependientes “Etapa de desarrollo” y “Peso durante el desarrollo” para *S. canicula*. Mientras que el peso no se ve influido ni por el tiempo transcurrido ni por el tipo de tratamiento, la etapa de desarrollo se ve afectada tanto por el tiempo transcurrido como por el tratamiento al que se ve sometido.

<i>Scyliorhinus canicula</i>								
Etapa de desarrollo					Peso durante el desarrollo			
<i>Origen</i>	gl de numerador	gl de denominador	F	Sig.	gl de numerador	gl de denominador	F	Sig.
<i>Interceptación</i>	1	121,000	2945	0,00	1	103,00	2917,95	0,00
<i>Tratamiento</i>	4	121,000	3,045	0,02	4	103,00	1,83	0,13
<i>Tiempo</i>	7	121,000	21,06	0,00	4	103,00	,613	0,65

Tabla 14: Estimación de efectos fijos para la variable dependiente “Etapa de desarrollo”. Sólo se reproduce esta tabla (y no la de peso durante el desarrollo) por ser la única dependiente que se ve afectada por un factor, en este caso el tiempo transcurrido ($p < 0.01$) durante las primeras semanas de desarrollo y uno de los tratamientos (el R, $p < 0.01$).

<i>Etapa de desarrollo Scyliorhinus canicula</i>							
<i>Parámetro</i>	Estimación	Error estándar	gl	t	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
<i>Interceptación</i>	27,783812	2,158210	140	12,874	,000	23,516915	32,050709
<i>Día 0</i>	-12,002868	2,031991	140,000	-5,907	,000	-16,020223	-7,985512
<i>Día 7</i>	-5,932387	2,045305	140	-2,900	,004	-9,976064	-1,888710
<i>Día 14</i>	-3,446638	2,079308	140	-1,658	,100	-7,557542	,664266
<i>Día 21</i>	-1,621847	2,125302	140,000	-,763	,447	-5,823683	2,579988
<i>Día 28</i>	-,185851	2,151419	140,000	-,086	,931	-4,439322	4,067620
<i>Día 35</i>	-,327912	2,240777	140	-,146	,884	-4,758048	4,102224
<i>Día 42</i>	,289052	2,313661	140,000	,125	,901	-4,285180	4,863284
<i>Día 49</i>	0 ^b	0					
<i>R</i>	4,264213	1,080298	140,000	3,947	,000	2,128406	6,400020
<i>Vs</i>	2,072112	1,269485	140,000	1,632	,105	-,437727	4,581951
<i>Va</i>	,951799	1,087816	140,000	,875	,383	-1,198871	3,102470
<i>As</i>	-1,217614	1,212997	140	-1,004	,317	-3,615774	1,180547
<i>Aa</i>	0 ^b	0					

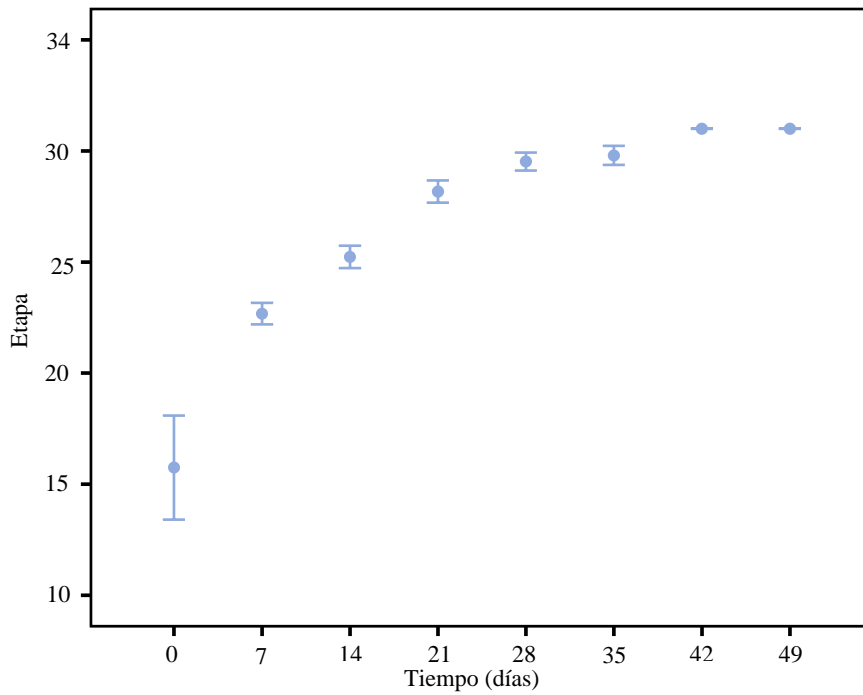


Figura 20: Curva de crecimiento para *G. melastomus*. Etapas de desarrollo alcanzadas en función del tiempo. Los tratamientos no afectan al crecimiento, por tanto no hay dispersión de valores. Las etapas se corresponden a las propuestas por Ballard *et al.*, 1993. Barras de error ± 1 Desv est.

