

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas

Programa de Doctorado: “Biología aplicada a la sostenibilidad de recursos naturales (Mención de calidad)”

**Reproducción en cautividad del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*): inducción hormonal a la ovulación y obtención de huevos para la fecundación artificial**

**TESIS DOCTORAL**

**Inmaculada Rasines Pérez**

**Oviedo 2013**

---

## AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que a lo largo de estos años han prestado su ayuda y apoyo para que esta Tesis Doctoral se llevara a cabo.

Mis primeras palabras de agradecimiento son para mi directora de tesis, compañera y amiga, Dra. Olvido Chereguini, por su inestimable apoyo, no solo a lo largo de estos años de realización de la tesis, sino desde que empezamos a trabajar juntas hace ya muchos años. Quiero agradecer a la Dra. Consolación Fernández González que se ha brindado a tutelar la Tesis.

A mis amigos biólogos Juan Carlos Canteras y Fernando Gutiérrez por la atenta lectura de este trabajo y por sus útiles consejos.

A todos mis compañeros de la Planta de Cultivos “El Bocal” del IEO de Santander, especialmente a Ignacio Martín, Cristina Rodríguez, Marcos Gómez y José Ramón Gutiérrez, por estar siempre dispuestos a echar una mano, sin importar la hora, por intempestiva que fuera.

Al Instituto Español de Oceanografía, que ha puesto a mi disposición los medios necesarios para hacer este trabajo.

Gracias a las empresas de acuicultura con las que hemos colaborado por las facilidades prestadas para realizar los trabajos de esta tesis.

Quiero recordar y agradecer a mis compañeros del Centro Oceanográfico de Gijón los buenos ratos que pasamos juntos y especialmente a Rafa Forés, enamorado de la acuicultura, gran amigo y buenísima persona que nos dejó demasiado pronto.

A mi familia y amigos, que siempre han sabido respetar y comprender mi trabajo.

A todos ellos reitero mi más sincero agradecimiento

---



<b>Prólogo</b> .....	5
<b>Resumen/Summary</b> .....	9
<b>Capítulo 1. Introducción</b> .....	17
1.1 La acuicultura en España.....	19
1.2 Especie objeto del estudio. El lenguado senegalés, <i>Solea senegalensis</i>	
1.2.1 Sistemática, morfología externa y biología en el medio natural.....	20
1.2.2 Cultivo del lenguado senegalés.....	22
1.2.3 Problemática en el control de la reproducción del lenguado de cultivo.....	24
1.3 Control de la reproducción de peces mediante tratamientos hormonales y fecundación artificial.....	26
1.3.1 Algunas generalidades de la reproducción de los Teleósteos.....	27
1.3.2 Alteraciones más frecuentes del proceso reproductivo.....	31
1.3.3 Inducción hormonal a la ovulación.....	32
1.3.3.1 Técnicas hormonales utilizadas.....	33
1.3.3.2 Métodos de aplicación de la terapia hormonal.....	35
1.3.3.3 Factores importantes a controlar en la aplicación de las técnicas hormonales.....	36
1.3.4 Fecundación artificial.....	38
<b>Capítulo 2. Objetivos</b> .....	41
<b>Capítulo 3. Materiales y métodos comunes</b> .....	45
3.1 Origen y estabulación de reproductores.....	47
3.2 Control de la maduración.....	48
3.3 Inducción hormonal.....	49
3.4 Obtención de huevos por masaje abdominal.....	50
3.5 Obtención, valoración de la calidad y crioconservación de esperma.....	52

3.6 Fecundación artificial.....	56
<b>Capítulo 4. Método de administración de la terapia hormonal.....</b>	<b>59</b>
4.1 Resumen.....	61
4.2 Introducción.....	61
4.3 Materiales y métodos específicos.....	62
4.4 Resultados.....	64
4.5 Discusión y conclusiones.....	69
<b>Capítulo 5. Tiempo de ovulación y viabilidad de los huevos retenidos en la cavidad ovárica. Influencia de la temperatura.....</b>	<b>73</b>
5.1 Resumen.....	75
5.2 Introducción.....	76
5.3 Materiales y métodos específicos.....	77
5.4 Resultados.....	79
5.5 Discusión y conclusiones.....	85
<b>Capítulo 6. Efecto de la hora de administración del tratamiento hormonal en el tiempo de ovulación y en la calidad y cantidad de los huevos.....</b>	<b>91</b>
6.1 Resumen.....	93
6.2 Introducción.....	93
6.3 Materiales y métodos específicos.....	94
6.4 Resultados.....	95
6.5 Discusión y conclusiones.....	98
<b>Capítulo 7. Valoración de la calidad de los huevos antes de la fecundación artificial.....</b>	<b>101</b>
7.1 Resumen.....	103
7.2 Introducción.....	103
7.3 Materiales y métodos específicos.....	104

7.4 Resultados.....	106
7.5 Discusión y conclusiones.....	107
<b>Capítulo 8. Inducción hormonal múltiple: resultados de producción y calidad de huevos.....</b>	<b>111</b>
8.1 Resumen.....	113
8.2 Introducción.....	113
8.3 Materiales y métodos específicos.....	115
8.4 Resultados.....	117
8.5 Discusión y conclusiones.....	125
<b>Capítulo 9. Larvas, juveniles y reproductores de segunda generación F2.....</b>	<b>131</b>
9.1 Resumen.....	133
9.2 Introducción.....	133
9.3 Materiales y métodos específicos.....	134
9.4 Resultados.....	138
9.5 Discusión y conclusiones.....	149
<b>Capítulo 10. Conclusiones generales.....</b>	<b>155</b>
<b>Capítulo 11. Bibliografía.....</b>	<b>159</b>
<b>Anexo I. Abreviaturas, definiciones y fórmulas.....</b>	<b>177</b>
<b>Anexo II. Listado de especies.....</b>	<b>181</b>



La presente tesis se inicia con una Introducción General en la que se explica la situación y la importancia del cultivo del lenguado senegalés, *Solea senegalensis*, así como su problemática actual, especialmente en el control de la reproducción de los ejemplares nacidos y criados en cautividad. En esta introducción se aborda un resumen sobre la reproducción de teleosteos, las principales disfunciones reproductivas que presentan los peces en cautividad, y el estado de conocimientos en el control de la reproducción en acuicultura mediante tratamientos hormonales y fecundación artificial. En el Capítulo 2 se plantean los objetivos de esta tesis. En el Capítulo 3 se describen los materiales y métodos comunes a todos los experimentos realizados, los cuales se exponen en los Capítulos del 4 al 9. Cada uno de estos Capítulos incluye un breve resumen e introducción, los materiales y métodos utilizados específicamente, así como los resultados, la discusión de los mismos y las conclusiones. Finalmente, en el último Capítulo se enumeran las conclusiones generales y se describen las futuras líneas de investigación.

Parte de esta tesis ha sido publicada en dos artículos de la revista Aquaculture y en una comunicación al XIII Congreso Nacional de Acuicultura:

Rasines, I., M. Gómez, I. Martín, C. Rodríguez, E. Mañanos, and O. Chereguini, 2012. Artificial fertilization of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Hormone therapy administration methods, timing of ovulation and viability of eggs retained in the ovarian cavity. Aquaculture 326-329: 129-135.

Rasines, I., M. Gómez, I. Martín, C. Rodríguez, E. Mañanos, and O. Chereguini. 2013. Artificial fertilisation of cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects of the time of day of hormonal treatment on inducing ovulation. Aquaculture 392-395: 94-97.

Rasines, I., M. Gómez, I. Martín, C. Rodríguez, E. Mañanos, and O. Chereguini. 2011. Respuesta a la inducción hormonal múltiple en lenguado senegalés: resultados preliminares de producción de huevos y calidad. En: Libro de Actas del XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Castelldefels (Barcelona), España.

Los trabajos de esta tesis se han realizado dentro del II y III Plan Nacional para el Cultivo del Lenguado, 2006 y 2009, financiados por la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.



**RESUMEN /SUMMARY**



## RESUMEN

El lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), es una de las especies más importantes para la diversificación de la piscicultura en el Sur de Europa. No obstante, uno de los problemas principales que limitan el éxito de su cultivo son las disfunciones reproductivas que presentan los ejemplares nacidos y criados en cautividad o de primera generación (F1). Los reproductores F1 ponen pocos huevos que generalmente no están fecundados por lo que hasta ahora no se ha podido cerrar el ciclo de cultivo ni realizar planes de mejora genética. Sin embargo, mediante fecundación artificial de los gametos de reproductores F1 se han podido obtener huevos fecundados. La presente tesis está dirigida a establecer un protocolo de inducción hormonal a la ovulación con análogos sintéticos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHa) y de extracción de los huevos por masaje abdominal para posteriormente, mediante fecundación artificial, obtener larvas de segunda generación (F2).

En primer lugar se determinó el método más adecuado de administración de la hormona. Se comparó la producción de huevos obtenidos mediante dos métodos de administración: por inyección intramuscular semanal y por implante, durante un periodo de 30 días. El número de puestas por hembra y la fecundidad relativa fueron significativamente mayores en las hembras que recibieron el tratamiento hormonal mediante inyección semanal,  $574,9 \pm 67,2 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$  de hembra, frente al implante,  $134,6 \pm 40,9 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$  de hembra. Como las tasas de fecundación y eclosión fueron similares en los dos métodos, se recomienda la inyección como método de administración del tratamiento hormonal.

Después se determinó la influencia de la temperatura en el tiempo de ovulación o número de horas transcurridas entre el tratamiento hormonal y la ovulación, y en la duración de la viabilidad de los huevos retenidos en la cavidad ovárica de la hembra. El tiempo de ovulación estuvo inversamente correlacionado con la temperatura y fue a las  $53,2 \pm 0,5$ ,  $43,4 \pm 1,1$  y  $39,5 \pm 0,7$  horas a 14 °C, 16 °C y 18 °C respectivamente. A 14 °C no se encontraron diferencias significativas en las tasas de fecundación y eclosión entre los huevos retenidos en la cavidad ovárica 0, 3 ó 6 horas. A 16 °C las mayores tasas de fecundación y eclosión se obtuvieron en los huevos retenidos 0 y 3 horas y decrecieron significativamente a las 6 horas. A 18 °C las mayores tasas de fecundación y eclosión se obtuvieron en los huevos recién

ovulados y después decrecieron significativamente. Estos resultados indican que en el lenguado senegalés la temperatura influye tanto en el tiempo de ovulación como en la duración de la viabilidad de los huevos en la cavidad ovárica, y que el periodo de viabilidad es muy corto. Por ello, para obtener huevos de calidad para la fecundación artificial, es muy importante considerar la temperatura a la que se mantiene a los reproductores durante el tratamiento hormonal, determinar con precisión el tiempo de ovulación y realizar el masaje abdominal durante el corto periodo de tiempo en que los huevos son viables. Las temperaturas de 14 a 16 °C incrementan la ventana de tiempo en que los huevos permanecen viables después de la ovulación, por lo que se recomiendan para el protocolo de inducción hormonal a la ovulación y extracción de los huevos por masaje abdominal.

A continuación se determinó la influencia de la hora del día de la administración del tratamiento hormonal en el tiempo de ovulación y en la calidad de los huevos. Para ello se inyectó GnRHa a tres grupos de hembras a las 06:00 horas, a las 12:00 horas y a las 19:00 horas. La ovulación se detectó  $42,5 \pm 0,6$  horas después del tratamiento, independientemente de la hora de la inyección hormonal; sin embargo, el tiempo de ovulación fue más homogéneo cuando el tratamiento se administró por la mañana, ovulando la mayoría de las hembras a las 41 ó 44 horas después del tratamiento. Las tasas de fecundación fueron más bajas en las puestas obtenidas de las hembras inyectadas a las 19:00 horas que en las inyectadas a las 06:00 horas ó a las 12:00 horas y el mayor número de larvas por kg de hembra se obtuvo cuando el tratamiento se aplicó a las 06:00 horas. Estos resultados indican que el tratamiento hormonal se debe aplicar en las primeras horas de la mañana para obtener el máximo número de huevos de buena calidad.

Cuando se realiza la fecundación artificial es importante valorar la calidad de los huevos mediante indicadores rápidos y fáciles de medir, que permitan predecir el éxito de la misma. Por ello se estudió la idoneidad de tres posibles indicadores de calidad: a) el porcentaje de viabilidad aparente basado en el aspecto externo de los huevos (transparencia, falta de espacio perivitelino y distribución homogénea de las gotas de grasa), b) la flotabilidad y c) el pH del líquido ovárico, en 57 puestas obtenidas mediante un protocolo estándar de inducción hormonal a la ovulación y masaje abdominal. Además estas puestas se fecundaron artificialmente y se determinaron las tasas de fecundación y eclosión. Ninguno de los indicadores estudiados resultó fiable para predecir el éxito de la fecundación artificial.

Seguidamente, para optimizar el rendimiento del stock de reproductores, se estudió el número de inyecciones hormonales y los intervalos de tiempo entre ellas que producen el mayor número de huevos viables por hembra. Se administraron inyecciones de GnRHa siguiendo tres pautas de intervalos de tiempo entre las inyecciones: (A) dos inyecciones separadas 7 días, descanso de 15 días y otras dos inyecciones separadas 7 días, (B) dos inyecciones separadas 7 días, descanso de un mes y otras dos inyecciones separadas 7 días, y (C) cuatro inyecciones separadas 15 días. En el tratamiento A solo hubo respuesta a las dos primeras inyecciones y en el B y C hubo respuestas a las 4 inyecciones. El mayor número total de huevos por kg de hembra se obtuvo con el tratamiento B, habiendo diferencias significativas entre los tratamientos A y B. No hubo diferencias en las tasas de fecundación según el orden de las inyecciones. Además, se trató a otro grupo de hembras con inyecciones los días 0, 7 y 43 y se determinaron las tasas de fecundación y eclosión. La cantidad de huevos y las tasas de fecundación y eclosión fueron similares en las tres inyecciones. En consecuencia, para obtener gran cantidad de huevos de calidad se pueden administrar dos inyecciones consecutivas separadas 7 días, pero se recomienda un descanso de un mes para obtener una respuesta satisfactoria a la tercera inyección.

Finalmente, para validar el método de obtención de ejemplares de lenguado senegalés de segunda generación (F2) mediante inducción hormonal a la ovulación de los ejemplares F1 y posterior fecundación artificial de los huevos obtenidos por masaje abdominal, se realizó el cultivo larvario y el engorde hasta el tamaño comercial y hasta el tamaño reproductor de ejemplares F2. Los resultados indican que tanto el crecimiento de las larvas como de los juveniles F2 es similar al de los ejemplares F1 y que los reproductores F2 presentan problemas reproductivos similares a los reproductores F1.

En conclusión, en un protocolo de inducción hormonal a la ovulación para obtener huevos para la fecundación artificial de lenguado senegalés, se debe utilizar la inyección como método de administración, se ha de tener en cuenta la influencia de la temperatura en el tiempo de ovulación y viabilidad de los huevos en el interior de la hembra, la influencia de la hora del día de administración de la hormona, la posibilidad de realizar varias inducciones hormonales por hembra y la imposibilidad de predecir el éxito de la fecundación artificial mediante indicadores basados en la morfología externa, la flotabilidad o el pH del líquido ovárico. Se propone el siguiente protocolo: inducción hormonal a hembras en estado E III de

madurez gonadal mediante inyección de GnRHa ( $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corporal) por la mañana, temperatura  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  y extracción de los huevos por masaje abdominal 41-44 horas después.

### SUMMARY

The Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), is one of the leading candidates for the diversification of the Southern European pisciculture industry. However, there are still several problems that restrict the consolidation of this species at an industrial level. One of the primary problems associated with culturing Senegalese sole is the extent of reproductive dysfunctions detected in individuals hatched and reared in captivity (generation F1). Spontaneous spawns are scarce and generally not fertilised. So far, it has not been able to close the farming cycle nor draw genetic improvement plans. The viability of gametes obtained from F1 Senegalese sole breeders has been previously proved and eggs obtained by stripping were successfully fertilised. The aim of this thesis was to set a protocol for an hormonal induced ovulation with synthetic analogs of gonadotropin releasing hormone (GnRH $\alpha$ ) and the artificial fertilisation of eggs obtained by stripping.

First, the most suitable method of administration of the hormone was determined. To induce ovulation, two different methods, weekly injections versus a single GnRH $\alpha$  implant, were tested. The number of spawns per female and the relative fecundity were significantly higher in females which received hormonal therapy through repeated injection,  $6.3 \pm 0.8$  spawns per female and  $574.9 \pm 67.2 \times 10^3$  eggs  $\text{kg}^{-1}$  BW, than those treated with a single implant,  $2.7 \pm 0.6$  spawns per female and  $134.6 \pm 40.9 \times 10^3$  eggs  $\text{kg}^{-1}$  BW. As fertilisation and hatching rates were similar in both methods, GnRH $\alpha$  injection is recommended as the method of hormone administration.