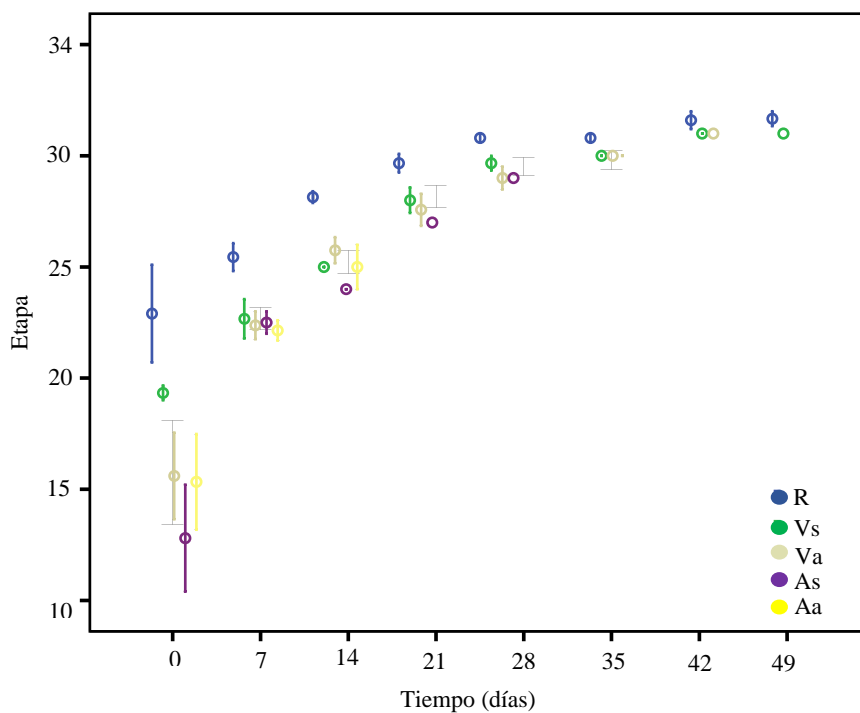


Figura 21: Curvas de crecimiento para *S. canicula*. Etapas de desarrollo alcanzadas en función del tiempo. Sólo el tratamiento R parece afectar al ritmo con el que los embriones alcanzan las sucesivas etapas de desarrollo, siendo más rápidos las primeras semanas, para luego estabilizarse. Las etapas se corresponden a las propuestas por Ballard *et al.*, 1993. Barras de error ± 1 Desv est.

4. DISCUSIÓN.

4.1. Obtención y viabilidad de los huevos.

Tanto *Galeus melastomus* como *Scyliorhinus canicula* son especies abundantes, que ponen huevos a lo largo de todo el año, y que registran un aumento en los eventos de reproductivos durante los meses de verano (Compagno *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2005). Pese a estas similitudes, ha habido una diferencia sustancial entre la especie y el número de huevos recogido en las distintas áreas, poniendo de manifiesto las distintas estrategias vitales de las dos especies objetivo. La preferencia por las aguas profundas por parte de *G. melastomus* (Metochis *et al.*, 2016) podría ser una de las razones por las que, en comparación, se obtuvieron muchos más ejemplares (una media de 66,5 huevos al día) en el área de Xàbia, donde la profundidad de captura era mucho mayor (600-800m) frente la de València (profundidad de captura máxima de 300 m), con una media de 1,5 huevos al día. Esta preferencia por rangos batimétricos distintos también se aprecia en *S. canicula*, especie propia de aguas someras, que raramente se encuentra a tanta profundidad como para poder ser capturada por un arrastrero de profundidad. El hecho de que su captura pueda ocurrir simultáneamente, pondría de manifiesto que existe un solapamiento de áreas de distribución, con ejemplares de ambas especies conviviendo en los límites habituales de sus rangos batimétricos (Olaso *et al.*, 2005)

El otro motivo que explica la diferencia en el número de capturas podría ser el modelo reproductivo de ambas especies. *S. canicula* es una especie con oviparismo extendido (o único), es decir, en cada evento reproductor únicamente hay un huevo en desarrollo en cada útero y el siguiente huevo se forma cuando el anterior ha sido depositado en el medio. En cambio *G. melastomus* es una especie con oviparismo retenido (o múltiple), es decir, hay múltiples huevos con un desarrollo secuencial madurando en los úteros (Dulvy y Reynolds, 1978). De esta forma, una hembra únicamente puede llevar dos huevos en *S. canicula*, en un mismo estadio de desarrollo, mientras que *G. melastomus* puede llevar hasta 13 en distintos estadios de desarrollo (Capapé *et al.*, 2007). Puesto que el tamaño puede ser una variable determinante, tanto en la supervivencia como en la viabilidad de los embriones, futuros estudios deberían tener en cuenta la posición de cada huevo en el útero (Figura 22). Esto sería especialmente importante si hubiese un efecto “cansancio” (Mellinger, 1983) en la hembra que hiciese invertir menos en cada huevo producido.



Figura 22: Huevos de *G. melastomus*. Los cinco huevos fueron extraídos de un mismo útero, mostrando una diferencia de maduración evidente por la distinta coloración.

Ningún huevo de *G. melastomus* fue recogido del medio natural mediante las redes de arrastre, a diferencia de *S. canicula* que fue recuperado hasta en 76 ocasiones. Los huevos de *S. canicula* poseen unos zarcillos alargados (Figura 23) que las hembras utilizan para engancharlos a diferentes sustratos presentes en el medio, tanto blandos como duros. En cambio, *G. melastomus* no posee estos zarcillos, por lo que debe

ser muy específico a la hora de disponer los huevos, eligiendo habitualmente corales duros profundos o estructuras similares. Los pesqueros que proporcionaron las muestras suelen faenar en fondos blandos, donde los únicos sustratos válidos para poder depositar los huevos no son rígidos, siendo sólo apropiados para la deposición de huevos de *S. canicula*. Por tanto cabe pensar que no haber conseguido recuperar huevos de *G. melastomus* es resultado de la metodología de captura.

De aquellos huevos recuperados con el embrión en un desarrollo avanzado (etapas 30 y sucesivas) la mortalidad fue del 100% (n=21), mientras que de estar el embrión en etapas de desarrollo inferiores la mortalidad fue del 19,51% (n=39). La etapa 30 es crítica en el desarrollo embrionario, pues es cuando la glándula de eclosión situada en la cabeza de los animales segrega las enzimas necesarias para permitir que



Figura 23: Huevo de *S. canicula*. Huevo recuperado del medio mediante redes de arrastre. Se pueden apreciar los zarcillos (flecha) y un embrión desarrollándose dentro (punta de flecha).

el huevo se abra al medio por unas estrechas aberturas (Ballard *et al.*, 2003). Los animales capturados durante esta etapa o posteriores tienen la cápsula abierta durante todo el proceso de manipulación, de forma que cuando son sacados al exterior, las cápsulas se vacían, dejando al animal en seco, a pesar de seguir dentro de su huevo (Figura 24A).

Además, en esta etapa, las secreciones de la glándula de eclosión digieren la gelatina protectora que rodea al embrión y el vitelo (Mellinger, 1983), por lo que se pierde la función de resistencia ante daño mecánico, haciendo más vulnerable al huevo a la captura (Figura 24B).