After, the influence of temperature at the time to ovulation (number of hours lapsed between hormonal injection and ovulation) and the changes in fertilisation and hatching rates of eggs retained in the ovarian cavity after ovulation were determined. The time of ovulation was inversely correlated with temperature and was  $53.2 \pm 0.5$ ,  $43.4 \pm 1.1$  and  $39.5 \pm 0.7$  hours at 14 °C, 16 °C and 18 °C respectively. At 14 °C there were no significant differences in the fertilisation and hatching rates from eggs retained in the ovarian cavity 0, 3 or 6 hours. At 16 °C, the highest fertilisation and hatching rates were obtained from the eggs retained 0 and 3 hours, but at 6 hours these rates decreased significantly. At 18 °C the highest rates of

fertilisation and hatching were obtained from eggs freshly ovulated and then began to decrease significantly. These results indicated that temperature has influence both on the time of ovulation and the viability of the eggs in the ovarian cavity. Hence these ovulated eggs were viable for a short time. Therefore, to obtain quality eggs for artificial fertilisation it is very important to consider the temperature at which the females are maintained during the hormonal treatment, to accurately determine the time of ovulation and perform the abdominal massage during the short period of time in which the eggs remain viable. Temperatures of 14 to 16 °C increase the window of time in which the eggs remain viable after ovulation, so these temperatures are recommended for the protocol of hormonal induced ovulation and for the stripping of the eggs.

The next step was to determine whether the time of day of the GnRHa injection influences the lapsed time to ovulation or the egg quality. Hormonal treatments were administered at 06:00, 12:00 and 19:00 hours. The ovulation times were  $42.5 \pm 0.6$  hours following hormonal treatment, and there were no significant differences between groups. However, it was noted that the time of ovulation was the most homogeneous in Groups 6 and 12, and most females in these groups ovulated at 41 or 44 hours following hormonal treatment. Fertilisation rates were lower in fish injected at 19:00 hours than in those injected at 06:00 or 12:00 hours, and the largest number of larvae per kg of each female was obtained when the treatment was administered at 06:00. These results suggest that hormonal treatments should be applied early in the morning to achieve the maximum number of good quality eggs.

When performing artificial fertilisation it is important to assess the quality of the eggs by using indicators that are quick and easy to measure. Three possible quality indicators, the percentage of apparent viability based on the external appearance of the eggs (transparency, lack of perivitelline space and homogeneous distribution of oil droplets), the buoyancy and the ovarian fluid pH were determined in 57 spawns obtained by a standard protocol of hormonal induction of ovulation and stripping. These spawns were fertilised artificially and the fertilisation and hatching rates were determined. None of the examined parameters can be used as reliable quality indicator to predict the success of artificial fertilisation.

Moreover, to optimize the performance of broodstock, the number of hormone injections and the time interval between them were determined in order to produce the greatest number of good quality eggs per female. Three patterns of time intervals between GnRHa injections were administered: (A) two injections with a 7-day interval, 15 - day break and another two injections with 7 - day interval, (B) two injections with a 7-day interval, one month break and another two injections with a 7 - day interval (C) four injections with a 15 - day interval. In treatment A there was response only to the first two injections and in the treatments B and C there were responses to four injections. The largest number of eggs per kg of female was obtained with treatment B. There were no differences in fertilisation rates by the serial number of injections. Another group of females was treated with injections on Days 0, 7 and 43 and fertilisation and hatching rates were determined. The quantity and quality of eggs were similar in all three injections. Consequently, in order to obtain a larger number of quality eggs two consecutive injections can be administered with a seven - day difference, but we suggest a month break to obtain a successful response to the third injection

Finally, to validate the method of obtaining F2 Senegalese sole using hormonal induced ovulation of the F1 and subsequent artificial fertilisation of eggs obtained by stripping, the larval culture and ongrowing them to market size and the broodstock size of F2 was performed. The results indicate that the growth of both the larvae and juveniles F2 is similar to F1 and F2 broodstock have similar reproductive problems than those of F1 broodstock.

In conclusion, for a protocol of hormonal induction of ovulation and artificial fertilisation in Senegalese sole, injection should be used as a method of administration, the influence of temperature on the time of ovulation and egg viability must be taken into account and also the influence of the time of day of administration of the hormone, several hormonal inductions by female are possible and it is not possible to predict the success of artificial fertilisation by external parameters such as morphology, buoyancy or ovarian fluid pH. The following protocol is proposed: hormonal induction of females in maturity gonadal estage E III, GnRHa injection ( $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  body weight) in the morning, temperature  $16^\circ\text{C}$  and stripping of the eggs 41-44 hours after treatment.



**CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**



### 1.1 LA ACUICULTURA EN ESPAÑA

De acuerdo con la Organización de Naciones Unidas la acuicultura se define como "el cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, crustáceos, moluscos y plantas acuáticas". La acuicultura agrupa por tanto el conjunto de actividades relacionadas con el cultivo de organismos acuáticos, en especial de animales de interés para el hombre, ya sea como alimento o por los productos derivados de ellos. En la actualidad, la acuicultura representa alrededor de la mitad de la producción mundial de algas, peces, moluscos y crustáceos.

La acuicultura en España comenzó en los años 70 en pequeñas empresas familiares que trabajaron principalmente con mejillón y trucha. Posteriormente, en los años noventa, se añadió el cultivo del rodaballo, *Psetta maxima*, de la dorada, *Sparus aurata* y de la lubina, *Dicentrarchus labrax*, se incorporaron nuevas tecnologías que mejoraron el cultivo de cada especie en todo su ciclo biológico: reproducción, crecimiento larvario, destete y engorde, y se profundizó en los conocimientos de patología y biología del medio. Más tarde han ido apareciendo nuevas especies en la piscicultura española, como la anguila europea *Anguilla anguilla* (Levante), el atún rojo *Thunnus thynnus* (Murcia), la carpa *Cyprinus carpio* (Baleares), la tenca *Tinca tinca* (Extremadura), el esturión *Acipenser sturio* (Cuenca del Guadalquivir), la corvina *Argyrosomus regius* (Levante), o el besugo *Pagellus bogaraveo* (Galicia).

Según la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos (APROMAR, 2013), la producción española de acuicultura continental y marina en el año 2011 fue de 271963 t con un valor de 457 millones de euros. Refiriéndonos solo a la piscicultura, en 2011 se produjeron en la Unión Europea 647156 t de pescado por un valor de 2800 millones de euros, siendo España el 3º país productor con el 9,2% en peso y el 8,8% en valor. La producción de pescado mediante la acuicultura moderna ha sido desde sus inicios en Europa “*un satisfactorio ejemplo de desarrollo de una nueva e innovadora actividad económica*”. Sin embargo, este sector está estancado desde el año 2000 y no está desarrollando su potencial de riqueza y de empleo. El informe “La Acuicultura Marina de Peces en España 2009”, elaborado por APROMAR, destaca la producción de nuevas especies con potencial biológico y comercial como uno de los retos para conseguir el desarrollo y la sostenibilidad de la acuicultura en

España. Esta necesidad de diversificar las especies cultivadas ha propiciado el creciente interés por parte de los criadores de peces en el lenguado senegalés, *Solea senegalensis*, como una de las especies más prometedoras de la acuicultura española.

## **1. 2 ESPECIE OBJETO DE ESTUDIO: EL LENGUADO SENEGALÉS**

### **1.2.1 Sistemática, morfología externa y biología en el medio natural**

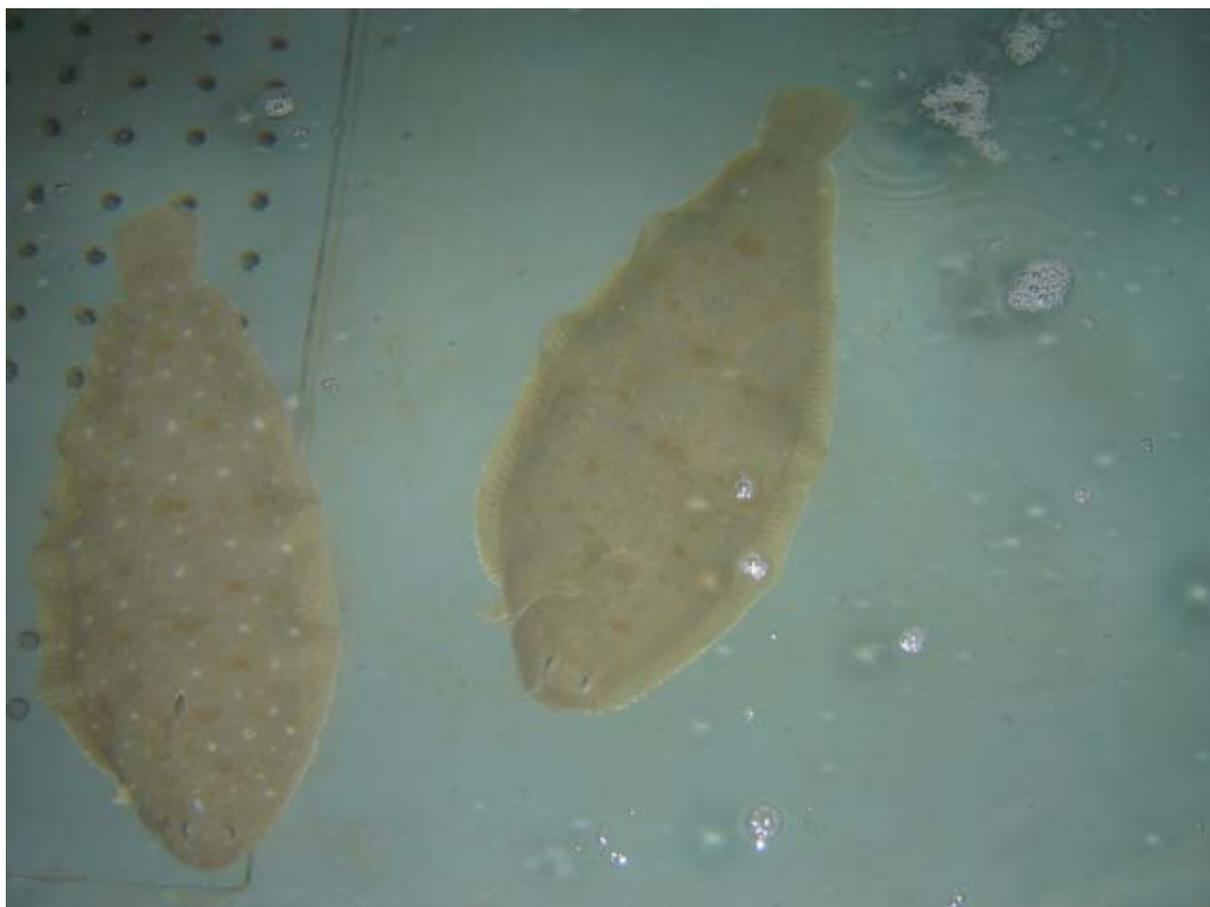
El lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), es un teleósteo marino perteneciente a la clase de los Actinopterygios, orden de los Pleuronectiformes, familia de los Soleidos. Se distribuye a lo largo de la costa este del Océano Atlántico, desde Senegal hasta La Rochelle (Francia), y en el Mar Mediterráneo a lo largo de las costas de España, costas del norte de Túnez y Golfo de León (FishBase) (Figura 1.1). La talla media de un ejemplar adulto de lenguado senegalés es de 45 cm, aunque en ocasiones puede llegar a medir 60 cm (Abellán y Basurco, 1999). Su cuerpo es plano y oval, con los dos ojos en el lado derecho. La aleta dorsal se inicia por delante de los ojos y junto con la anal se extienden prácticamente por toda la periferia del cuerpo. La aleta caudal está totalmente separada de la dorsal y de la anal. La aleta pectoral del lado ocular presenta una membrana interrredial negra, carácter que permite distinguir esta especie del lenguado común *Solea solea*, que presenta un punto negro similar pero en la zona posterior de la aleta (Ben-Tuvia, 1990). La boca es semicircular y pequeña, situada en una posición ínfera, debajo del borde inferior del ojo derecho. La coloración del lado ocular es normalmente marrón, variando de oscuro a claro y adaptándose miméticamente al entorno (Figura 1.2).

El lenguado es una especie bentónica que vive en fondos arenosos en los que se camufla, llegando hasta una profundidad de 100 m. Presenta hábitos alimentarios nocturnos basados en invertebrados bentónicos como poliquetos, moluscos bivalvos y pequeños crustáceos. Es gonocórica, desprovista de caracteres sexuales secundarios. Las hembras maduran a los tres años de edad cuando su longitud es aproximadamente de 32 cm. La época de puesta se

localiza principalmente en los meses de marzo y abril, aunque puede extenderse hasta el mes de junio (Dinis et al., 1999). Los huevos tienen numerosas gotas de grasa y miden alrededor de un milímetro. Los machos producen espermatozoides durante todo el año aunque con valores máximos en primavera (García-López et al., 2006b). El desarrollo del huevo en el medio natural suele durar una semana aunque varía con la temperatura (Russel, 1976). Las larvas recién eclosionadas miden  $2,4 \pm 0,1$  mm (Dinis et al., 1999). El cuerpo de las larvas, tras varios días de vida planctónica, va perdiendo su simetría bilateral, adopta una forma plana y el ojo situado al lado izquierdo migra hacia el lado derecho. Este proceso, conocido como metamorfosis, termina cuando la larva comienza a llevar una vida bentónica.



**Figura 1.1.** Distribución de *Solea senegalensis* (tomado de FishBase).



**Figura 1.2.** Ejemplares de lenguado senegalés capturados en la costa de Huelva.

### 1.2.2 Cultivo del lenguado senegalés

La investigación en el cultivo de *S. senegalensis* se inició a principios de la década de los 80 con los trabajos de Rodríguez (1984) en el litoral gaditano y Dinis (1986) en los estuarios portugueses, zonas en las que esta especie se cultivaba tradicionalmente de forma extensiva. Sin embargo, estos trabajos no tuvieron una continuidad significativa durante los años posteriores y el interés por el cultivo del lenguado se redujo prácticamente a Andalucía. Con la aprobación del I Plan Nacional para el Cultivo del Lenguado (2002 - 2004), promovido por la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), el interés se extendió a otras regiones, en particular del norte de España, en las que existe una creciente necesidad de especies alternativas al cultivo del rodaballo. Como se mencionó anteriormente, el área de

distribución de *S. senegalensis* se extiende por toda la costa de Portugal y España llegando hasta el Golfo de Vizcaya, y se demostró que su cultivo puede ser viable en la mayoría de estas áreas (Chereguini et al., 2007a). Este primer Plan Nacional y otros dos posteriores (2006 - 2009 y 2009 - 2011), unido al interés mostrado por numerosos centros de investigación, han permitido un avance considerable en el conocimiento de aspectos relevantes del cultivo del lenguado senegalés y hacen que actualmente esta especie sea una de las principales candidatas para satisfacer la demanda de nuevas especies cultivables. Existen varias granjas, principalmente situadas en la costa Atlántica de Portugal, norte de España y Francia, así como una empresa en Canarias que cultivan lenguado y en 2012 se produjeron en España 194 t (APROMAR, 2013).

En los últimos años se ha avanzado notablemente en el control y conocimiento de la fisiología de la reproducción del stock salvaje (Anguis y Cañavate, 2005, Agulleiro et al., 2006, Cabrera et al., 2006, García López et al., 2006a, Beirão et al., 2008), en el cultivo larvario y destete (Fernández Díaz et al., 2001, Morais et al., 2005, Ribeiro et al., 2005, Cañavate et al., 2006, Fernández-Díaz et al., 2006, Cañavate et al., 2007, Chereguini et al., 2007a, Conceição et al., 2007, Engrola et al., 2007, Villalta et al., 2008a), en el engorde (Olmedo et al., 2003, Castelo Branco et al., 2006, Pinto et al., 2007, Yúfera y Darias, 2007, Ambrosio et al., 2008, Rema et al., 2008, Silva et al., 2009, Salas-Leiton et al., 2010), en el comportamiento y afrontamiento al estrés (Mota et al., 2010, Martins et al., 2011, Costas et al., 2012), en la genética (Castro et al., 2006, Porta et al., 2006, Manchado et al., 2008), en salud (García de la Banda et al., 2011, López-Vázquez et al., 2011), en cronobiología (Bayarri et al., 2004a,b, Oliveira et al., 2007, 2009a,b, 2010, 2011), y en malformaciones y albinismo (Gavaia et al., 2002, Engrola et al., 2005, Ruane et al., 2005, Villalta et al., 2008b). Sin embargo, existen todavía varios problemas que impiden el éxito total del cultivo del lenguado a escala industrial, referentes a la alimentación, a patologías en las fases de preengorde y engorde y al control de la reproducción de los ejemplares cultivados (Imsland et al., 2003, Cañavate, 2005, Howell et al., 2009).

Actualmente el cultivo de lenguado senegalés se inicia con la captura y la aclimatación a la cautividad de ejemplares salvajes. Estos reproductores, sometidos a una manipulación del termoperiodo, proporcionan de forma espontánea puestas fecundadas. El cultivo larvario es un proceso sencillo hasta el final de la metamorfosis, a los 20 ó 21 días de edad, y está

caracterizado por un rápido crecimiento y bajas mortalidades (Fernández-Díaz et al., 2001). Durante esta etapa, las larvas son alimentadas con rotíferos (*Brachionus sp.*) entre los días 4 al 9 y posteriormente en régimen de coalimentación con nauplius de *Artemia* y alimento inerte hasta el destete a los 40 o 60 días (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999, Ribeiro et al., 2005, Chereguini et al., 2007a). El engorde se caracteriza por una buena tasa de crecimiento, tanto en los sistemas extensivos en los que tradicionalmente se ha cultivado (Drake et al., 1984) como en condiciones intensivas con cargas elevadas (Olmedo et al., 2003, Rodríguez y Souto, 2003). En condiciones intensivas la talla comercial se alcanza en un periodo ligeramente superior al año.