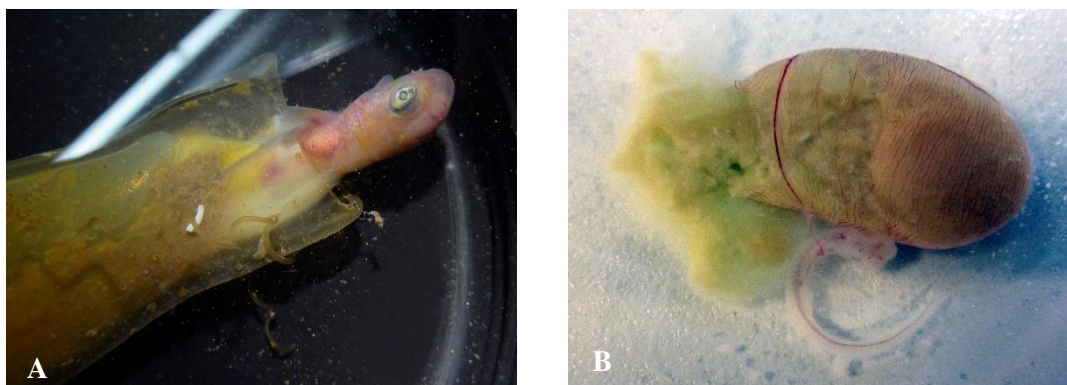


Figura 24: Problemas encontrados en la recuperación de huevos con redes de arrastre. El huevo de la figura A se vació de agua al extraerlo del medio, el embrión todavía inmaduro, quedó atrapado en la abertura del huevo. La membrana vitelina del huevo de la figura B se ha roto debido a algún traumatismo durante la captura, y el vitelo se escapa por la rotura.

Pese a que, en conjunto, los tratamientos a los que son sometidos los huevos no parecen influir en la viabilidad de los embriones, a nivel particular, el tratamiento “Vs” (Vísceras en seco) parece ser relevante ($p=0,049$), al menos en *S. canicula*. Esto confirmaría la hipótesis de que a mayor protección inicial, mayor sería la viabilidad posterior. Los huevos obtenidos mediante el transporte de las vísceras en un medio seco tienen menos posibilidades de desarrollar embrión. Puesto que la única diferencia con los huevos del tratamiento “Va” (Vísceras en agua) es que los huevos son transportados en agua, es de suponer que el medio líquido es el factor determinante. Debido a su elevado calor específico y densidad (Cromer, 1996) el agua podría servir tanto de amortiguador térmico, reduciendo la temperatura a la que los huevos son transportados al puerto, como físico, al amortiguar los golpes y vibraciones que pudieran sufrir los huevos.

La zona de captura de las muestras jugó un papel muy importante en la viabilidad de los huevos de *G. melastomus*, pero puesto que no hubo huevos de *S. canicula* en las dos áreas, para esta especie no pudo ser determinado. La diferencia principal aparente entre ellas es la profundidad de captura, por lo que resulta poco intuitivo que huevos que se hayan capturado a más profundidad (y por tanto puedan sufrir los efectos de barotraumas o choques térmicos) tengan más probabilidades de desarrollar un embrión.

Podría ser en cambio, que fuese el protocolo de muestreo y transporte lo que fuese significativamente distinto entre ambas áreas. Se detectó que en ocasiones la temperatura del agua en la que se entregaban las muestras estaba por encima de los 30°C (hasta los 37,6 ° C). En otras ocasiones, los pescadores realizaban un doble lance, maniobra que implicaba calar y recoger las redes dos veces en un mismo día, en vez de una única vez. Si los huevos eran capturados durante el primer lance, permanecían en la superficie más tiempo que los del segundo lance, provocando un sesgo en las muestras. Además los muestreos se realizaron en el junio para el área de Xàbia y en julio-agosto para la de València, siendo la temperatura del ambiente y el agua mayor en ésta última área zona de muestreo. Por tanto, podría ser que el “área” estuviera enmascarando factores metodológicos que no han podido ser controlados, que redujeran la viabilidad de los huevos.

4.2. Supervivencia y crecimiento.

Con respecto a la supervivencia a largo plazo de los embriones los resultados no ofrecieron diferencias significativas, por lo que parece ser que una vez superada la etapa inicial, los huevos se desarrollan con normalidad. Si bien hay pocos estudios al respecto, hay autores que han informado de tasas de supervivencia para *S. canicula* de 97%, 63,2 o 56,6% en función de la temperatura (Brüggemann, 2013), mientras que para otras especies la supervivencia es del 62,4% (Payne, 2012) o incluso menor (Harahush *et al.*,2007).

Las causas de la mortalidad de los embriones no han podido ser esclarecidas en todos los casos, pero hubo una que afectó a la práctica totalidad de animales fallecidos. Tras cierto tiempo de desarrollo, variable en función de cada huevo en particular, se observó la aparición de una película blanca de aspecto aterciopelado sobre algunas de las cápsulas. Éste problema ha sido descrito por Payne, 2011 para huevos de otra especie, pero sin ofrecer motivo de aparición. Al analizar detenidamente los huevos afectados, se comprobó que en todos los casos, el vitelo del interior de la cápsula mostraba una distribución amorfa en el interior y la parte clara del huevo aparecía turbia. Paralelamente a este efecto, se producía un aumento en la turgencia de la cápsula, que se hinchaba y el huevo perdía su viabilidad. Se realizó un estudio etiológico del problema, considerando inicialmente la posibilidad de que se tratase de una patología de origen bacteriano.

Las pruebas realizadas sobre la cápsula revelaron que, efectivamente, la película era de origen bacteriano, pero no se encontró crecimiento microbiológico en el interior de las cápsulas afectadas, por lo que no se podía determinar si la aparición de una película bacteriana era causa o resultado de la patología.

Al abrir los huevos se observó que en el interior de la cápsula, inmerso en una masa informe de vitelo mezclado con agua, podía apreciarse una pequeña esfera correspondiente a la membrana vitelina, en ocasiones con un embrión todavía vivo unido a ella. Los resultados sugerían que, en algún momento, la membrana vitelina sufría algún tipo de daño, lo que permitía que el vitelo del interior saliese y entrase en contacto con el medio líquido interno del huevo (figura 25). El aumento de solutos en el interior de la cápsula provocaba una entrada masiva de agua del medio externo, lo que hinchaba el huevo y aumentaba la turgencia. Cuando la presión del vitelo sobre las paredes del interior de la membrana vitelina disminuían, el poro que permitía la salida del vitelo se cerraba, creándose la pequeña esfera en el interior de la masa de vitelo fugado. Los motivos por los cuales se produce la perforación, que permite la salida de vitelo, no han podido ser establecidos. Podría deberse a un problema de manipulación de los huevos, traumatismos durante el proceso de pesca, la actividad del embrión en desarrollo o la respuesta a un barotrauma por el cambio de presión tras la captura.

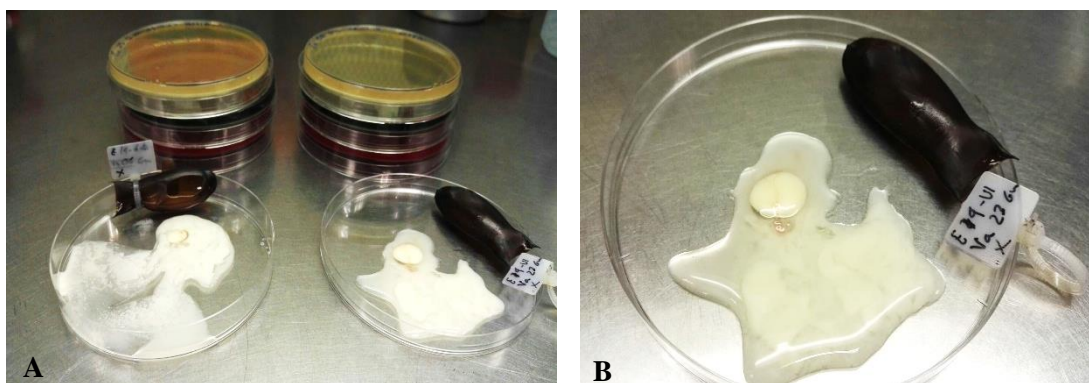


Figura 25: Huevos inviables analizados. A y B: En las placas Petri se puede observar la cápsula del huevo y un líquido blanco, que se corresponde con el vitelo en mal estado de su interior. En B puede apreciarse el embrión en desarrollo adherido a la membrana vitelina perforada.

De observarse el problema en las etapas iniciales del desarrollo, el huevo resultaba inválido y no aparecía fase embrionaria. Pero de aparecer en un estado intermedio, el embrión continuaba desarrollándose, pero con la reserva de vitelo mermada (figura 24)

Mientras el huevo permanecía sellado del medio exterior el animal crecía satisfactoriamente, incluso rodeado de vitelo libre. Pero al abrirse el huevo al medio exterior y entrar agua, el vitelo resultaba ser un caldo de cultivo excelente para

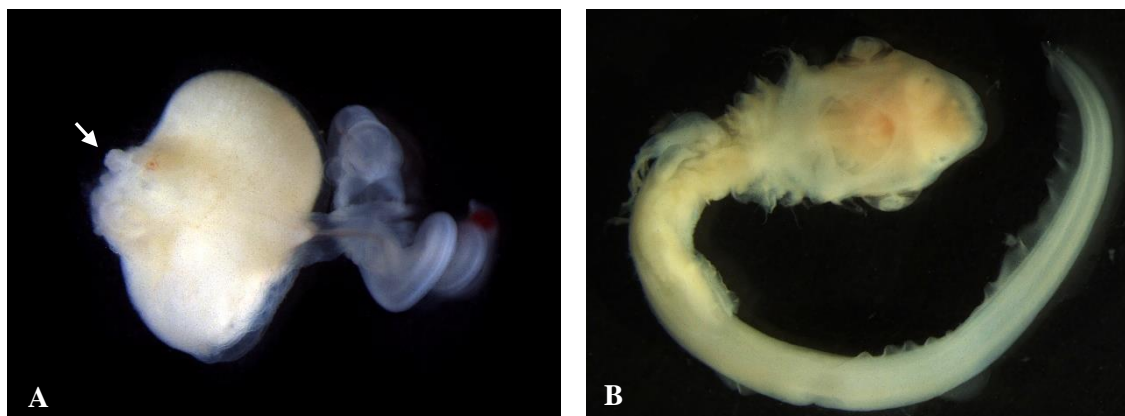


Figura 26: Embriones inviables analizados. A: la membrana vitelina del embrión está rota (flecha) y el contenido se drena al exterior pese a que el embrión sigue desarrollándose. B: embrión fallecido después de alcanzar la etapa de pre-eclosión y abrirse al medio exterior. Se puede apreciar la palidez y degradación de los tejidos apenas 24 horas tras abrirse la cápsula.

microrganismos externos y el animal moría aproximadamente a las 24 horas (figura 24B). En los huevos manipulables, se procedió a realizar un bombeo manual del líquido, para extraer el vitelo y permitir la entrada de agua. El bombeo, apretando secuencialmente la cápsula resultó efectivo en todos los casos, expulsando el vitelo fugado y permitiendo la entrada de agua limpia.

Se deberán realizar futuros estudios para ver si la reducción en la cantidad de vitelo durante la fase embrionaria hace que el embrión se adapte a las nuevas condiciones (por ejemplo disminuyendo su tamaño) o si mantienen un desarrollo normal hasta que agota sus reservas. Pese a que se intentaron realizar medidas paliativas, como transferencias de vitelo desde huevos no fecundados a embriones afectados, los resultados de tales experiencias todavía están siendo analizados.

La elección duración del periodo de mantenimiento en cautividad (55 días en el caso de *G. melastomus* y 77 días en caso de *S. canicula*) se debió a circunstancias ajenas al estudio. 55 días después de que el primer huevo se depositase en el acuario, el sistema de mantenimiento del acuario conteniendo *G. melastomus* falló, y la temperatura del acuario se elevó hasta los 25,2°C (desde 18,3°C) a lo largo de un periodo de 24 horas. El estrés generado por el choque térmico en los animales (figura 26) hizo que la mortalidad en los siguientes dos días fuese del 87,04% mientras que en una semana la mortalidad era del 100%. Debido a que este fallo inesperado afectaría a todos los análisis posteriores, se

decidió considerar como finalizado el experimento el día previo al error. Únicamente los *G. melastomus* situados en el sistema de agua fría (16,9°C) siguen, a fecha de redacción de este manuscrito, con su desarrollo.



Figura 27: Embrión fallecido de *G. melastomus*. El animal murió como resultado de un choque de térmico. Se aprecia la palidez del cuerpo que en esta etapa (31) debería ser rojo y vascularizado, especialmente las branquias.