### **1.2.3 Problemática en el control de la reproducción del lenguado cultivado**

Como se mencionó anteriormente, uno de los problemas que impide el desarrollo total del cultivo del lenguado a escala industrial es el control de la reproducción de los ejemplares nacidos y criados en cautividad o primera generación (F1), de modo que hasta ahora no se ha podido cerrar el ciclo de cultivo ni realizar planes de mejora genética. Solo en muy pocos casos se han obtenido puestas espontáneas que han permitido obtener larvas F2 (Calvo et al., 2005). La investigación de los últimos años está intentando mejorar los conocimientos de la fisiología reproductiva del lenguado de cultivo y aportar soluciones a las disfunciones reproductivas existentes.

Se ha estudiado el papel de la temperatura y fotoperiodo en el control de la maduración gonadal en el lenguado F1 (García-López et al., 2005), las relaciones entre los ritmos de melatonina y la reproducción (Vera et al., 2007, Oliveira et al., 2010 y 2011) y las fluctuaciones diarias de los esteroides sexuales (Oliveira et al., 2009a). También se han analizado hormonas reproductivas críticas en lenguados cultivados (García-López et al., 2006b y 2007, Guzmán et al., 2008 y 2009). Mediante estudios histológicos se ha mostrado que los reproductores F1 completan la gametogénesis pero muestran un menor nivel de maduración gonadal y liberación de gametos que los salvajes (García-López et al., 2005, Agulleiro et al., 2006, García-López et al., 2007).

Se ha demostrado que las terapias hormonales basadas en el tratamiento con análogos sintéticos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHa) estimulan la maduración, ovulación y liberación de huevos en hembras F1 (Agulleiro et al., 2006, Guzmán et al., 2009). La espermatogenesis y la producción de espermatozoides en machos F1 también ha sido estimulada mediante GnRHa y gonadotropina coriónica humana (hCG) (Guzmán et al., 2011b) o mediante GnRHa + 11-ketoandrostenediona (Agulleiro et al., 2007). Además el tratamiento hormonal de los machos F1 ha incrementado la fecundidad de las hembras F1 acompañantes (Guzmán et al., 2011b). Sin embargo, las puestas obtenidas en tanque de los stocks de reproductores F1 inducidos con hormonas raramente están fecundadas (Mañanos et al., 2007, Carazo et al., 2011). Por otro lado, mediante la estabulación conjunta de reproductores salvajes y cultivados, se ha observado un mayor fallo reproductivo en los machos F1 ya que en los tanques con hembras salvajes y machos F1 se obtienen pocos huevos y no fecundados, mientras que hembras F1 y machos salvajes producen puestas fecundadas (Mañanos et al., 2007, Martín et al., 2011).

En los estudios de comportamiento reproductivo del lenguado, realizados mediante grabaciones nocturnas, se ha observado que los lenguados F1 no realizan la secuencia correcta del cortejo propia de los reproductores salvajes y se producen algunas liberaciones de huevos que no son fecundados por los machos (Carazo et al., 2011).

También se han encontrado diferencias relevantes en los perfiles de ácidos grasos esenciales entre los reproductores salvajes y los F1; los desequilibrios encontrados entre los ácidos araquidónico y eicosapentanoico pueden ser importantes ya que afectan a la producción de prostaglandinas, sustancias que juegan un papel importante en el comportamiento de los reproductores durante el cortejo (Norambuena et al., 2012). Mediante dietas enriquecidas en ácido araquidónico se ha conseguido que los ejemplares F1 tengan niveles similares de este ácido a los salvajes en testículos, ovario e hígado, sin embargo faltan estudios que establezcan el efecto de estas dietas en la eficacia de la reproducción de los ejemplares F1 (Norambuena et al 2013).

Además, se ha demostrado que los gametos de lenguados F1 son viables ya que mediante inducción hormonal se obtuvieron huevos por masaje abdominal que fueron fecundados artificialmente con éxito, tanto con espermatozoides fresco y crioconservado de machos salvajes

(Chereguini et al., 2007b) como con esperma crioconservado de machos F1 (Chereguini, comunicación personal).

Todos estos importantes avances en el conocimiento de la fisiología y comportamiento reproductivo, si bien van centrado cada vez más el problema en los machos de cultivo, no han aportado por el momento ninguna solución a la falta de puestas fecundadas en la F1.

La reproducción en cautividad de muchas especies de teleósteos, especialmente peces planos, está basada en la obtención de los huevos ovulados, bien espontáneamente o mediante inducción hormonal, y su posterior fecundación artificial. En la revisión realizada por Mañanos et al. (2009) se citan varias especies de peces planos, algunas consolidadas en acuicultura, en las que se utiliza la fecundación artificial (lenguado de Florida *Paralichthys lethostigma*, falso halibut de Canadá *Paralichthys dentatus*, halibut *Hippoglossus hippoglossus*, *Platichthys stellatus*, platija amarilla *Limanda ferruginea* y rodaballo *Psetta maxima*).

Una posible vía para afrontar la falta de larvas F2 de lenguado senegalés podría ser establecer métodos de inducción hormonal a la ovulación y de fecundación artificial adecuados para esta especie. En este sentido, en el 4º Grupo de Trabajo sobre el cultivo de lenguado celebrado en el año 2009 en Faro (Portugal), se presentaron importantes avances en la aplicación de técnicas de fecundación artificial en China y se destacó que, desde una perspectiva comercial, una de las prioridades debía ser la evaluación de las técnicas de obtención de huevos por masaje abdominal (Howell et al., 2009). En esta línea, la presente tesis pretende ahondar en el conocimiento de algunos aspectos de la inducción hormonal a la ovulación que permitan obtener huevos de calidad para la fecundación artificial.

### **1.3 CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN DE PECES MEDIANTE TRATAMIENTOS HORMONALES Y FECUNDACIÓN ARTIFICIAL**

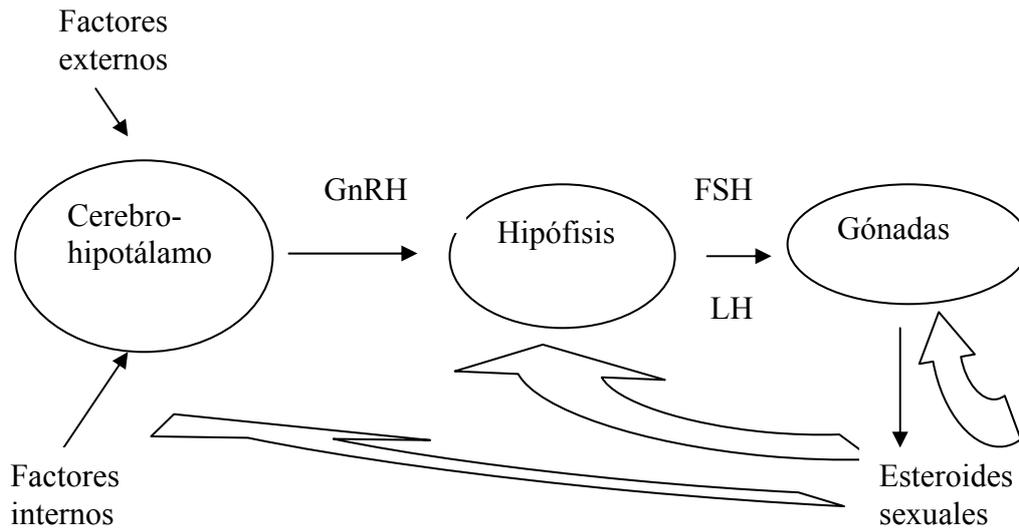
Un requisito básico para la piscicultura es la posibilidad de obtener un gran número de alevines para su engorde. Tradicionalmente, las especies que se han cultivado eran capaces de

reproducirse en cautividad de forma natural. Especies como las tilapias *Tilapia spp.*, el bagre de canal *Ictalurus punctatus* y *Clarias batrachus* producen de forma espontánea huevos fecundados en los tanques de cultivo (De Silva et al., 2008). Sin embargo en otros muchos casos, el control de la reproducción es limitado y la obtención de huevos y larvas muy variable. En ocasiones se ha recurrido a la captura de huevos, de larvas o juveniles y de ejemplares reproductores maduros durante la época de puesta, pero esta dependencia de individuos salvajes, bien juveniles o adultos supone un importante problema para las industrias acuícolas. En general “cerrar el ciclo de cultivo”, expresión muy común en acuicultura, permite a la industria ser independiente del stock salvaje, y ello requiere alcanzar el control de la reproducción de las especies en cautividad. El conocimiento de los procesos reproductivos permitirán al acuicultor actuar de la forma más apropiada para controlar e inducir la reproducción, bien a través de proporcionar el adecuado estímulo ambiental o mediante la administración de tratamientos hormonales que faciliten la gametogénesis, la ovulación y la espermiación.

### **1.3.1 Algunas generalidades de la reproducción de los Teleósteos**

En peces, al igual que en todos los vertebrados, la reproducción está regulada por una cascada de hormonas a lo largo del eje cerebro-pituitaria-gónadas (Figura 1.3). En este eje, la secreción de las gonadotropinas (GtH) por la pituitaria o hipófisis está controlada por el cerebro vía la acción estimuladora de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) producida en el hipotálamo. Las dos GtH, la hormona folículo estimulante (FSH o GtHI) y la hormona luteinizante (LH o GtHII), son liberadas a la corriente sanguínea para actuar sobre la gónada, donde estimulan la síntesis de esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progestágenos) que son los últimos responsables del desarrollo gonadal (revisado en Mylonas et al., 2010). En términos generales, la FSH controla principalmente los primeros estadios de la gametogénesis y la LH regula la maduración final del ovocito, la ovulación y espermiación. En algunas especies la dopamina (DA) ejerce una acción inhibitoria de la producción y liberación de GtH por parte de la hipófisis. Las principales hormonas esteroideas que regulan la gametogénesis son el estrógeno ( $E_2$ ) en las hembras y el andrógeno 11-ketotestosterona

(11-KT) en los machos. También el ovario de los peces sintetiza testosterona (T) al igual que los machos producen E<sub>2</sub>, pero en niveles muy inferiores.



**Figura 1.3.** Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. La producción y liberación de GnRH es estimulada por factores externos o internos, que actúan sobre la hipófisis o pituitaria para la secreción de las hormonas gonadotropinas FSH y LH. Al llegar a las gónadas vía sanguínea, las gonadotropinas estimulan la síntesis de esteroides sexuales.

El proceso de formación de los gametos o gametogénesis ocurre en los órganos reproductivos o gónadas: testículos en los machos y ovarios en las hembras. En la mayoría de los Teleósteos, el testículo suele ser un órgano de color blanquecino cubierto por una fina capa de tejido conectivo. Se sitúa en la cavidad visceral y consta de dos lóbulos separados por un septo o independientes entre sí. El proceso de desarrollo de las células germinales masculinas, desde las células madre precursoras de las espermatogonias hasta los espermatozoides se denomina espermatogénesis. Se diferencian tres fases fundamentales: proliferación espermatogonial, meiosis y espermiogénesis. En la fase de proliferación espermatogonial, las células madre se dividen por mitosis para dar las espermatogonias que, mediante meiosis, dan lugar a los espermatoцитos primarios y secundarios, que son ya haploides. Estas células tienen

una vida corta y entran rápidamente en la segunda división meiótica originando las espermátidas. Por último, las espermátidas sufren un proceso de diferenciación, llamado espermiogénesis que consiste en la reorganización del núcleo y del citoplasma, junto con el desarrollo total del flagelo, que conduce a la formación de los espermatozoides maduros. Es característica de los espermatozoides de los teleósteos la carencia de acrosoma asociada a la presencia de un poro o micropilo en el ovocito.

La forma y tamaño de los testículos de *S. senegalensis* difiere bastante de lo encontrado en la mayoría de las especies de Perciformes y Pleuronectiformes estudiadas. En cuanto a la forma, *S. senegalensis* posee unos lóbulos testiculares redondeados, mientras que lo habitual, en estadios de maduración avanzada, es una conformación alargada recorriendo habitualmente una gran parte de la cavidad visceral. El tamaño del testículo y el índice gonadosomático (IG) son muy bajos a lo largo de todo el desarrollo espermatogénico ( $IG < 0,15\%$ ), lo cual también difiere de otros teleósteos estudiados en los que el testículo sufre variaciones considerables de tamaño a lo largo del ciclo reproductivo. El conducto espermático desemboca al exterior por el poro urogenital, que está localizado en el lado ocular del pez (superficie dorsal), muy cerca de la inserción de las aletas pelvianas (García-López et al., 2005).

En *S. senegalensis* la espermatogénesis es semi-cística, es decir, las espermátidas recién formadas son liberadas al lumen del tubo seminífero, donde se transforman en espermatozoides por grupos sucesivos. Este desarrollo testicular asincrónico explica las pequeñas variaciones del índice gonadosomático, la escasa cantidad de esperma que se obtiene por masaje abdominal, la gran abundancia de espermátidas dentro del testículo y el hecho de que *S. senegalensis* tenga la capacidad de emitir esperma durante una gran parte del año (García-López et al., 2006b).

El ovario de los Teleósteos es muy variable. De forma general es un órgano par, alargado y hueco situado dorsalmente en la cavidad abdominal aunque en algunas especies ambos lóbulos aparecen fusionados o uno de ellos es mucho más reducido que el otro permaneciendo no funcional. En la mayoría de los Teleósteos, el ovario está completamente envuelto por el peritoneo siendo los ovocitos liberados a la cavidad ovárica donde se canalizan al exterior a través del oviducto. En especies como los salmónidos, el ovario se encuentra solo parcialmente recubierto por el peritoneo, siendo los ovocitos maduros liberados directamente a la cavidad visceral.

La ovogénesis, proceso mediante el cual las células germinales primordiales u ovogonias se transforman en ovocitos, se divide en cuatro fases: transformación de las ovogonias en ovocitos, crecimiento de los ovocitos, maduración y ovulación. Durante cada ciclo reproductivo, un número determinado de ovogonias presentes en el ovario se multiplican por división mitótica y se transforman en ovocitos primarios tras la primera división meiótica. Los ovocitos formados entran en una fase de crecimiento en la que van adquiriendo todas las reservas necesarias (lípidos y proteínas, principalmente vitelogenina) para el futuro desarrollo embrionario. El comienzo de la fase de crecimiento primario se denomina fase previtelogénica; conforme progresa en su crecimiento, el ovocito empieza a incorporar lípidos y vitelogenina a su citoplasma entrando en la fase de vitelogénesis. Una vez que el ovocito ha incorporado todas las reservas necesarias entra en maduración. Durante esta etapa, en el citoplasma suceden cambios importantes para la fecundación y posterior desarrollo embrionario, tales como la coalescencia lipídica y vitelina y la hidratación del ovocito. Por último, el ovocito es ovulado y expulsado al exterior durante la ovoposición o puesta, estando listo para la fecundación. En esta tesis usaremos el término huevo cuando nos refiramos al ovocito ya ovulado, aunque aún esté en la cavidad del ovario, siguiendo la definición del Glosario de Acuicultura de la FAO según la cual “huevo es la célula germinal femenina madura” ([www.fao.org/fi/glossary/aquaculture](http://www.fao.org/fi/glossary/aquaculture)).

Dependiendo de la coexistencia de diferentes estadios de desarrollo del ovocito dentro del ovario se definen tres tipos de desarrollo ovárico: sincrónico, sincrónico por grupos y asincrónico. En las especies con desarrollo ovárico sincrónico, como por ejemplo en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, todos los ovocitos se desarrollan y ovulan al unísono. En este caso el pez ovula una sola vez en su vida. Por el contrario, en las especies con desarrollo ovárico sincrónico por grupos, al menos están presentes simultáneamente en el ovario dos estadios de desarrollo. Durante la época de puesta los ovocitos más avanzados son liberados, mientras que el grupo menos avanzado será ovopositado en una futura época de puesta. Las especies con este tipo de desarrollo ovárico, tales como el bacalao *Gadus morhua* y la platija canadiense *Hippoglossoides platessoides* suelen ovular varias veces a lo largo de su vida con épocas de puesta relativamente cortas. Por último, en las especies con desarrollo ovárico asincrónico encontramos ovocitos en todos los estadios de desarrollo de forma simultánea, sin una población dominante. Este desarrollo se encuentra en especies que realizan múltiples ovoposiciones a lo largo de una dilatada época de puesta, tales como la merluza *Merluccius*

*merluccius*, el lenguado de arena *Solea lascaris* y el lenguado común *S. solea* (revisado en García-López 2005). La especie objeto de este estudio *S. senegalensis* presenta un desarrollo ovárico de este último tipo (Rodríguez, 1984, García-López, 2005).

Según García-López, 2005, “la morfología macroscópica del ovario de *S. senegalensis* corresponde con la descripción general del ovario de los Teleósteos. El ovario está formado por dos lóbulos independientes entre sí (superior: lóbulo del lado ocular; inferior: lóbulo del lado ciego), que recorren longitudinalmente la cavidad visceral a ambos lados de la porción esquelética central. La coloración del ovario suele ser anaranjada, variando desde tonos más pálidos o blanquecinos, cuando el ovario está sin desarrollar, hasta naranja intenso, cuando el ovario se encuentra en avanzado estado de maduración. Ambos lóbulos están envueltos completamente por el peritoneo, que forma en la región cefálica ventral de cada lóbulo un conducto deferente. Ambos conductos se unen en el límite anterior de la porción esquelética central para dar lugar al oviducto, que desemboca en el poro genital, situado en el lado ciego muy próximo a la inserción de las aletas pelvianas”.

### **1.3.2. Alteraciones más frecuentes del proceso reproductivo**

Las disfunciones reproductivas dependen de la especie y pueden variar desde la falta total de desarrollo gonadal a reducciones significativas en la cantidad y calidad de los gametos.

En los organismos mantenidos en cautividad, las hembras normalmente presentan problemas más serios que los machos produciéndose alteraciones que según Mañanos et al., (2009), se pueden clasificar en tres tipos:

- El primer tipo de desorden reproductivo y el más serio desde un punto de vista fisiológico, es la ausencia de desarrollo gonadal, como ocurre en anguila, *Anguilla spp.* y en la mayoría de las poblaciones cautivas de pez limón *Seriola spp.*, especies en las que se inhibe la vitelogénesis.
- El segundo tipo de disfunción reproductiva, y el más común, es la inhibición del proceso de maduración final de ovocito. En este caso, la vitelogénesis se

completa correctamente, pero al comienzo de la época de puesta los ovocitos postvitelogénicos detienen su maduración final y sufren atresia. El grado de inhibición varía dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales. La atresia puede afectar a todos los ovocitos postvitelogénicos de la gónada, no dándose la puesta o puede afectar a parte y entonces se produce una reducción del número de huevos liberados. Este sería el caso del lenguado senegalés en el que las hembras F1 suelen completar la vitelogénesis pero liberan unos pocos huevos o sufren atresia total (García-López et al., 2007).

- El tercer tipo se debe a la inhibición de la liberación de los huevos o puesta. Las especies que presentan este problema pueden desarrollar normalmente la vitelogénesis, la maduración final de los ovocitos y la ovulación, pero no son capaces de realizar la puesta. En este caso, los huevos se han de extraer de la cavidad abdominal de la hembra por masaje abdominal y ser fecundados artificialmente. Esta dificultad la presenta el rodaballo *Psetta maxima* y algunos salmónidos.

En la mayoría de las especies, los machos se adaptan mejor que las hembras a las condiciones de cautividad, y con la excepción de la anguila europea, las alteraciones en los machos se centran en una reducción de la cantidad y la calidad del esperma producido. Esta reducción puede ser un serio problema en aquellas especies en las que la producción está basada en la extracción de los gametos por masaje abdominal y su fecundación artificial. Ya se ha mencionado el pequeño testículo y la pequeña cantidad de esperma que produce el lenguado senegalés, por lo que es necesaria una investigación dirigida a obtener la mayor producción de esperma posible. Por otro lado, algunas especies producen esperma muy viscoso que dificulta la dispersión de los espermatozoides y la capacidad de fecundación del esperma.

### **1.3.3. Inducción hormonal a la ovulación**

Muchas especies de peces mantenidas en cautividad sufren disfunciones reproductivas que impiden o dificultan la obtención de los descendientes necesarios para iniciar ciclos nuevos y

permanentes de producción que hagan sostenible la explotación industrial de la especie. Estas disfunciones se deben principalmente a las condiciones de cultivo durante la época de puesta, que no son las más adecuadas para que se desencadene correctamente la respuesta fisiológica conducente a la reproducción. Estas condiciones pueden ser de tipo ambiental o por el estrés producido por la cautividad. En ocasiones las disfunciones reproductivas se solventan o atenúan mediante manipulaciones ambientales del fotoperiodo, la temperatura, la salinidad, el volumen del tanque, la vegetación del sustrato, etc. Sin embargo, en algunas especies es necesario poner en práctica técnicas de inducción hormonal para obtener la reproducción en cautividad, aunque estas técnicas también se utilizan para mejorar el rendimiento del stock reproductor.

En las revisiones recientes de Mylonas y Zohar, 2007, Valdebenito, 2008, Mañanos et al., 2009 y Mylonas et al., 2010 se detalla el conocimiento existente sobre terapias hormonales conducentes a conseguir la reproducción de los teleósteos y en ellas se basan los apartados siguientes.

### 1.3.3.1 Técnicas hormonales utilizadas

Como se ha comentado, el problema reproductivo más frecuente es el segundo tipo (tipo II) en el que las hembras realizan la vitelogénesis pero no la maduración final del ovocito ni la ovulación y puesta. La causa es una disfunción en la liberación de la hormona LH al final de la vitelogénesis. Sin embargo, la LH se sintetiza y almacena en la pituitaria durante la vitelogénesis, como lo demuestra el hecho de que los niveles de LH y sus ARNm no difieren entre hembras salvajes y cautivas (Mylonas et al., 2010).

La manipulación de la reproducción de los peces que presentan disfunción del tipo II se basó, primero, en el uso de preparaciones de hormonas LH exógenas que actúan directamente a nivel gonadal y, más recientemente, en análogos de las hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRHa) que liberan la LH endógena almacenada en la pituitaria. La LH endógena actúa a su vez sobre las gónadas induciendo el proceso de esteroidogénesis y el proceso de maduración ovocitaria y espermiación.

Los primeros estudios sobre el uso de hormonas exógenas para inducir la ovulación en peces fueron realizados por Houssay en 1930, quién inyectó a hembras con hipófisis de otras especies y observó que ovulaban anticipadamente. Este trabajo fue el comienzo de la técnica de hipofisación para la inducción a la puesta en peces. En la actualidad, esta técnica se utiliza masivamente en países asiáticos en la producción de carpas pero presenta varias desventajas: la gran variación en el contenido de LH, la administración de hormonas adicionales presentes en la pituitaria y la potencial transmisión de enfermedades. El uso de los extractos de pituitaria, que son homogenados de pituitaria en los que se ha suprimido la parte celular, supone una mejora del método de hipofisación. Las preparaciones comerciales de extractos de pituitaria de carpa o salmón actualmente están disponibles en todo el mundo.

A principios de la década de los 70 se empezó a investigar con gonadotropinas de mamíferos, especialmente con la gonadotropina coriónica humana (hCG), obtenida de la orina de mujeres embarazadas y que tiene una fuerte actividad LH. Esta hormona se ha usado ampliamente en acuicultura debido a su alta disponibilidad en el mercado, bajo coste y actividad estandarizada. La ventaja de esta hormona es que actúa directamente sobre la gónada y no requiere la activación de la hipófisis, actuando mucho más rápido, induciendo la maduración final del ovocito, la espermiación y la puesta. Sin embargo, el tratamiento con hCG tiene una importante desventaja debido a que la compleja estructura de la molécula puede causar una respuesta inmune cuando se administra a especies no mamíferas, y puede llevar a una disminución o falta total de respuesta en tratamientos sucesivos.

Los métodos más modernos de inducción a la ovulación, y que han probado su eficacia en un amplio número de peces, se basan en la aplicación de hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH) y de sus análogos sintéticos (GnRHa), más potentes. Las ventajas de la aplicación de hormonas liberadoras de gonadotropinas son:

- No generan respuesta inmune, por lo que pueden ser utilizadas repetidamente.
- No son especie-específicas como lo son las gonadotropinas, lo que permite su uso en un gran número de especies con gran efectividad.
- Actúan en el nivel superior del eje cerebro-pituitaria-gónadas y estimulan la liberación de gonadotropinas endógenas (FSH y LH) junto a otras hormonas pituitarias que

pueden ser importantes en las funciones reproductivas, consiguiéndose así una mejor integración del proceso reproductivo.

- Al poder ser sintetizadas artificialmente se evita el riesgo de transmitir enfermedades.

En algunos peces la dopamina (DA) ejerce una fuerte inhibición de la liberación de la hormona GtH en la hipófisis atenuando la acción de la GnRH. Así, en la maduración de algunas especies se ha utilizado la administración de antagonistas de la DA en combinación con GnRHa. Parece que este efecto inhibitorio de la DA es fuerte en especies de agua dulce pero débil o ausente en la mayoría de las especies marinas. Según Guzmán et al. (2011b) existe un efecto inhibitorio de la DA en machos maduros de lenguado senegalés pero que podría estar ausente o expresarse muy débilmente en las hembras.

### 1.3.3.2 Métodos de aplicación de la terapia hormonal

Los tratamientos basados en la GnRHa tienen como limitación la corta vida media de estas moléculas. La forma clásica de administrar estos tratamientos es mediante una inyección intraperitoneal o intramuscular de la hormona disuelta en suero fisiológico a la dosis requerida. Dependiendo del tipo de GnRHa, la especie y la temperatura del agua, una sola inyección provoca el aumento de la hormona LH durante un periodo de 12 a 72 horas y después el efecto desaparece. En algunos casos, este corto efecto de la inyección es suficiente para inducir puestas 2 ó 3 días después del tratamiento, pero en muchos otros son necesarias varias inyecciones para inducir una liberación de LH prolongada y estimular la maduración gonadal completa y la puesta. Desde los primeros experimentos de inducción ya se reconoció que la administración a largo plazo de las hormonas sería más eficaz y por ello los tratamientos hormonales se realizaban con varias inyecciones. El manejo repetitivo necesario para estos tratamientos puede ser dañino y estresante para los reproductores, además las labores requeridas cuando los peces son grandes (meros, túnidos, etc), o están en instalaciones en mar abierto, consumen mucho tiempo y personal. Por ello se han desarrollado distintos sistemas de liberación sostenida de la hormona, principalmente GnRHa, siendo los implantes y las microesferas los sistemas con más éxito actualmente.

Los implantes son pequeñas pastillas o “pellets”, preparadas inicialmente a base de colesterol y actualmente como una mezcla de colesterol y celulosa, en la que se diluye la hormona y que posteriormente se introducen intramuscular o intraperitonealmente en el pez. Las proporciones de ambas sustancias determinan la velocidad de liberación de la hormona que puede variar de ocho semanas a ocho días.

Las microesferas se fabrican con polímeros biodegradables como el ácido láctico y el ácido glicólico o el ácido sebásico, son de menor tamaño que los compuestos utilizados en los implantes y sus ventajas radican, además de en la biodegradabilidad, en el prolongado tiempo de liberación de la hormona y en su facilidad de aplicación y fabricación.

También se ha investigado la administración vía oral de GnRH $\alpha$  pero este método no ha progresado convenientemente.

### 1.3.3.3 Factores importantes a controlar en la aplicación de las técnicas hormonales

Para tener éxito en la aplicación de una técnica de inducción hormonal, además de elegir el tipo de hormona y el método de aplicación de la misma, se ha de tener en cuenta una serie de factores referidos al receptor concreto y a las condiciones ambientales en la que se lleva a cabo. Así se han de considerar, entre otros, el estado de madurez inicial del pez, la dosis hormonal, el momento de aplicación del tratamiento, el tiempo de respuesta al tratamiento, los intervalos entre tratamientos y la temperatura.

#### Estado inicial de madurez gónadal

Es fundamental conocer el estado de desarrollo del ovario ya que los tratamientos solo serán efectivos si los ovocitos se encuentran en su fase de maduración final; este aspecto es más importante cuando el tratamiento se da en forma de inyección que cuando se utilizan sistemas de liberación sostenida. Los métodos empleados para determinar el estado de madurez van desde la observación externa del pez (grado de hinchazón abdominal en las hembras, coloración, papila genital aparente, etc) hasta la realización de biopsias ováricas y la posterior observación al microscopio del tamaño y posición de la vesícula germinal del ovocito.

### Dosis hormonal

La dosis a emplear depende del producto utilizado, del método de aplicación, del peso del ejemplar, del grado de madurez sexual y de varios factores ambientales especialmente la temperatura. Las dosis menores de las adecuadas no producen puestas mientras que las dosis más altas dan huevos de mala calidad (Mylonas et al., 1992, Haraldsson et al., 1993, Gardes et al., 2000).

### Intervalos entre tratamientos

Cuando se requiere más de una inyección o tratamiento, es importante determinar el periodo de tiempo entre ellos, que dependerá del tiempo de vida media del producto empleado, del estado de madurez del receptor, de la dosis inicial, del modo de administración del producto y de la temperatura.

### Tiempo de respuesta al tratamiento hormonal

El tiempo de respuesta, llamado en esta tesis tiempo de ovulación, es el comprendido entre el último tratamiento hormonal y la ovulación o espermiación. Conocer el tiempo de ovulación es muy importante cuando interesa extraer los gametos por masaje abdominal para llevar a cabo fecundaciones artificiales. Esto es debido a que después de la ovulación, los huevos que quedan en el ovario o en la cavidad abdominal de la hembra sufren una sobremaduración, proceso por el cual pierden viabilidad afectando negativamente a las tasas de fecundación y al posterior desarrollo embrionario. Sin embargo, algunas especies necesitan un proceso de maduración después de la ovulación, es decir, la viabilidad de los huevos puede mejorar después de la ovulación durante un periodo de tiempo y después decaer al sufrir el proceso de la sobremaduración. Este tiempo de ovulación depende principalmente de la especie, la dosis de hormona y la temperatura.

Otros factores, como la hora del día o la estación del año, también pueden influir en el éxito del tratamiento hormonal. En diversas especies se ha observado que los niveles plasmáticos de gonadotropinas y esteroides sexuales presentan ritmos circadianos o circanuales que pueden verse afectados por la aplicación de hormonas exógenas. Aunque hay que estudiar cada caso, parece que en términos generales los tratamientos administrados en las primeras horas del día son más efectivos.

Muchos estudios han demostrado que los peces pueden ser manipulados hormonalmente para producir huevos de calidad con una viabilidad similar a los obtenidos de forma natural. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que la maduración gonadal en los peces es un proceso complejo y que la manipulación y la obtención de huevos de buena calidad requieren un conocimiento completo que considere todos los factores implicados. Por ello, para establecer un protocolo de inducción hormonal a la reproducción se debe estudiar y optimizar cada uno de esos factores y sus posibles interrelaciones.

### 1.3.4 Fecundación artificial

La fecundación artificial es una técnica que implica la obtención de huevos y espermatozoides de ejemplares reproductores maduros para ponerlos en contacto en un medio que permita la movilidad de los espermatozoides. Esta técnica ha sido usada desde hace mucho tiempo en especies de agua dulce, principalmente salmónidos y ciprínidos (Billard, 1988), remontándose su uso a la Edad Media. En varios teleósteos marinos, especialmente en aquellos que ovulan en cautividad pero no liberan los huevos, la reproducción en cautividad está basada en la fecundación artificial. La fecundación artificial se utiliza en varias especies de peces planos ya consolidadas en acuicultura como el rodaballo (Chereguini et al., 1999, Fauvel et al., 1993a) y el halibut (Vermeirssen et al., 2004) y en otras especies de peces planos emergentes como la solla roja *Pseudopleuronectes americanus* (Fairchild, 2010), platija amarilla (Avery et al., 2004) y varias especies del género *Paralichthys* como el lenguado brasileño *P. orbinyanus* (Bambill et al., 2006), el falso halibut de Canadá *P. dentatus* (Berlinsky et al. 1997), el lenguado de Florida *P. lethostigma* (Daniels et al., 2010), el lenguado de California *P. californicus* (Conklin y Piedrahita, 2010) y el lenguado fino *P. adspersus* (Silva, 2010).

La fecundación artificial en peces cultivados sigue el mismo modelo general con varios pasos rutinarios que pueden diferir en algunos detalles. Los huevos y el espermatozoides son extraídos de los individuos reproductores maduros, después los gametos se mezclan, son activados con agua o con otra solución de fecundación y finalmente los huevos fecundados se incuban hasta la eclosión (Urbanyi et al., 2009). Una de las principales características de los gametos es su

corta vida en el medio en el que son liberados. Este medio, bien sea agua dulce o marina, es muy perjudicial para los gametos, a pesar de que tanto el fluido ovárico como el seminal juegan un importante papel protector en la fecundación en el medio natural (Billard 1988).

Los huevos se recogen mediante un masaje suave del abdomen del pez que en algunos casos necesita ser previamente anestesiado. Los huevos son liberados a través del poro genital, que se ha secado previamente, y se recogen en un recipiente limpio y seco. Se ha de tener mucho cuidado para evitar el contacto de los huevos con el agua o la orina ya que esto podría activarlos y limitar el éxito de la fecundación. La recolección del esperma es a menudo más complicada que la de los huevos. En general, el esperma se recoge por masaje del testículo, teniendo especial cuidado en no contaminarlo con agua u orina, ya que al igual que los huevos, puede perder la capacidad de fecundación. En algunas especies se utiliza un catéter que se introduce por el conducto espermático y así el esperma se recoge directamente de los conductos espermáticos o del testículo. A veces el esperma se recoge sobre una solución salina inactivante que mantiene a los espermatozoides inmóviles hasta su uso. En algunos casos se sacrifica al macho maduro y se obtiene el esperma directamente del testículo.

Para la fecundación, se mezclan los gametos y se puede o no añadir inmediatamente una solución de fecundación que activa a los espermatozoides y mejora su dispersión. Cuando los gametos se juntan y la solución se añade posteriormente el método se llama “fecundación en seco”. Cuando se mezclan simultáneamente los huevos, el esperma y la solución activante el método se llama “fecundación húmeda”.

Si bien el método de fecundación es relativamente sencillo, las condiciones de la fecundación artificial tienen un gran impacto en la producción del criadero. Las variaciones en las tasas de fecundación que se encuentran en la literatura pueden ser causadas por la calidad de los gametos o por el método de fecundación usado (Chereguini et al., 1999) y para cada especie se ha de establecer un protocolo adecuado de fecundación artificial en el que se contemplen aspectos tales como el tipo de fecundación, la relación esperma - huevo óptima (Chereguini et al., 1999, Suquet et al., 1995) y desarrollar métodos que prolonguen la viabilidad de los gametos como la conservación a corto plazo de huevos y esperma y la conservación a largo plazo o crioconservación de esperma (Chereguini et al., 1997, Chereguini et al., 2003, Suquet et al., 2000).