Los huevos obtenidos para ambas especies fueron pesados antes de ser introducidos en el acuario, ofreciendo resultados similares a los pesos obtenidos por otros autores en el mar Mediterráneo. No se apreciaron diferencias en el peso de los huevos a lo largo del proceso de desarrollo, a pesar de que en las últimas semanas hay una mayor desviación de los datos. La cápsula aísla del medio al animal,

permitiendo únicamente el intercambio de agua y moléculas de bajo peso molecular, y si bien es cierto que se ha detectado un aumento del peso inicial en *S. canicula* (Lechenault *et al.*, 1997) ocurre en las etapas tardías del desarrollo. Además el animal debe basar su crecimiento en la reserva vitelina, pero el crecimiento en las primeras fases consume poco vitelo para la respiración celular, por tanto no se puede apreciar un descenso sustancial. El error inherente a extraer del medio el huevo, secarlo, y pesarlo, enmascararía cualquier variación del peso poco significativa. Por otra parte, el aumento de la variabilidad de las últimas semanas se podría deber a la reducción en el número de huevos pesados (por mortalidad o por haber alcanzado la etapa de pre-eclosión) o debido al crecimiento de especies, como anémonas o hidrozoos sobre las cápsulas.

Con respecto al desarrollo en etapas de los embriones (figura 27), se pudo seguir sin problemas los criterios de Ballard *et al.*, 1993. Aunque no es el único autor en considerar la creación de estas tablas (Balfour, 1876; Scammon, 1911; Mellinger *et al.*, 1986) es uno de los más precisos y fácil de seguir, además de que se centró exclusivamente en *S. canicula* sin necesidad de recurrir a otras especies para completar los datos faltantes.

El patrón de crecimiento observado, con un inicio rápido seguido de un desarrollo más paulatino ha sido descrito para *S. canicula* (Harris, 1952; Ballard *et al.*, 1993) y otras

especies, como *Callorhinchus mili* Bory de Saint-Vincent, 1823 (Didier *et al.*, 1998), *Squalus acanthias* Linnaeus, 1758 (Scammon, 1911) o *Chiloscyllium punctatum* Muller y Henle, 1838 (Harahush *et al.*, 2007), por lo que no es extraño encontrarlo en *G. melastomus* también.

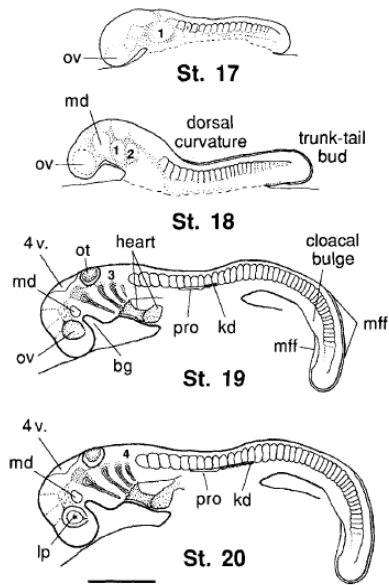


Figura 27: Secuencia de desarrollo embrionario de Ballarte et al. 1993. La secuencia representa las etapas (St.) desde 17 al 20. Reproducido a partir de Ballart *et al.* 1993

semanalmente.

Por último, para *S. canicula*, los animales con tratamiento R mostraban una desviación en la curva de crecimiento. Más que un efecto del tratamiento sobre los embriones, probablemente deba al estado de maduración de los huevos en el momento de su extracción del medio. Mientras que en los huevos obtenidos de las hembras se puede estimar aproximadamente su etapa de desarrollo (ya que dentro de la hembra sólo están 4 etapas), en el caso de los huevos del exterior, pueden encontrarse de la etapa 5 a la 16. Esta variación, sumado al hecho de que en los primeros estadios el crecimiento entre etapas es muy rápido, podría aportar resultados inválidos.

4.3 Conclusiones.

Éste es el primer estudio que plantea la posibilidad de recuperar huevos de tiburón obtenidos a partir de descartes de pesca, para realizar un proyecto de conservación *ex situ*.

Si bien se necesitaría continuar investigando, los primeros datos obtenidos han permitido evaluar los tres objetivos inicialmente.

1. Viabilidad de los huevos: la capacidad del huevo de continuar con el desarrollo temprano del embrión, no se ha visto afectada de forma evidente por los diversos tratamientos. No obstante, se ha confirmado para *S. canicula* la hipótesis de que cuanta mayor es la protección de los huevos durante y tras la captura, mayor es la posibilidad de iniciar el desarrollo satisfactoriamente. La temperatura y las técnicas de transporte podrían ser un factor crítico en esta fase, pero se deberán realizar más estudios al respecto.

2. Supervivencia de los embriones: la supervivencia no se ve afectada por el tratamiento al que se someten los huevos, obteniéndose tasas de supervivencia similares, o incluso superiores, a las descritas en previos estudios. Por tanto, una vez se inicia el desarrollo embrionario, éste no se ve influido por cómo haya sido obtenido el huevo.

3. Crecimiento: las curvas de crecimiento de los embriones no difieren entre diferentes tratamientos, alcanzando con normalidad las estepas previstas. Esto parece corroborar el punto anterior y una vez iniciado el desarrollo embrionario, el tratamiento original no influye en el crecimiento.

Los resultados aportados por el estudio ponen de manifiesto que la recuperación de huevos de tiburones, obtenidos en descartes de pesca, es factible tanto obtenidos del útero de hembras capturadas, como mediante recuperación directa con redes. Hay por tanto, elementos de juicio que recomienden intentar desarrollar una estrategia de conservación con elasmobranquios, empleando un recurso habitualmente descartado, con una inversión y esfuerzo asequible para cualquier acuario público.

5. CONSIDERACIONES FINALES.

Los resultados conseguidos en este proyecto han motivado que un acuario público como es l'Oceanogràfic quiera continuar con ésta línea de investigación y potenciar un proyecto de conservación mayor, incluyendo una labor de educación y divulgación, así como reintroducciones controladas de animales en el mar y la colaboración de pescadores. En la actualidad, se dispone de cinco sistemas de acuarios independientes, con temperaturas desde los 14 a los 19°C y distintos sistemas de iluminación. Se pretende de esta manera simular condiciones más cercanas a las que los embriones tendrán en el mar.

Se ha conseguido por primera vez mantener y documentar el desarrollo embrionario de *G. melastomus*. De eclosionar los embriones y mantenerse en cautividad, sería la primera vez que se logra mantener en un acuario, lo que permitiría estudiar de primera mano a este tiburón de profundidad.

Las técnicas y conocimientos adquiridos a lo largo de la experiencia, han permitido poner en marcha diversos proyectos para mejorar las condiciones de manejo en especies ya presentes en los acuarios.

6. AGRADECIMIENTOS:

Cuando empecé a pensar en el apartado de agradecimientos mi idea era hacer algo breve en una única frase pero, conforme la fecha de entrega se acercaba, me di cuenta de lo injusto que sería no reconocer por escrito la importancia de mucha gente en éste trabajo.

Para empezar, he de agradecer a mis increíbles compañeros de Lamna, una asociación que ha crecido a la vez que lo hacían los embriones, despacio, esforzándose y boqueando. Sin Jaime y sin Alba esto no habría sido posible, prometo que los primeros tiburones que nazcan llevarán sus nombres.

Gracias por supuesto al incansable Javier Aznar, la primera persona a la que le propuse el proyecto y me animó a seguir con él hasta el final.

Sin pescadores comprometidos este proyecto no tendría sentido, así que no puedo dejar de agradecer a Amadeu y a Nando, patronos del Cap Prim Segón y del Pausep, su tiempo, su esfuerzo y su dedicación. Gracias por seguir queriendo conocer y cuidar el mar.

He de agradecer la ayuda y la confianza de l'Oceanogràfic y su Fundación, dónde se ha realizado todo el proyecto. Gracias a Mónica, Teresa, Carlos y Vicente, por no desesperar al verme ocupar su laboratorio día tras día y por los viajes al puerto a media tarde. A Daniel por esa habilidad suya de hacer pensar a lo grande y aspirar siempre a más. Pero, especialmente, gracias a José Luís, por soportar lo insoportable, a un biólogo intentando hacer de veterinario y hacerlo con buena cara. Nunca voy a poder agradecer lo suficiente a la gente de Cuarentena, especialmente a Manuela, por todo el tiempo compartido bajo tierra, por todos los consejos, el material y la paciencia pero sobre todo por compartir conmigo lo duro que es estar criando animales sin saber si vas a conseguir que sobrevivan.

MUCHÍSIMAS GRACIAS a la gente que me ayuda día a día. Abriendo caminos para que otros los sigamos, como Joan. Dándome fuerzas para continuar, incluso desde el otro lado del mundo, como David. Simplemente estando ahí, pese a mis muchos errores, como mi familia. O haciéndome sentir la persona más afortunada del mundo día tras día...A ti, que me haces reír y me has visto llorar, gracias Vicent.

Por último, gracias al inventor de la brida de nylon, Maurus C. Logan, mi vida ha sido más fácil gracias a él.

7. BIBLIOGRAFÍA.

2004/585/EC. *Official Journal of the European Union* L354, 22–61.

American Elasmobranch Society. (2008) *The 2008 AES International Captive Elasmobranch Census*. <http://elasmobranch.org/census>. Accedido el 9 de septiembre de 2017.

Balfour, F. M. (1876). The development of elasmobranch fishes. *Journal of anatomy and physiology*, 10(Pt 3), 514-1.

Ballard, W. W., Mellinger, J., & Lechenault, H. (1993) A series of normal stages for development of *Scyliorhinus canicula*, the lesser spotted dogfish (Chondrichthyes: Scyliorhinidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 267(3), 318-336.

Barrull, J., & Mate, I. (2002) *Tiburones del Mediterráneo*. Set-ciències.

Benoît, H. P., Plante, S., Kroiz, M., Hurlbut, T. (2013) A comparative analysis of marine fish species susceptibilities to discard mortality: effects of environmental factors, individual traits and phylogeny, *ICES Journal of Marine Science*, Volume 70, pp. 99–113.

Brüggemann, K. (2013) *The effects of elevated temperature on development and gas exchange in embryonic sharks* (Doctoral dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel).

Capapé, C., Salem, B. M., Amor, B. M. M. (2007) Sizes of eight oviparous elasmobranch species hatched in two Mediterranean areas: a survey and recent data, *Annales Series Historia Naturalis*, Volume 17, pp. 29-35.

Carbonell, A., Alemany, F., Merella, P., Quetglas, A., Román, E. (2002) The by-catch of sharks in the western Mediterranean (Balearic Islands) trawl fishery, *Fisheries Research*, Volume 61, pp. 7-18.

Caro, T.M., Pelkey, N., Grigione, M. (1994) Effects of conservation biology education on attitudes towards nature, *Conservation Biology*, Volume 8, pp. 846-852.

Compagno, L. J. V. (1990) Shark exploitation and conservation. *Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries* (HL Pratt, Jr., SH Gruber, and T. Taniuchi, eds.), 391-414.

Compagno, L. J. V., Dando, M., Fowler, S. (2005) *Guía de campo de los tiburones del mundo*. Barcelona: OMEGA, pp. 107-108.

Cortés, E. (2000) Life history patterns and correlations in sharks. *Reviews in Fisheries Science*, 8(4), 299-344.

Cortés, E., Brooks, L., & Scott, G. (2002) *Stock assessment of large coastal sharks in the US Atlantic and Gulf of Mexico*. Panama City, Florida: National Marine Fisheries Service, Southeast Fisheries Science Center.

Costa, M. E., Erzini, K., y Borges, T. C. (2005) Reproductive biology of the blackmouth catshark, *Galeus melastomus* (Chondrichthyes: Scyliorhinidae) off the south coast of Portugal. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85(5), 1173.

Cromer, A. H. (1996) *Física para las ciencias de la vida*. Barcelona: Reverté.

Daly, J., Jones, R. (2017) The use of reproductive technologies in breeding programs for elasmobranch in aquaria. En *The Elasmobranch Husbandry Manual II: Recent Advances in the Care of Sharks, Rays and their Relatives*. Edita Smith, M., D. Warmolts, D. Thoney, R. Hueter, M. Murray, y J. Ezcurra. 2017. Special Publication of the Ohio Biological Survey. viii + 504 p.

Dehart, A. (2004) Species Selection and Compatibility En *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives*. Edita Mark Smith, Doug Warmolts, Dennis Thoney, Robert Hueter pp 227-236. Ohio Biological Survey.

Didier, D. A., LeClair, E. E., & Vanbuskirk, D. R. (1998) Embryonic staging and external features of development of the chimaeroid fish, *Callorhynchus milii* (Holocephali, Callorhynchidae). *Journal of Morphology*, 236(1), 25-47.

Dulvy, N. K., y Reynolds, J. D. (1997). Evolutionary transitions among egg-laying, live-bearing and maternal inputs in sharks and rays. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 264(1386), 1309-1315.

Dulvy, N. K., & Forrest, R. E. (2010) Life histories, population dynamics and extinction risks in chondrichthyans. *Sharks and their Relatives*, 2, 639-679.