**CAPÍTULO 2. OBJETIVOS**



### **OBJETIVOS**

La presente tesis forma parte de las investigaciones realizadas en la Planta de Cultivos Marinos “El Bocal”, del Centro Oceanográfico de Santander, dirigidas a conseguir un protocolo de inducción hormonal a la ovulación, obtención de gametos viables y fecundación artificial en el lenguado senegalés que permita obtener larvas a partir de reproductores nacidos y criados en cautividad.

Los objetivos específicos han sido:

1. Determinar el mejor método de administración de la terapia hormonal.
2. Determinar el tiempo de ovulación y la viabilidad de los huevos dentro de la hembra.
3. Valorar la influencia de la temperatura en el tiempo de ovulación y en la calidad de los huevos.
4. Valorar la influencia de la hora del día en la respuesta al tratamiento hormonal.
5. Buscar características de los huevos que permitan predecir la calidad de los mismos antes de la fecundación artificial.
6. Optimizar el rendimiento del tratamiento hormonal por hembra.

Finalmente se evaluó el crecimiento de larvas y juveniles F2 producidos con estas técnicas y la reproducción de los ejemplares F2.



**CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS COMUNES**



### 3.1. ORIGEN Y ESTABULACIÓN DE LOS REPRODUCTORES

Los trabajos experimentales de esta tesis se han realizado en la Planta de Cultivos Marinos “El Bocal” del Centro Oceanográfico del Instituto Español de Oceanografía (IEO) de Santander durante un periodo de 5 años (2008-2012).

El stock reproductor de ejemplares de cultivo (F1) de lenguado senegalés estuvo formado aproximadamente por 145 ejemplares. El grupo de más edad (nacidos en el año 2002) procedía de un lote de huevos enviado desde las instalaciones del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) “El Toruño” de la Junta de Andalucía (Cádiz, España). Desde entonces, cada año se ha ido incrementando y renovando el stock de reproductores F1 con nuevos ejemplares procedentes de las puestas naturales de los reproductores salvajes adaptados a la cautividad y estabulados en las instalaciones del IEO.

Los reproductores F1 estaban estabulados en tanques de diversas formas, tipo “raceway”, circulares y cuadrados, con tamaños que variaban de 4 a 14 m<sup>2</sup> y 1 m de profundidad, en circuito abierto de agua (de 3 a 8 renovaciones diarias según la carga del tanque) y con aireación constante. La densidad de estabulación fue de 2,6 Kg m<sup>-2</sup> a 5,8 Kg m<sup>-2</sup> y la relación macho : hembra 2:161:1. El fotoperiodo fue artificial y constante durante todo el año, manteniendo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, encendiendo las luces a las 8:00 a.m. y apagándolas a las 12 p.m. La intensidad luminosa se redujo sombreando los tanques con una malla que permitía un máximo de intensidad de 50 lux en la superficie del agua de los tanques. Se alimentaron con pienso comercial de reproductores (Vitalis Cal o Vitalis Repro, Skretting), “ad libitum”, 6 días a la semana. Diariamente se observaron los tanques para detectar posibles patologías, retirar las posibles bajas y sifonar los restos de comida. Quincenal o semanalmente, según la temperatura del agua, se administraron tratamientos preventivos con peróxido de hidrógeno (80 ppm) durante 1 hora con aireación y sin renovación de agua.

Los ejemplares estaban identificados individualmente mediante una marca electrónica inyectada intramuscularmente en la parte media de la zona dorsal de la cara ocular del pez.

Para realizar esta operación los peces se anestesiaban mediante un baño de un minuto en 40 ppm de aceite de clavo.

### **3.2 CONTROL DE LA MADURACIÓN GONADAL**

La maduración gonadal de los reproductores se indujo mediante manipulación del termoperiodo. A finales de enero, cuando la temperatura del agua de mar era aproximadamente de 13 °C, se comenzó a subir 0,5 °C a la semana. A partir de los 16 °C, los lunes se subía la temperatura a 18°C y los jueves se bajaba a 16°C para imitar las fluctuaciones naturales registradas en IFAPA “El Toruño”, que inducen el desove natural en los reproductores salvajes (Anguis y Cañavate 2005). Cuando la temperatura del agua de mar alcanzó los 18 °C, aproximadamente en el mes de junio, se finalizó la manipulación del termoperiodo y los reproductores quedaron expuestos a los cambios naturales de temperatura del agua de mar de la zona hasta el siguiente enero.

Los peces se muestreaban una vez al mes para determinar la talla y el peso y estimar el estado de desarrollo gonadal de las hembras según la clasificación de Anguis y Cañavate (2005). Esta clasificación describe 5 estados de desarrollo gonadal en función del abultamiento del abdomen observado externamente:

- E 0: El ovario no se puede detectar externamente.
- E I: El ovario solo se puede detectar mediante palpación de la zona abdominal.
- E II: Nivel inicial de abultamiento del ovario, externamente visible en la zona abdominal.
- E III: Nivel intermedio de abultamiento del ovario.
- E IV: Máximo desarrollo ovárico, caracterizado por la aparición de ligera coloración naranja en el lado ciego.

Para las experiencias de inducción hormonal y fecundación artificial que se realizaron en esta tesis se seleccionaron, a partir de finales de marzo, hembras en estado de desarrollo del ovario igual o superior a E III. Cada una de las experiencias se realizó en distintos días al ser muy difícil tanto disponer del suficiente número de hembras en estado E III en el mismo momento, como el manejo simultáneo de un número alto de hembras.

Los machos son fluyentes la mayor parte del año (García-López et al., 2006b, Beirão et al., 2011) aunque en las épocas principales de puesta (primavera y otoño) es cuando producen mayor cantidad de espermatozoides (Cabrita et al., 2006). Para determinar el estado de madurez gonadal de los machos se realizaba una suave presión de los testículos con el ejemplar dentro del agua y de este modo se determinó fácilmente si el macho era fluyente o no.

### 3.3 INDUCCIÓN HORMONAL

Para la inducción hormonal a la ovulación se emplearon análogos sintéticos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHa) que ya habían sido utilizados con éxito en la inducción a la maduración, ovulación y puestas espontáneas en el lenguado senegalés (Agulleiro et al., 2006, Chereguini et al., 2007b, Mañanos et al., 2007, Guzmán et al., 2009). El método general de administración de la hormona fue la inyección intramuscular utilizando jeringuillas de insulina cargadas con 25 µg de GnRHa ((des-Gly<sup>10</sup>, D-Ala<sup>6</sup>)-LH-Rh ethyl-amida, Sigma) por kg de peso corporal, disuelta en suero salino (166,7 µg GnRha ml<sup>-1</sup>), ver Figura 3.1. Esta dosis ya había sido efectiva en trabajos anteriores de Chereguini et al., (2007b), Mañanos et al., (2007) y Guzmán et al., (2009).



**Figura 3.1.** *Inducción a la ovulación de hembras de lenguado senegalés mediante inyección intramuscular de GnRH $\alpha$ .*

### **3. 4 OBTENCIÓN DE LOS HUEVOS POR MASAJE ABDOMINAL**

Para obtener los huevos después de la inducción a la ovulación, se colocó a la hembra en una mesa sobre una bayeta húmeda y se la taparon los ojos para reducir el estrés. Posteriormente se realizó una suave presión en el abdomen, avanzando desde la parte posterior de la gónada a la anterior, levantando los dedos y volviendo a presionar en una posición más avanzada para evitar daños en la piel, como por ejemplo arrancar alguna escama (Figura 3.2).

Los huevos se recogieron en un recipiente de plástico que debe estar limpio y seco, ya que los huevos de lenguado, como los de otros peces, se activan en contacto con el agua de mar haciendo imposible la posterior fecundación con el espermatozoide. También se ha de evitar la contaminación por heces u orina.



**Figura 3.2.** *Obtención de huevos de lenguado senegalés por presión abdominal.*



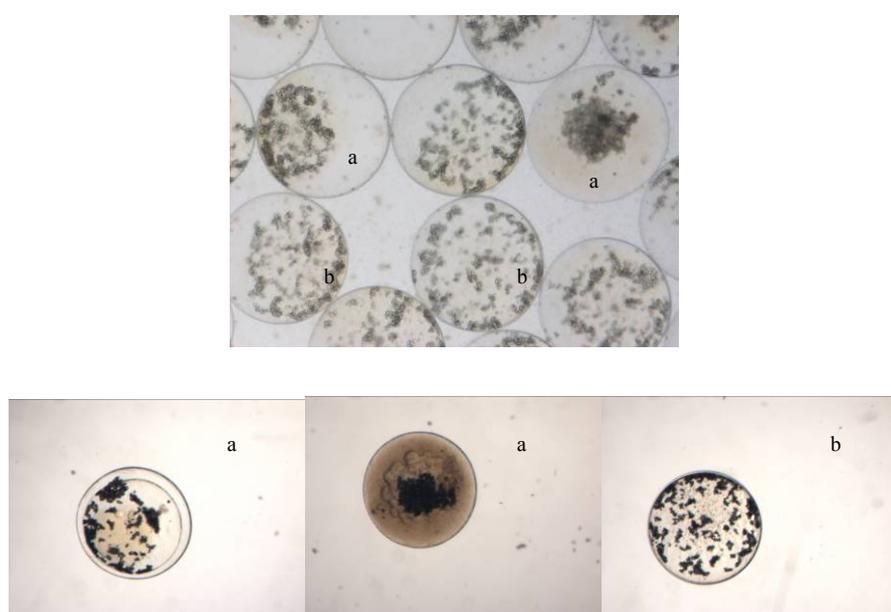
**Figura 3.3.** *Determinación del volumen de huevos de lenguado senegalés obtenidos por presión abdominal después de la inducción hormonal a la ovulación.*

En cada puesta<sup>1</sup> se determinó el volumen de huevos, el porcentaje de viabilidad aparente y el número de huevos por mL. Para medir el volumen se vertieron los huevos en una probeta graduada de 1 L (Figura 3.3). El porcentaje de viabilidad aparente, definido como número

---

<sup>1</sup> En esta tesis, el término puesta se refiere al lote de huevos que se puede extraer de una hembra mediante masaje abdominal; cuando nos refiramos a la liberación espontánea de huevos en el tanque de cultivo hablaremos de puesta en tanque o puesta espontánea.

huevos transparentes, esféricos, sin espacio perivitelino y con las gotas de grasa repartidas por todo el huevo  $\times 100$  / número huevos observados, se realizó mediante observación microscópica de aproximadamente 100 huevos de cada puesta. En la Figura 3.4 se muestran fotos de huevos considerados viables y de huevos no viables. Para determinar el número de huevos por mL se tomó una muestra de 0,5 mL de huevos con una micropipeta, se colocaron en una placa Boronov, se añadió agua de mar y se contó el número de huevos bajo la lupa.



**Figura 3.4:** Huevos no viables (a) y huevos aparentemente viables (b) de lenguado senegalés.

### 3. 5 OBTENCIÓN, VALORACIÓN DE LA CALIDAD Y CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMA

Con el fin de evitar la variabilidad debida a la calidad del esperma y además disponer en todo momento de esperma de buena calidad y en la cantidad suficiente, todas las experiencias de fecundación artificial se realizaron con esperma crioconservado. Para crear un banco de esperma crioconservado de lenguado, todos los meses del año, excepto julio, agosto y

septiembre en los que, por las altas temperaturas, no era aconsejable someter a los peces al estrés del muestreo y obtención de esperma, se realizó la extracción de esperma de la mitad del stock reproductor, de modo que cada macho fue muestreado cada dos meses.

La obtención de esperma de lenguado senegalés es particularmente difícil y requiere personal entrenado en su extracción, capaz de evitar la contaminación con orina, ya que como se comentó en la introducción, es una especie oligoespérmica con un tamaño del testículo y un índice gonadosomático muy bajos (García López et al., 2005). Para obtener el esperma se anestesió al ejemplar con aceite de clavo, se lavó la papila genital con agua destilada y se secó con papel absorbente, se localizaron los testículos superior e inferior palpando suavemente con los dedos índice (testículo inferior) y pulgar (testículo superior) y finalmente se realizó una suave presión abdominal para extraer el esperma. El esperma de cada macho se recogió en una jeringa de 1 mL y se mantuvo a 0 °C hasta su valoración y posterior uso (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** *Extracción de esperma de lenguado senegalés y conservación del mismo en frío hasta su valoración y crioconservación.*

La valoración y crioconservación del esperma se realizó, con ligeras modificaciones, según el método descrito para rodaballo por Chereguini et al. (2003). Para valorar la movilidad del esperma se preparó una dilución 1 : 5 del esperma original en solución inmovilizante Ringer 200 mOsmol L<sup>-1</sup> (Tabla 3.1) y posteriormente se activó con agua de mar a 4 °C en una segunda dilución 1 : 20 (1 µL esperma inmovilizado : 19 µL de agua de mar). El movimiento

se evaluó observando el espermatozoide activado a 400x aumentos en un microscopio conectado a una pantalla de televisión, que permitía la valoración de la movilidad del espermatozoide por tres observadores simultáneamente. La movilidad se cuantificó según la escala de Sánchez-Rodríguez (1975), que va de 0 a 5 niveles dependiendo del porcentaje de espermatozoides móviles:

Nivel 0. Todos los espermatozoides son inmóviles.

Nivel 1. Los espermatozoides presentan una ligera agitación y alguno se desliza.

Nivel 2. Del 20 al 40% de los espermatozoides se deslizan rápidamente, otros lentamente y la mayoría son inmóviles.

Nivel 3. Del 40 al 60% de los espermatozoides se deslizan rápidamente, otros lentamente y algunos son inmóviles.

Nivel 4. Del 60 al 80% de los espermatozoides se deslizan rápidamente, mientras que otros lo hacen con desplazamientos lentos.

Nivel 5. El porcentaje de espermatozoides que se deslizan rápidamente es superior al 80%.

**Tabla 3.1.** Solución salina de Ringer 200 mOsmol L<sup>-1</sup> utilizada en la dilución del espermatozoide antes de la valoración de la movilidad.

ClNa.....	74,0 mM
ClK.....	27,0 mM
CO <sub>3</sub> HNa.....	1,6 mM
Cl <sub>2</sub> Ca.....	1,8 mM
pH =	8,06

Solo se crioconservó espermatozoide de buena movilidad (igual o superior a 3 en la escala anterior). Dada la pequeña cantidad de espermatozoide que se obtiene de cada macho de lenguado senegalés (Cabrita et al., 2006, Chereguini et al., 2006) se formaron “pooles” con el espermatozoide de tres a cinco machos. Para la crioconservación se utilizaron pajuelas de 0,5 mL (IMV, L’Aigle, France) que se rellenaron con 50 µL de espermatozoide y 100 µL del diluyente

Mounib modificado por Legendre & Billard (1980), más dos crioprotectores, dimetilsulfóxido (DMSO) y albúmina de suero bovino (BSA), ver Tabla 3.2. Los extremos de las pajuelas se sellaron con la ayuda de unas pinzas de calor e inmediatamente se congelaron sobre los vapores del nitrógeno líquido contenido en una caja de poliestireno expandido. Las pajuelas se situaron a 5 cm sobre la superficie del nitrógeno mediante un flotador de poliestireno con forma de catamarán durante 7 minutos y después se sumergieron directamente en el nitrógeno líquido, (Figura 3.5). Finalmente las pajuelas se almacenaron en un contenedor de nitrógeno líquido (Air Liquide GT 21) hasta su uso en la fecundación artificial (FA). Las pajuelas del mismo “pool” se identificaron mediante un código de rayas y colores.

La descongelación se realizó sumergiendo las pajuelas en un baño a 40 °C durante 7 segundos. Una vez descongelada, se abrió la pajuela cortando los extremos y se vació en un “eppendorf”, de donde se tomaron las cantidades necesarias para valorar al microscopio la movilidad postdescongelación y realizar la FA.

**Tabla 3.2.** *Composición del medio Mounib, modificado por Legendre y Billard (1980) utilizado en la crioconservación del esperma de lenguado senegalés.*

Sacarosa.....	125mM
Glutatio reducido.....	6,5 mM
Bicarbonato potásico.....	100 mM
10%DMSO	
10%BSA	
pH =	7,57



**Figura 3.6.** Caja y flotador de poliestireno expandido utilizado para la crioconservación de esperma de lenguado senegalés.

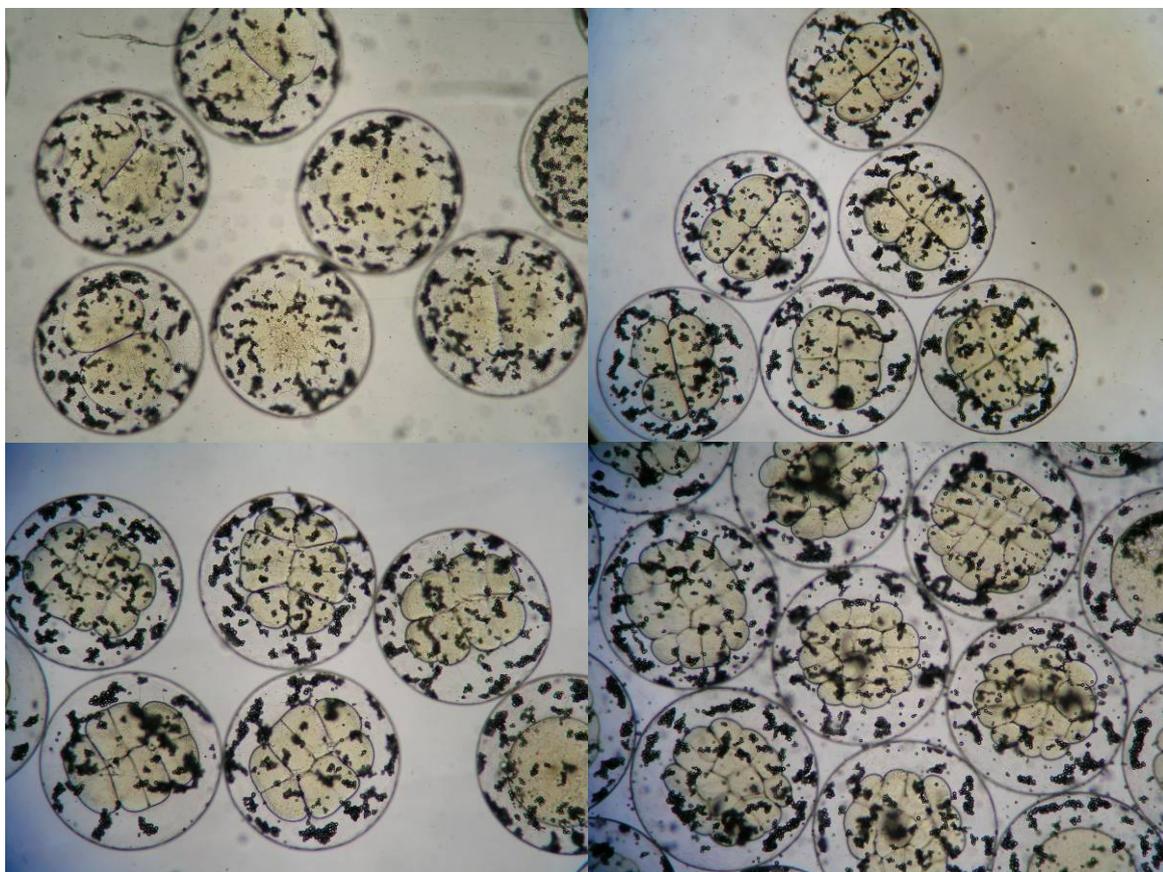
### 3. 6 FECUNDACIÓN ARTIFICIAL

Para valorar la calidad de los huevos obtenidos se realizaron fecundaciones artificiales por triplicado con esperma crioconservado y se determinaron las tasas de fecundación y eclosión.

De cada puesta o lote de huevos se tomaron, mediante micropipeta, tres muestras de 1 mL de huevos a las que se añadieron 30  $\mu$ L de esperma crioconservado y 1 mL agua de mar a la misma temperatura y salinidad a la que estaba la hembra previamente. Se agitó suavemente y pasados 3 minutos se añadieron 35 mL de agua de mar. Para fecundar los triplicados de cada puesta o lote de huevos siempre se utilizó una pajueta. Transcurrida una hora y cuarenta y cinco minutos se valoró la tasa de fecundación (número de huevos con blastómeros x 100 / número total de huevos) observando a la lupa al menos 200 huevos tomados después de homogeneizar la muestra suavemente (Figura 3.7).

Posteriormente los huevos se vertieron en incubadores troncocónicos de 1 L de capacidad, con renovación continua de agua de mar filtrada a 1 $\mu$ m y a 19 °C (Figura 3.8). A los dos días, una vez nacidas todas las larvas, se vació cada incubador y su contenido (larvas y huevos no viables) se conservaron en una disolución de formol tamponado al 4%. Finalmente, se

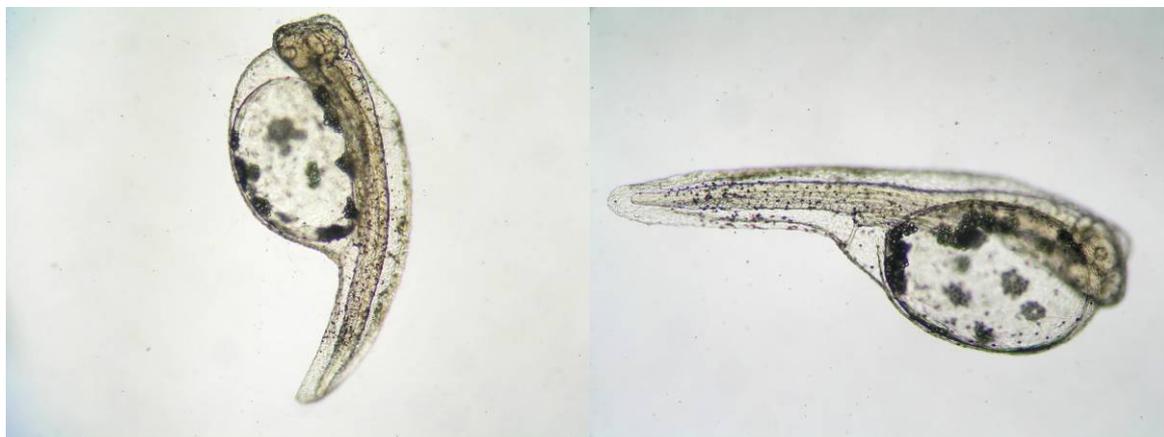
contaron las larvas y se determinó la tasa de eclosión de cada incubador como número de larvas x 100 / número total de huevos incubados (Figura 3.9).



**Figura 3.7.** Huevos fecundados de lenguado senegalés entre una hora y treinta minutos y dos horas después de la fecundación a temperatura ambiente de laboratorio.



**Figura 3.8.** Sistema de incubadores de 1 L con renovación continua de agua de mar filtrada por 1  $\mu$ m.



**Figura 3.9.** Larvas recién eclosionadas de lenguado senegalés.

**CAPÍTULO 4. MÉTODO DE ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO  
HORMONAL**



#### 4.1 RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue inducir la ovulación en hembras de lenguado senegalés, con el método de administración de la hormona más adecuado, para obtener huevos por masaje abdominal para la fecundación artificial. Se compararon las producciones de huevos obtenidas durante 30 días mediante dos métodos de administración: inyección semanal e implante de GnRHa. El número de puestas por hembra y la fecundidad relativa fueron significativamente mayores en las hembras que recibieron el tratamiento hormonal mediante inyección repetida,  $6,3 \pm 0,8$  puestas por hembra y  $574,9 \pm 67,2 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$  de hembra, frente al implante,  $2,7 \pm 0,6$  puestas por hembra y  $134,6 \pm 40,9 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$  de hembra. Como las tasas de fecundación y eclosión fueron similares en los dos tratamientos, se recomienda la inyección como método de administración de la terapia hormonal.

#### 4.2 INTRODUCCIÓN

Las terapias hormonales basadas en el tratamiento con análogos sintéticos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHa) son una solución adecuada en el control del proceso reproductivo de numerosas especies de peces (Mañanos et al., 2009). Los análogos sintéticos de la GnRH se pueden administrar vía inyección o mediante sistemas de liberación sostenida. Con la administración de una única inyección, los niveles de GnRHa en el plasma sanguíneo se elevan durante un periodo que va de unas horas a unos pocos días, limitando su efecto y, en especies que presentan un desarrollo ovárico asincrónico o sincrónico por grupos, son necesarias varias inyecciones para obtener sucesivas ovulaciones. La necesidad de manejar repetidamente a los reproductores, además de requerir mucha mano de obra, puede estresar a los peces, causar enfermedades o la muerte de los ejemplares. Por el contrario, los sistemas de liberación sostenida, al mantener los niveles de GnRHa durante un periodo de tiempo más largo, permiten obtener puestas consecutivas (Mylonas y Zohar, 2007) y reducen el manejo de los reproductores. El tratamiento con GnRHa de ejemplares reproductores de cultivo (F1) de lenguado senegalés ha sido eficaz en la estimulación de la ovulación y la liberación de los

huevos en el tanque, tanto con implantes (Agulleiro et al., 2006, Mañanos et al., 2007, Guzmán et al., 2009) como con inyecciones repetidas (Agulleiro et al., 2006). Sin embargo, no se han producido huevos fecundados. Cuando la finalidad de la terapia hormonal es inducir la ovulación para luego extraer los huevos mediante masaje abdominal y posteriormente realizar la fecundación artificial, es especialmente importante establecer el método de administración más efectivo, que permita obtener el mayor número de huevos de buena calidad con el menor manejo de los reproductores. Por lo tanto, el primer paso para establecer un protocolo de inducción hormonal a la ovulación, objetivo de esta tesis, fue determinar el método de administración de la terapia hormonal, comparando la inyección con el implante de liberación sostenida.

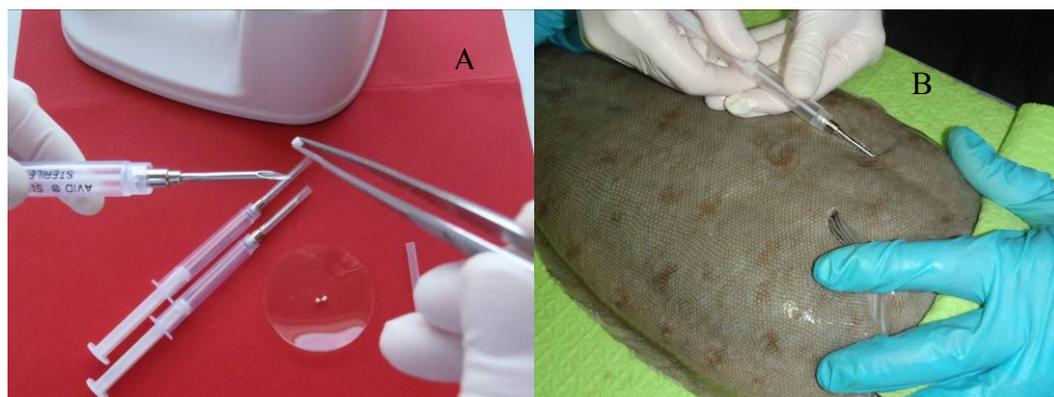
#### 4.3 MATERIALES Y MÉTODOS ESPECÍFICOS

Se distribuyeron 16 hembras F1 en tres grupos experimentales que se acondicionaron en tanques de 4 m<sup>2</sup> de superficie y 1 m de altura con un grupo de machos (relación macho : hembra, 1 : 1). Durante el experimento se mantuvieron las condiciones de alimentación, agua, aire, luz y oscilaciones térmicas descritas en el Capítulo 3. Los grupos fueron:

- Grupo C (n=4): Control, en el que los ejemplares recibieron una inyección intramuscular de solución salina a razón de 0,15 mL kg<sup>-1</sup> de peso corporal (PC).
- Grupo IN (n=6): en el que las hembras recibieron 4 inyecciones intramusculares de 25 µg kg<sup>-1</sup> PC de GnRHa separadas en intervalos de 7 días.
- Grupo IM (n=6): en el que las hembras se trataron con un implante de GnRHa en una dosis de 50 µg kg<sup>-1</sup> PC.

Los implantes de GnRHa consistieron en unos cilindros de 2 mm x 3 mm de un copolimero de Ethylene-Vinyl acetato (EVAc, Elvax; DuPont Chemical CO., USA) cargados con GnRHa (Mylonas y Zohar, 2001, Mylonas et al., 2007). Se insertaron en la musculatura dorsal con la ayuda de las jeringas estériles especiales que normalmente se utilizan para insertar marcas electrónicas (AVID, SUDS), ver Figura 4.1. La idoneidad de la dosis utilizada, 50 µg kg<sup>-1</sup>PC,

ya había sido probada anteriormente por otros autores (Agulleiro et al., 2006, Chereguini et al., 2007b, Mañanos et al., 2007, Guzmán et al., 2009). Para colocar el implante se anestesió a las hembras con aceite de clavo (40 ppm) durante un minuto. El tratamiento mediante inyección se realizó según lo descrito en el Capítulo 3.



**Figura 4.1.** (A) Jeringas para la inserción de marcas electrónicas utilizada para los implantes. (B) Insercción del implante a hembras de lenguado senegalés.

Después de la administración del tratamiento, las hembras se examinaron diariamente hasta que se obtuvo la primera puesta por masaje abdominal. Posteriormente, y hasta el final del ensayo, se continuó realizando el masaje abdominal cada dos o tres días, según el grado de hinchazón del abdomen. En todas las puestas obtenidas se midió el volumen de huevos (mL). En este primer experimento, y con el fin de caracterizar las puestas obtenidas por inducción hormonal y masaje abdominal se determinó por triplicado el número de huevos  $\text{mL}^{-1}$  y el peso de 1 mL de huevos, con una balanza de precisión de 1 mg (Mettler Toledo). También se determinó el diámetro de los huevos considerados viables colocando aproximadamente 100 huevos de cada puesta en un vidrio de reloj con agua de mar, se fotografiaron inmediatamente y se midieron 30 huevos viables por puesta mediante un analizador de imágenes (analySIS®.GmbH, 2001, Münster, Germany).

Se registró el número de puestas por hembra y se calculó el número de huevos por puesta como volumen x número de huevos  $\text{mL}^{-1}$ , la fecundidad relativa por puesta como número de huevos  $\text{kg}^{-1}$  PC y puesta, la fecundidad relativa parcial (FRP) como número de huevos  $\text{kg}^{-1}$

PC después de cada inyección y la fecundidad relativa global (FRG) como número de huevos totales  $\text{kg}^{-1}$  PC. Para valorar la calidad de los huevos se realizaron fecundaciones artificiales (FA) con espermatozoides criopreservados y se determinaron las tasas de fecundación y eclosión.

Todos los valores se expresaron como media  $\pm$  ESM. La normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas se analizaron mediante el Test de Kolmogorov-Smirnov y el estadístico de Levene, respectivamente. El peso y la edad de los tres grupos, así como los resultados de n° de puestas por hembra, FRP, FRG y tasas de fecundación y eclosión se analizaron mediante ANOVA y t de Student o sus equivalentes no paramétricos de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney con un nivel de significación de  $p < 0.05$ . Se realizaron análisis de correlación no paramétricos entre el número de huevos  $\text{mL}^{-1}$ , el diámetro de los huevos y el peso de la hembra.

#### 4.4 RESULTADOS

Los pesos y edades de las hembras que formaron los tres grupos fueron similares (Tabla 4.1). El número de puestas por hembra y la FRG fueron significativamente mayores en las hembras que recibieron el tratamiento hormonal mediante inyección repetida que en las hembras implantadas o las hembras control (Tabla 4.1). A lo largo de todo el experimento se obtuvieron 5,1 millones de huevos de las hembras del Grupo IN, 1,3 millones de huevos de las hembras del grupo IM y 0,3 millones de las hembras del Grupo C. Durante el experimento solo se registró la mortalidad de una hembra a los 13 días de recibir el implante. Para los dos tipos de administración ensayados, la respuesta al tratamiento hormonal se obtuvo a los dos días.

**Tabla 4.1.** El peso y la edad de los ejemplares de lenguado senegalés, el n° de puestas por hembra y la fecundidad relativa global (FRG), obtenidos según el método de administración de la hormona, expresados como media  $\pm$  ESM. Los datos de las columnas con letra superíndice distinta fueron significativamente diferentes.

Tratamiento	Peso (g)	Edad (años)	N° puestas/♀	FRG (n° huevos (10 <sup>3</sup> ) kg <sup>-1</sup> )
<b>INYECCIÓN</b>	1565 $\pm$ 276	5,2 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	574,9 $\pm$ 67,2 <sup>c</sup>
<b>IMPLANTE</b>	1450 $\pm$ 178	4,8 $\pm$ 0,6	2,7 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	134,6 $\pm$ 40,9 <sup>d</sup>
<b>CONTROL</b>	1470 $\pm$ 260	5,5 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	39,5 $\pm$ 35,8 <sup>d</sup>

En todas las hembras inyectadas se pudieron obtener huevos después de las dos primeras inyecciones; después de la tercera inyección se obtuvieron huevos en cinco hembras y después de la cuarta inyección se obtuvieron huevos solo en las hembras 3 y 5 (Figura 4.2). A lo largo del periodo experimental se obtuvieron 6,3  $\pm$  0,8 puestas por hembra (Tabla 4.1). La FRP fue alta después de las tres primeras inyecciones pero luego decreció significativamente (Figura 4.3).