Dulvy, N. K., Fowler, S. L., Musick, J. A., Cavanagh, R. D., Kyne, P. M., Harrison, L. R., ... y Pollock, C. M. (2014). Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *Elife*, 3, e00590.

E.U. (2013). Regulation (E.U.) No 1380/2013 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2013 on the Common Fisheries Policy.

Ebert, D. A., Fowler, S., Compagno, L. J. V. (2013) *Sharks of the World: A Fully Illustrated Guide*. Plymouth, UK: Wild Nature Press, 528 pp.

Ellis, J. R., McCully Phillips, S. R., Poisson, F. (2016) A review of capture and post-release mortality of elasmobranchs. *Journal of Fish Biology*, Volume 90, pp. 653–722.

Ellis, J., Mancusi, C., Serena, F., Haka, F., Guallart, J., Ungaro, N., Coelho, R., Schembri, T. y MacKenzie, K. (2009) *Scyliorhinus canicula*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: e.T161399A5415204. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009-2.RLTS.T161399A5415204.en>. Downloaded on 05 September 2017.

Ellis, J., Ungaro, N., Serena, F., Dulvy, N., Tinti, F., Bertozzi, M., Pasolini, P., Mancusi, C. y Noarbartolo di Sciara, G. (2007) *Raja montagui*. The IUCN Red List of Threatened Species 2007: e.T63146A12623141. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2007.RLTS.T63146A12623141.en>. Downloaded on 05 September 2017.

Engqvist, L. (2005) The mistreatment of covariate interaction terms in linear models analyses of behavioral and evolutionary ecology studies, *Animal Behavior*, Volume 70, pp. 967-971.

- Evans, K.L.** (1997) Aquaria and marine environmental education, *Aquarium Sciences and Conservation*, Volume 1, pp. 239-250.
- Frankel, O., & Soulé, M. E.** (1992) *Conservation and evolution*. CUP Archive. Cambridge, UK. 327p
- Ferretti, F., Myers, R. A., Serena F., Lotze, H. K.** (2008) Loss of large predatory sharks from the Mediterranean sea, *Conservation Biology*, Volume 22, pp. 952–964.
- Ferretti, F., Worm, B., Britten, G. L., Heithaus, M. R., y Lotze, H. K.** (2010). Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. *Ecology letters*, 13(8), 1055-1071.
- Friedrich, L. A., Jefferson, R., Glegg, G.** (2014) Public perceptions of sharks: Gathering support for shark conservation, *Marine Policy*, Volume 47, pp. 1-7.
- García, V. B., Lucifora, L. O., & Myers, R. A.** (2008) The importance of habitat and life history to extinction risk in sharks, skates, rays and chimaeras. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1630), 83-89.
- Gippoliti, S.** (2012) *Ex situ* conservation programmes in European zoological gardens: Can we afford to lose them?, *Biodiversity and Conservation*, Volume 21, pp 1359–1364.
- Gislasson, H.** (1995) Ecosystem effects of fishing in the North Sea, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 29, pp. 520-527.
- Glowka, L, Synge, H., Burhenne-Guilmin, F.** (1994) A guide to the convention on biological diversity. IUCN, Gland
- Grupo de trabajo ZEE,** (2001) *Mapa batimétrico del Mar Balear y Golfo de Valencia, Mediterráneo Occidental. Zona Económica Exclusiva Española*. Edita. Instituto Español de Oceanografía.
- Harahush, B. K., Fischer, A. B. P., y Collin, S. P.** (2007) Captive breeding and embryonic development of *Chiloscyllium punctatum* Muller y Henle, 1838 (Elasmobranchii: Hemiscyllidae). *Journal of Fish Biology*, 71(4), 1007-1022.

Harris, J. E. (1952) A note on the breeding season, sex ratio and embryonic development of the dogfish *Scyliorhinus canicula* (L.). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 31(2), 269-275.

Henningsen, A. D., Smale, M., Garner, R., Kinnunen, N. (2004) Reproduction, Embryonic Development, and Reproductive Physiology of Elasmobranchs. En *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives*, edita Mark Smith, Doug Warmolts, Dennis Thoney, Robert Hueter pages 227-236. Ohio Biological Survey

Henry, L. A., Navas, J. M., Hennige, S. J., Wicks, L. C., Vad, J., y Roberts, J. M. (2013) Cold-water coral reef habitats benefit recreationally valuable sharks. *Biological conservation*, 161, 67-70.

Hoffmann, M., Hilton-Taylor, C., Angulo, A., Böhm, M., Brooks, T. M., Butchart, S. H., ... y Darwall, W. R. (2010). The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *Science*, 330(6010), 1503-1509.

Hurlbert, S. H. (1984) Pseudoreplication and the design of ecological field experiments, *Ecological monographs*, Volume 54, pp. 187-211.

IUCN/SSC (2014) Guidelines on the Use of Ex Situ Management for Species Conservation. Version 2.0. Gland, Switzerland: IUCN Species Survival Commission.

Kerstetter D.W., Luckhurst B.E., Prince E.D., Graves J.E. (2003) Use of pop-up satellite archival tags to demonstrate survival of blue marlin (*Makaira nigricans*) released from pelagic longline gear, *Fishery Bulletin*, Volume 101, pp. 939–948.

Koehler, L., Nowell, G. (2016) *Saved and released – successful hatching of selected oviparous shark species with egg cases recovered from dead females*. Poster presentation at the 20th European Elasmobranch Association conference, Bristol, UK.

Kriwet, J., Witzmann, F., Klug, S., & Heidtke, U. H. (2008) First direct evidence of a vertebrate three-level trophic chain in the fossil record. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1631), 181-186.

Lechenault, H., Wriesez, F., & Mellinger, J. (1993) Yolk utilization in *Scyliorhinus canicula*, an oviparous dogfish. En *The reproduction and development of sharks, skates, rays and ratfishes* (pp. 241-252). Springer Netherlands.

Lo, A. Y., Chow, A. T., Cheung, S. M. (2012) Significance of perceived social expectation and implications to conservation education: turtle conservation as a case study, *Environmental management*, Volume 50, pp. 900-913.

Megalofonou, M., Persefoni, D. (2005) Incidental catch and estimated discards of pelagic sharks from the swordfish and tuna fisheries in the Mediterranean Sea, *Fishery Bulletin*, Volume 103, pp. 620-634.