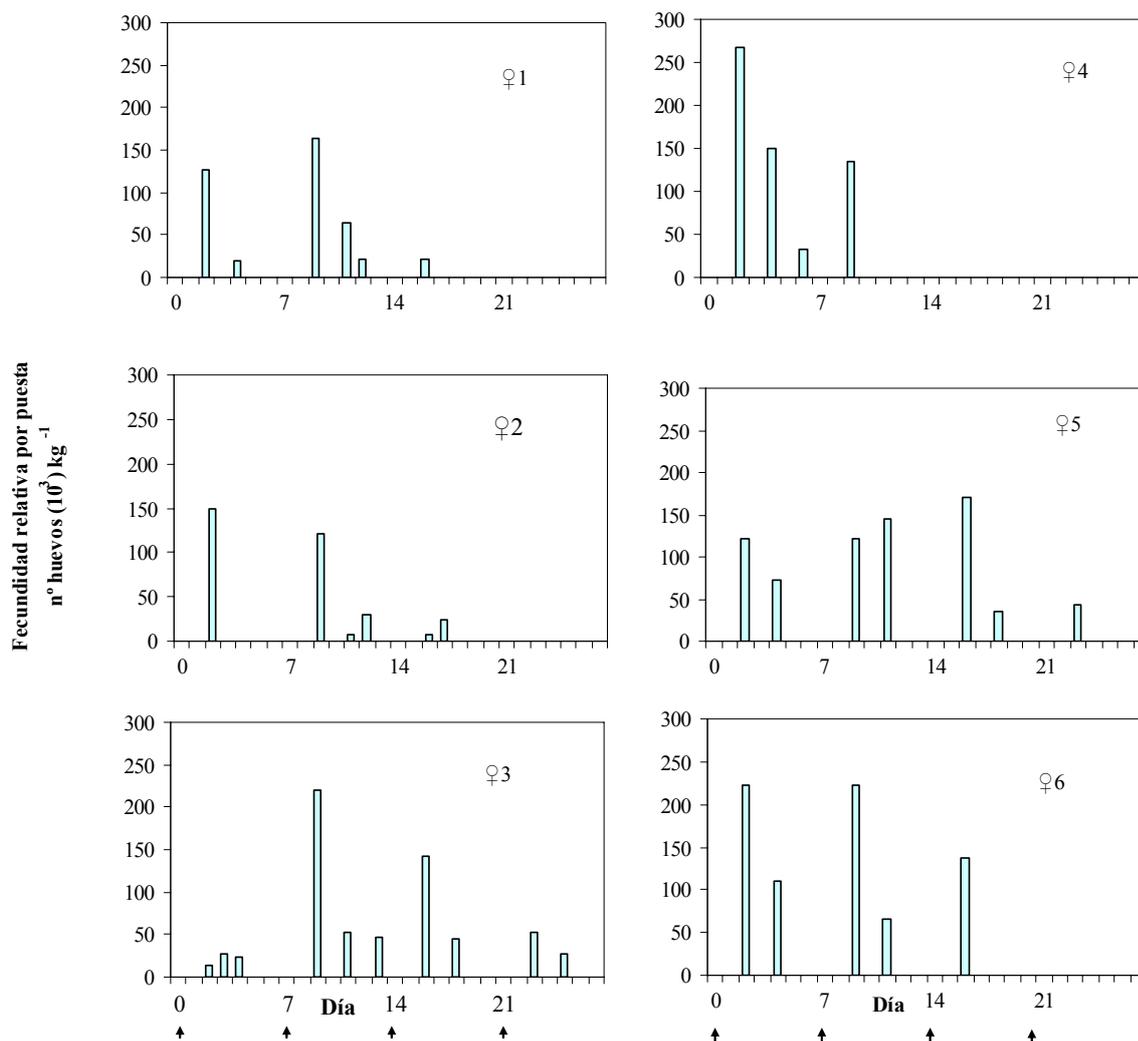
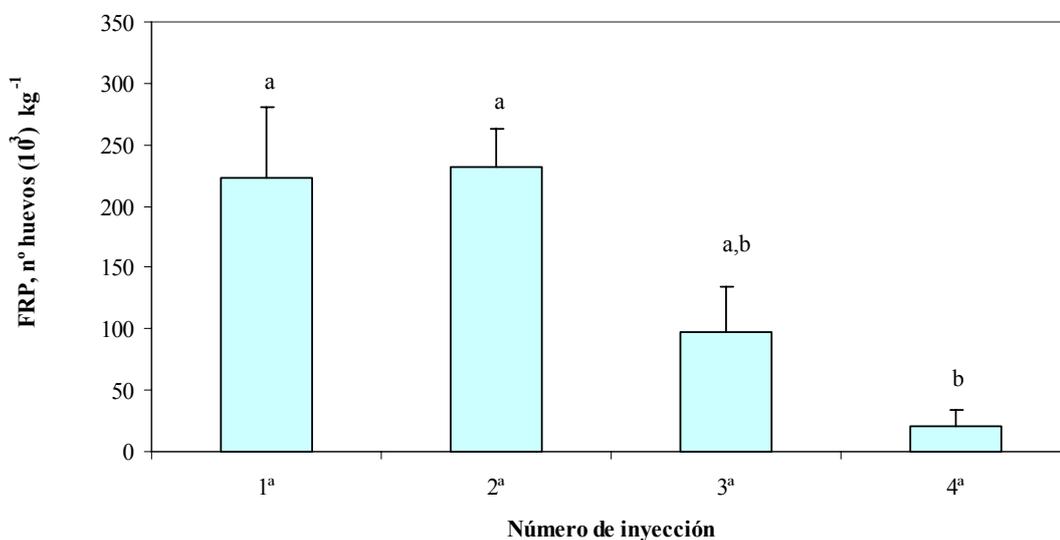


Figura 4.2. Secuencia de las puestas y fecundidad relativa por puesta de las hembras de lenguado senegalés inyectadas con GnRHa semanalmente. Las puntas de flecha indican el día de tratamiento.

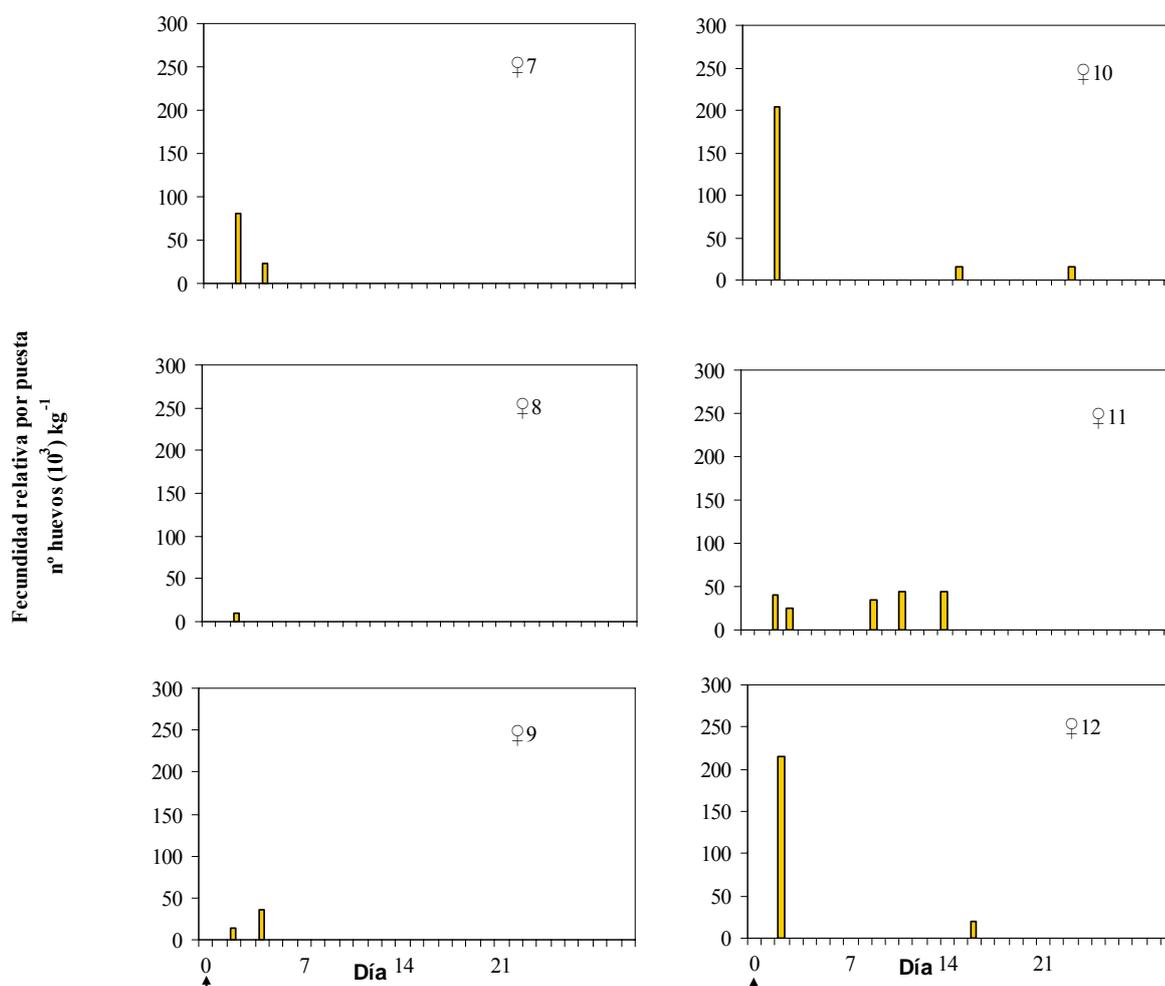


**Figura 4.3.** Fecundidades relativas parciales, medias  $\pm$  ESM (FRP) obtenidas en las hembras de lenguado senegalés después de cada inyección de GnRH. Las columnas con letras distintas fueron significativamente diferentes.

En las hembras implantadas, las cantidades mayores de huevos se obtuvieron a los dos días del tratamiento y solo las hembras 10, 11 y 12 produjeron pequeñas cantidades de huevos a lo largo del mes (Figura 4.4). Durante el periodo estudiado se obtuvo una media de  $2,7 \pm 0,6$  puestas por hembra (Tabla 4.1).

Para comparar dosis iguales de hormona entre los dos tratamientos, es decir  $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$  PC, se calculó la FRG de las dos primeras semanas del experimento, que se corresponden con la administración de dos inyecciones en el Grupo IN y el implante en el Grupo IM. No hubo diferencias significativas entre el Grupo IN y el Grupo IM obteniéndose  $223,0 \pm 57,8 \times 10^3$  y  $129,1 \pm 38,1 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$  PC, respectivamente.

De una hembra del Grupo Control (C) se pudo obtener una puesta de  $132 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$  PC y dos días después otra pequeña cantidad de huevos sobremaduros; de otra hembra control también se obtuvieron  $11,4 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$  PC.



**Figura 4.4.** Secuencia de las puestas y fecundidad relativa por puesta de las hembras de langosta senegalés tratadas con un implante de GnRHa. La punta de flecha indica el día de tratamiento.

El número medio de huevos mL<sup>-1</sup> en las puestas obtenidas por inducción hormonal fue de  $1493 \pm 26$  y el diámetro medio de los mismos fue  $1056,4 \pm 38,7 \mu$ . No se han encontrado diferencias significativas en estos parámetros según el método de administración. El peso de la hembra estuvo correlacionado positivamente con el diámetro de los huevos (Rho de Spearman = 0,513, p=0,000) y negativamente con el número de huevos mL<sup>-1</sup> (Rho de Spearman = -0,449, p=0,000). El peso medio de 1 mL de huevos determinado en 14 puestas fue de  $1070 \pm 3$  mg.

En total, se fecundaron 30 puestas, de las cuales 24 procedían de las hembras inyectadas, 5 de las hembras implantadas y 1 de una hembra control. Las tasas de fecundación y eclosión globales fueron  $16,6 \pm 2,5 \%$  y  $3,9 \pm 1,6 \%$  respectivamente.

Dado el diferente número de puestas obtenidas con los dos métodos de administración de la terapia hormonal, solo se compararon las tasas de fecundación y eclosión de las puestas obtenidas a los dos días del implante y de la primera inyección. Las tasas de fecundación y eclosión fueron bajas en ambos casos y no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2:** Tasas medias  $\pm$  ESM de fecundación y eclosión de las puestas de lenguado senegalés obtenidas a los dos días de la primera inyección hormonal y del implante.

Tratamiento	INYECCIÓN	IMPLANTE
Nº de puestas fecundadas	6	5
Tasa de fecundación	15,2 $\pm$ 2,9	13,6 $\pm$ 2,8
Tasa de eclosión	5,5 $\pm$ 2,0	0,1 $\pm$ 0,0

#### 4.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este estudio, el tratamiento hormonal de hembras F1 de lenguado senegalés mediante inyecciones repetidas ha sido más eficaz que el implante permitiendo obtener mayor cantidad de huevos por masaje abdominal. La obtención de huevos fecundados mediante inducción hormonal a la ovulación, masaje abdominal y fecundación artificial se ha utilizado en diversas especies como la platija amarilla *Pleuronectes ferrugineus* (Larsson et al., 1997), el trompetero australiano *Latris lineate* (Morehead et al., 1998), el rodaballo *Psetta maxima* (Mugnier et al., 2000), el pez piedra japonés *Inimicus japonicus* (Takushima et al., 2003), el mero moreno *Epinephelus marginatus* (Marino et al., 2003), el lenguado de Florida *Paralichthys lethostigma* (Luckenbach y Sullivan, 2004) y *Centropristis striata* ( Berlinsky et al., 2005). Las terapias hormonales basadas en la administración de GnRH $\alpha$  mediante los implantes de liberación sostenida o mediante las inyecciones múltiples son eficaces para

resolver las disfunciones reproductivas descritas en varias especies de peces de cultivo. En el lenguado senegalés, tanto los implantes como las inyecciones repetidas de GnRH $\alpha$  han promovido la ovulación y la puesta en tanques de reproductores F1 (Agulleiro et al., 2006, Mañanos et al., 2007, Guzmán et al., 2009) y la obtención de huevos mediante masaje abdominal (Chereguini et al., 2007b). En este trabajo, el tratamiento con inyecciones de GnRH $\alpha$  administradas cada 7 días ha permitido que las hembras respondan al menos a tres inyecciones consecutivas, siendo la cantidad de huevos inferior en la cuarta inyección en consonancia con los resultados obtenidos por Agulleiro et al. (2006) para el lenguado senegalés y por Mylonas et al. (2003) en la lubina europea *Dicentrarchus labrax*. El tratamiento mediante implante también ha permitido obtener puestas en todas las hembras, pero solo tres han producido cantidades grandes de huevos (hembras 7, 10 y 12) y prácticamente en una sola puesta. En *C. striata* la fecundidad relativa obtenida por masaje abdominal fue similar en las hembras que recibieron GnRH $\alpha$  mediante implante de liberación sostenida o mediante una única inyección (Berlinsky et al., 2005). De igual modo, en la lubina europea la fecundidad relativa obtenida mediante implante o una sola inyección fue similar (Forniés et al., 2001) mientras que con inyecciones múltiples se obtuvo la fecundidad relativa máxima (Mylonas et al., 2003). En otras especies como en la platija amarilla y en el rodaballo, el implante de GnRH $\alpha$  y el posterior masaje abdominal permite obtener puestas múltiples y sincronizar y concentrar las puestas reduciendo el intervalo entre ellas (Larsson et al., 1997, Mugnier et al., 2000). Igualmente en el trompetero australiano y en el mero moreno se obtuvieron puestas consecutivas después de un implante de GnRH $\alpha$  (Morehead et al., 1998, Marino et al., 2003). En este trabajo, cuando se aplicó la misma dosis hormonal, es decir, dos inyecciones o un implante, la fecundidad relativa fue igual en los dos grupos. De este modo, un segundo implante o un implante de mayor dosis hormonal podría mejorar la fecundidad relativa; sin embargo, las ventajas del uso de implantes como son la reducción del manejo de los reproductores y la menor mano de obra (Mugnier et al., 2000, Marino et al., 2003, Mylonas y Zohar, 2007), se perderían o los huevos obtenidos podrían ser de peor calidad (García, 1989, Mylonas et al., 1992, Haraldsson et al., 1993). Este aspecto necesitaría una mayor investigación.

El lenguado senegalés es una especie de desarrollo ovárico asincrónico con múltiples puestas y un continuo y rápido reclutamiento y desarrollo de los ovocitos hasta los estados postviletogénicos, porque en cualquier momento se pueden dar las condiciones adecuadas

para el desarrollo completo del ovocito y la puesta (García-López et al., 2007). La finalización de la vitelogénesis y el inicio de la maduración de los ovocitos requieren niveles relativamente bajos de LH mientras que la ovulación y la puesta necesitan aumentos agudos del nivel de LH (Mylonas et al., 2003). Según García-López et al. (2006a), en especies con múltiples puestas como el lenguado, los niveles de esteroides en sangre fluctúan en relación con los ciclos de reclutamiento de los ovocitos, maduración y liberación durante el periodo de puesta. En este estudio, la falta de puestas múltiples con cantidad grande de huevos procedentes del implante podría ser debido a que éste proporciona una cantidad constante de hormona en sangre mientras que las inyecciones múltiples causarían fluctuaciones de los niveles hormonales que permitirían obtener puestas consecutivas.

La fecundidad relativa obtenida en este estudio fue diferente a la obtenida por Agulleiro et al. (2006) y Guzmán et al. (2009). Las diferencias pueden deberse a la técnica utilizada para obtener los huevos (puesta en tanque frente a masaje abdominal), diferencias en las dosis o estados de maduración (Agulleiro et al., 2006) o a diferencias en los pesos de la hembras (Guzmán et al., 2009). La cinética de la producción de los huevos también fue diferente: Agulleiro et al. (2006) obtuvieron puestas a los 3 - 4 días después del tratamiento y Guzmán et al. (2009) a los 4 - 5 días, mientras que en este estudio se han obtenido puestas mediante masaje abdominal dos días después del tratamiento. Este mayor tiempo en la respuesta al tratamiento hormonal observado cuando los huevos se liberaron en el tanque podría ser debido a que las hembras F1 de lenguado retrasan la liberación espontánea de los huevos ovulados.