Melendez, M.J., Báez, J.C., Serna-Quintero, J.M., Camiñas, J.A., Fernández, I.d.L., Real, R., Macías, D. (2017) Historical and ecological drivers of the spatial pattern of Chondrichthyes species richness in the Mediterranean Sea, *PLoS ONE* Volume 12: e0175699.

Mellinger, J. (1983) Egg-case diversity among dogfish, *Scyliorhinus canicula* (L.): a study of egg laying rate and nidamental gland secretory activity. *Journal of Fish Biology*, 22(1), 83-90.

Mellinger, J., Wriesez, F., y Alluchon-Gerard, M. J. (1986) Developmental biology of an oviparous shark, *Scyliorhinus canicula*. In *Proceedings of the Second Conference on Indo-Pacific Fishes*.

Metochis, C. P., Carmona-Antoñanzas, G., Kousteni, V., Damalas, D., y Megalofonou, P. (2016) Population structure and aspects of the reproductive biology of the blackmouth catshark, *Galeus melastomus* Rafinesque, 1810 (Chondrichthyes: Scyliorhinidae) caught accidentally off the Greek coasts. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1-17.

Moreno, J.M. (1995) *Guía de los tiburones de aguas ibéricas, Atlántico Nororiental y Mediterráneo (Guide of sharks from Iberian waters, northeastern Atlantic and Mediterranean)*. Madrid: Editorial Pirámide, 310 pp.

Musick, J. A. (1999) Criteria to define extinction risk in marine fishes: the American Fisheries Society initiative. *Fisheries*, 24(12), 6-14.

- Nieto, A., Ralph, G. M., Comeros-Raynal, M. T., Heessen, H. J. L., & Rijnsdorp, A. D.** (2015) *European Red List of marine fishes*. Publications Office of the European Union.
- Nicholas K Dulvy, N. K., Fowler, S. L., Musick, J. A., Cavanagh, D.R., ...y Nieto, A.P.**(2015) *European Red List of Marine Fishes*. Publications Office of the European Union. Luxembourg
- O'Bryhim, J. R., Parsons, E. C. M.** (2015) Increased knowledge about sharks increases public concern about their conservation, *Marine Policy*, Volume 56, pp. 43-47.
- Oh, F., Soulé, M.** (1992) *Conservation and evolution*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 327 pp.
- Olaso, I., Velasco, F., Sánchez, F., Serrano, A., Rodríguez-Cabello, C., y Cendrero, O.** (2005) Trophic relations of lesser-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) and blackmouth catshark (*Galeus melastomus*) in the Cantabrian Sea. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 35, 481-494.
- Orr, D.W.** (1990) The virtue of conservation education, *Conservation Biology*, Volume 4, pp. 219-220.
- Patrick, P. G., Matthews, C. E., Ayers, D. F., Tunnicliffe, S. D.** (2007) Conservation and education: prominent themes in zoo mission statements, *The Journal of Environmental Education*, Volume 38, pp. 53-60.
- Pauly, D., & Christensen, V.** (1995). Primary production required to sustain global fisheries. *Nature*, 374(6519), 255.
- Payne, E. J.** (2012) Husbandry and growth rates of neonate epaulette sharks, *Hemiscyllium ocellatum* in captivity. *Zoo biology*, 31(6), 718-724.
- Penning, M., Reid, G. McG., Koldewey, H., Dick, G., Andrews, B., Arai, K., Garratt, P., Gendron, S., Lange, J., Tanner, K., Tonge, S., Van den Sande, P., Warmolts, D. y Gibson, C.** (2009) *Turning the Tide: A Global Aquarium Strategy for Conservation and Sustainability*. World Association of Zoos and Aquariums, Bern, Switzerland.
- Pritchard, D., Fa, J., Oldfield, S., Harrop, S.** (2012) Bring the captive closer to the wild: Redefining the role of *ex situ* conservation, *Oryx*, Volume 46, pp. 18-23.

Revill, A. S., Dulvy, N. K., Holst, R. (2005) The survival of discarded lesser-spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*) in the Western English Channel beam trawl fishery, *Fisheries Research*, Volume 71, pp. 121-124.

Scammon, R. E. (1911) Normentafeln zur Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere. 12. Normal plates of the development of.

Serena, F., Mancusi, C., Ungaro, N., Hareide, N.R., Guallart, J., Coelho, R. y Crozier, P. (2009) *Galeus melastomus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009-2.RLTS.T161399A5415204.en>. Downloaded on 05 September 2017.

Shark Trust (2010) *An Illustrated Compendium of Sharks, Skates, Rays and Chimaera. Chapter 1: The British Isles and Northeast Atlantic. Part 2: Sharks.*

Singer, J. D. (1998) Using SAS PROC MIXED to Fit Multilevel Models, Hierarchical Models, and Individual Growth Models, *Journal of Educational and Behavioral Statistics*, Volume 24, pp. 323-355.

Skomal, G. B. (2007) Evaluating the physiological and physical consequences of capture on post-release survivorship in large pelagic fishes, *Fisheries Management and Ecology*, Volume 14, pp. 81–89.

Smale, M.J., Ungaro, N., Serena, F., Dulvy, N., Tinti, F., Bertozzi, M., Mancusi, C., Noarbartolo di Sciara, G. (2009) *Raja miraletus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: e.T161599A5461484. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009-2.RLTS.T161599A5461484.en>. Downloaded on 05 September 2017.

Stevens, J. D., Bonfil, R., Dulvy, N. K., & Walker, P. A. (2000) The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*, 57(3), 476-494.

Tursi, A., D’Onghia, G., Matarrese, A., Piscitelli, G. (1993) Observations on population biology of the blackmouth catshark *Galeus melastomus* (Chondrichthyes, Scyliorhinidae) in the Ionian Sea, *Cybium*, Volume 17, pp. 187-196.

Worm, B., Davis, B., Ketteimer, L., Ward-Paige, C.A., Chapman, D., Michael R. Heithaus, M.R., Kessel, S.T., Gruber, S.H. (2013) Global catches, exploitation rates, and rebuilding options for sharks, *Marine Policy*, Volume 40, 194-204.

Yalowitz, S. S. (2004) Evaluating visitor conservation research at the Monterey Bay Aquarium, *Curator*, Volume 47, pp. 283–297.



Autor: Pablo García-Salinas
Tutor: Fco. Javier Aznar Avendaño



Trabajo fin de máster universitario en acuicultura Valencia 2017