La calidad de los huevos obtenidos por implante o por inyección fue similar y no se han encontrado diferencias en el diámetro del huevo o las tasas de fecundación y de eclosión. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la lubina europea y *C. striata* (Forniés et al., 2001, Berlinsky et al., 2005). Las bajas tasas de fecundación y eclosión obtenidas en este experimento se debieron a que los huevos habían empezado el proceso de sobremaduración pues no se tuvo en cuenta el tiempo transcurrido entre la administración del tratamiento y el masaje abdominal, aspecto éste que se verá en el capítulo siguiente y es de máxima importancia en el lenguado senegalés.

En conclusión, para obtener huevos mediante masaje abdominal para la fecundación artificial se recomienda el uso de inyecciones repetidas en vez de implantes ya que no existen

diferencias en calidad de los huevos pero sí en la producción. Además, el coste económico del implante es superior a la inyección (12 € por kg frente a 1,95€, precios del año 2008).

**CAPÍTULO 5. TIEMPO DE OVULACIÓN Y VIABILIDAD DE LOS HUEVOS  
RETENIDOS EN LA CAVIDAD OVÁRICA. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA**



### 5.1 RESUMEN

Para establecer un protocolo de inducción hormonal a la ovulación, extracción de los huevos por masaje abdominal y fecundación artificial es necesario determinar, en primer lugar, el tiempo de ovulación, es decir, el número de horas transcurridas entre el tratamiento hormonal y la ovulación, y en segundo lugar, la duración de la viabilidad de los huevos retenidos en la cavidad ovárica de la hembra, con el fin de realizar el masaje abdominal en el momento preciso en que los huevos tienen la calidad máxima. Se determinó el tiempo de ovulación a 14 °C, 16 °C y 18 °C realizando presiones abdominales suaves cada tres horas desde las 32 horas del tratamiento hasta que se consiguió extraer huevos con facilidad. Posteriormente se continuó extrayendo pequeños lotes de huevos con intervalos de tres horas. Con todos los lotes de huevos se realizaron fecundaciones artificiales y se determinaron las tasas de fecundación y eclosión. El tiempo de ovulación estuvo inversamente correlacionado con la temperatura y fue a las  $53,2 \pm 0,5$ ,  $43,4 \pm 1,1$  y  $39,5 \pm 0,7$  horas a 14 °C, 16 °C y 18 °C respectivamente. A la temperatura más baja no se encontraron diferencias significativas en las tasas de fecundación y eclosión entre las 0, 3 y 6 horas postovulación. A 16 °C las mayores tasas de fecundación y eclosión se obtuvieron a las 0 y 3 horas postovulación y después decrecieron significativamente. A 18 °C las mayores tasas de fecundación y eclosión se obtuvieron en los huevos recién ovulados y estas tasas fueron significativamente inferiores a las 3 y 6 horas postovulación. Estos resultados indican que la temperatura influye tanto en el tiempo de ovulación como en la duración de la viabilidad de los huevos en la cavidad ovárica y que, en el caso del lenguado senegalés, el periodo de viabilidad es muy corto. Por ello, para obtener huevos de calidad para la fecundación artificial, es muy importante considerar la temperatura a la que se mantiene a los reproductores durante el tratamiento hormonal, determinar con precisión el tiempo de ovulación y realizar el masaje abdominal durante el corto periodo de tiempo en el que los huevos se mantienen viables. Las temperaturas de 14 °C a 16 °C aumentan la ventana de tiempo en que los huevos permanecen viables después de la ovulación, por lo que se recomiendan para el protocolo de inducción hormonal a la ovulación y extracción de los huevos por masaje abdominal.

## 5. 2 INTRODUCCIÓN

Una de las claves del éxito en la fecundación artificial es el tiempo transcurrido entre la ovulación y la recolección de los huevos. Si estos no se recolectan en la ventana de tiempo adecuada después de la ovulación se pueden obtener tasas de fecundación bajas (Flajshans et al., 2007), aumentar las tasas de mortalidad de los embriones y las larvas y el número de embriones deformes (Legendre et al., 2000, Aegerter y Jalabert 2004), debido al proceso conocido como sobremaduración de los huevos. Cuando la ovulación es inducida mediante un determinado tratamiento hormonal, es muy importante predecir con exactitud el tiempo de ovulación (tiempo transcurrido entre la administración del tratamiento hormonal y la ovulación) para cada especie (Mylonas et al., 2010). El tiempo de ovulación dependerá principalmente de la propia especie, de la hormona empleada, de la dosis y de factores ambientales como por ejemplo la temperatura. Además, los huevos, una vez ovulados, pueden permanecer en la cavidad ovárica o en el abdomen de la hembra sin pérdida de la calidad durante un periodo de tiempo que depende de la especie (Billard y Gillet, 1981) y de factores ambientales, por lo que también es muy importante determinar la extensión de ese periodo de tiempo en cada caso concreto (Bromage et al., 1994).

La temperatura es uno de los factores ambientales claves que afectan a la ovulación. Cada especie tiene un rango óptimo de temperatura para la puesta y cuando la ovulación se induce dentro de este rango, diferencias pequeñas de temperatura pueden acelerar o retrasar el proceso. Como los peces son animales poiquilotermos, la velocidad de las reacciones fisiológicas, como la respuesta a una estimulación a la ovulación mediante hormonas exógenas, está controlada por la temperatura (Phelps et al., 2007). En general, el tiempo transcurrido entre la administración de la hormona y la ovulación está negativamente correlacionado con la temperatura, aunque puede haber intervalos de temperatura en los que el tiempo de ovulación es más o menos constante (Drori et al., 1994). La viabilidad postovulatoria también decrece más rápidamente a temperaturas altas, así en *Misgurnus anguillicaudatus*, el periodo de viabilidad óptima pasa de 6 - 8 horas a 20 °C a 3 - 4 horas a 30 °C (Suzuki, 1975 citado en Van Der Kraak y Pankhurst 1996). Según Howell y Scott (1989) la tasa de envejecimiento de los huevos de rodaballo retenidos en la cavidad ovárica también aumenta con la temperatura.

El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de la temperatura en el tiempo de ovulación y la viabilidad de los huevos retenidos en la cavidad ovárica de la hembra a tres temperaturas y así avanzar en el establecimiento de un método de inducción hormonal a la ovulación y fecundación artificial para el lenguado senegalés.

### 5.3 MATERIALES Y MÉTODOS ESPECÍFICOS

Se seleccionaron tres temperaturas dentro del rango en el que se obtienen puestas espontáneas en los ejemplares salvajes (Anguis et al., 2005): 14 °C, 16 °C y 18 °C. En las tres temperaturas elegidas se indujo la ovulación de un grupo de hembras de cultivo (F1) en estado E III de maduración gonadal con una inyección intramuscular de 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  PC de GnRH $\alpha$  a las 12 a.m. A las 32 ó 38 horas, según la temperatura del experimento, se comenzó a realizar presiones abdominales suaves cada tres horas hasta que se detectó la ovulación al obtener los primeros huevos con facilidad, y se determinó el tiempo de ovulación como el número de horas transcurridas entre la inyección hormonal y la ovulación. En este momento solo se extrajo una pequeña cantidad de huevos (entre 10 y 15 mL aproximadamente) y luego se continuó realizando presiones abdominales, con intervalos de tres horas, para obtener más lotes pequeños de huevos. El lote de huevos obtenido en el momento en el que se detectó la ovulación se identificó como 0 horas postovulación (0hpo), los siguientes lotes de huevos se identificaron como 3 horas postovulación (3hpo), 6 horas postovulación (6hpo), etc. Los lotes de huevos de cada hembra se fecundaron inmediatamente utilizando el mismo “pool” de esperma crioconservado, según el método ya descrito en el Capítulo 3 (apartados 3.5 y 3.6) y se determinaron las tasas de fecundación y eclosión. La Tabla 5.1 refleja el número de hembras inducidas hormonalmente en cada grupo y su peso medio.

Los tratamientos a 16 °C y 18 °C se realizaron con hembras de la Planta de Cultivos Marinos de “El Bocal” en los años 2009 y 2012 respectivamente. El inicio de la maduración gonadal de estas hembras se indujo, como se describió en el Capítulo 3, mediante saltos térmicos entre 16 °C y 18 °C y siempre se administró el tratamiento hormonal después de mantener a los ejemplares a la temperatura del experimento al menos un día.

A 16 °C las presiones abdominales de cada hembra se comenzaron a realizar a las 32 horas de la administración del tratamiento hormonal, se determinó el tiempo de ovulación y se obtuvieron lotes de huevos a las 0, 3, 6, 9 y 12 hpo. De cada lote de huevos extraído a esta temperatura se determinó además el porcentaje de viabilidad aparente como se describió en el Capítulo 3.

A 18 °C las presiones abdominales de cada hembra se empezaron a realizar a las 35 horas del tratamiento, se determinó el tiempo de ovulación y se extrajeron lotes de huevos a 0, 3 y 6 hpo.

La inducción hormonal a 14 °C se realizó en el año 2011 en las instalaciones de una empresa de acuicultura gallega con hembras F1. Las condiciones de estabulación de los ejemplares fueron similares a las de la Planta de Cultivos Marinos “El Bocal”, aunque la alimentación fue mixta: pienso comercial de reproductores (Skretting) y alimento natural (mejillón, gusana, calamar y gamba). La maduración gonadal se consiguió mediante oscilaciones del termoperiodo entre 16 °C y 18 °C y tres días antes del inicio del experimento se aclimató a los ejemplares a 14 °C. La primera presión abdominal se realizó 38 horas después de la inyección de hormona. Una vez detectada la ovulación y determinado el tiempo de ovulación se extrajeron huevos a 0, 3 y 6 hpo y se realizó la fecundación artificial con espermatozoos criopreservados de machos de la empresa.

También se presentan los datos de tiempos de ovulación obtenidos a 18 °C de 11 hembras F1 inducidas en la empresa y en las que la presión abdominal se realizó cada dos horas. La alimentación de estas hembras fue mixta (pienso y alimento natural) y antes de la inyección hormonal se mantuvieron a 18 °C al menos un día. Nos referiremos a estas hembras como 18 °C G mientras que las hembras tratadas a 18 °C en la Planta de Cultivos Marinos “El Bocal” se nombrarán como 18 °C ST.

Los datos de tiempo de ovulación a las diferentes temperaturas así como las tasas de fecundación y eclosión obtenidos con los lotes de huevos retenidos en la cavidad ovárica de la hembra durante diferentes periodos de tiempo se expresan como media  $\pm$  ESM. La normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas se analizaron mediante el Test de Kolmogorov-Smirnov y el estadístico de Levene respectivamente. El análisis de los resultados se realizó mediante ANOVA o sus equivalentes no paramétricos de Kruskal-Wallis y Mann-

Whitney con un nivel de significación de  $p < 0.05$ . Asimismo se realizó el estudio de la correlación entre temperatura y tiempo de ovulación mediante el test no paramétrico de Spearman.

#### 5. 4 RESULTADOS

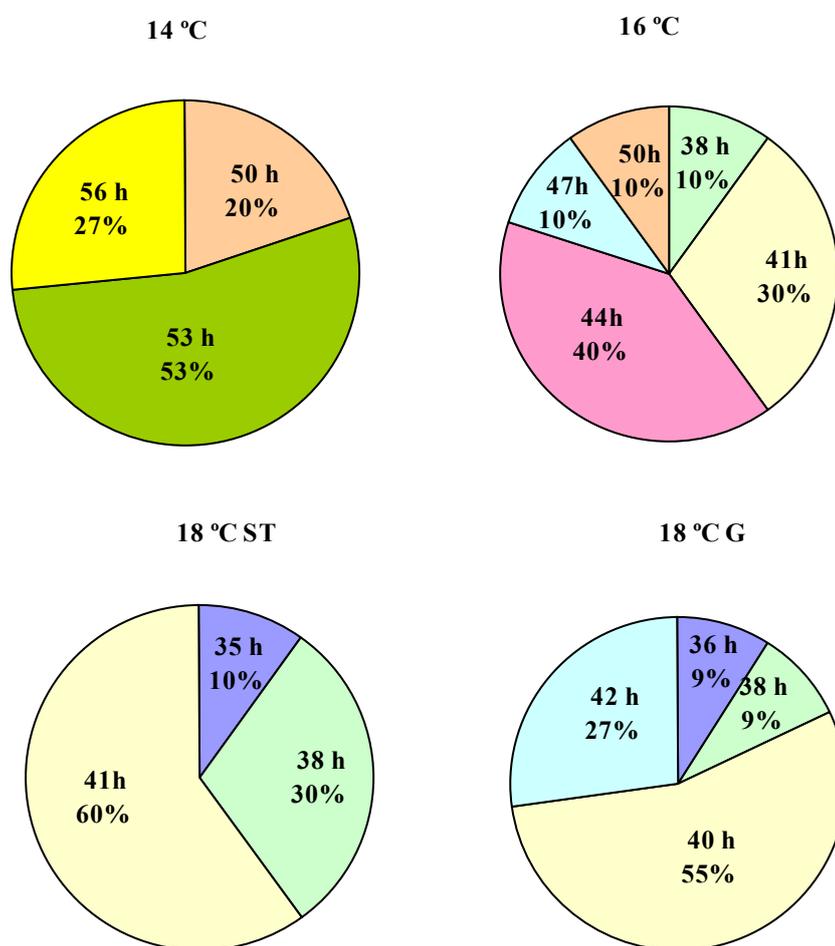
En la Tabla 5.1 y Figura 5.1 se recoge la información del número de hembras tratadas a cada temperatura, los pesos, el porcentaje de hembras que ovularon, el tiempo de ovulación medio y la distribución de los tiempos de ovulación. Los pesos de las hembras tratadas en la empresa gallega a 14 y 18 °C fueron significativamente mayores que los de las hembras tratadas en la Planta de Cultivos “El Bocal” a 16 y 18 °C.

A 14 °C se trataron 19 hembras y el 79% respondieron a la inyección hormonal; la mayoría ovuló a las 53 horas postratamiento, variando entre las 50 y las 56 horas. De las 15 hembras tratadas a 16 °C respondieron el 67%, y la ovulación se detectó a las 41-44 horas del tratamiento en el 70% de ellas, variando entre las 38 y las 50 horas. A 18 °C respondieron todas las hembras tratadas, tanto del grupo ST como del grupo G; el 60 % de las hembras ST ovularon a las 41 horas y el 55% de las hembras G ovularon a las 40 horas. No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de ovulación entre los dos grupos de hembras tratados a 18 °C, así que al comparar el tiempo de ovulación entre las tres temperaturas seleccionadas, los datos de los grupos 18 °C ST y 18 °C G se analizaron conjuntamente. Se encontraron diferencias significativas en el tiempo de ovulación entre las tres temperaturas probadas siendo las medias 53,2 horas a 14 °C, 43,4 horas a 16 °C y 39,8 horas a 18 °C. La temperatura y el tiempo de ovulación estuvieron correlacionados negativamente (R de Spearman= -0.861,  $p=0.000$ ).

## Tiempo de ovulación y viabilidad de los huevos

**Tabla 5.1.** Número de hembras de lenguado senegales tratadas con GnRH a 14 °C, 16 °C y 18 °C, pesos medios  $\pm$  ESM, porcentajes de hembras que ovularon y tiempos medios de ovulación  $\pm$  ESM. Las letras superíndices diferentes en las filas indican diferencias significativas.

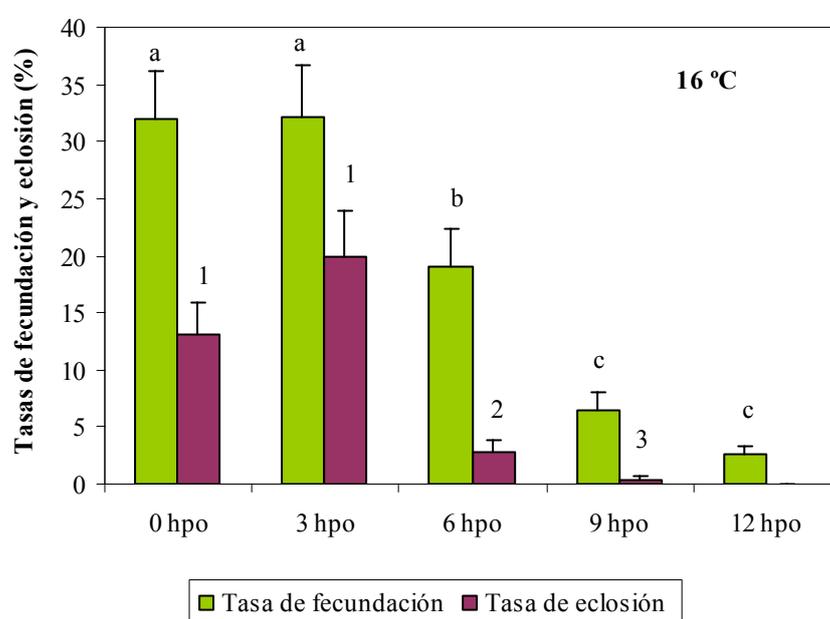
	14 °C	16 °C	18 °C ST	18 °C G
<b>Número de ♀ tratadas</b>	19	15	10	11
<b>Peso (g)</b>	1930 $\pm$ 110 <sup>a</sup>	1278 $\pm$ 120 <sup>b</sup>	1436 $\pm$ 96 <sup>b</sup>	2118 $\pm$ 90 <sup>a</sup>
<b>% Ovulación</b>	79	67	100	100
<b>Tiempo de ovulación (horas)</b>			39,5 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	40,1 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
	53,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	43,4 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	39,8 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	



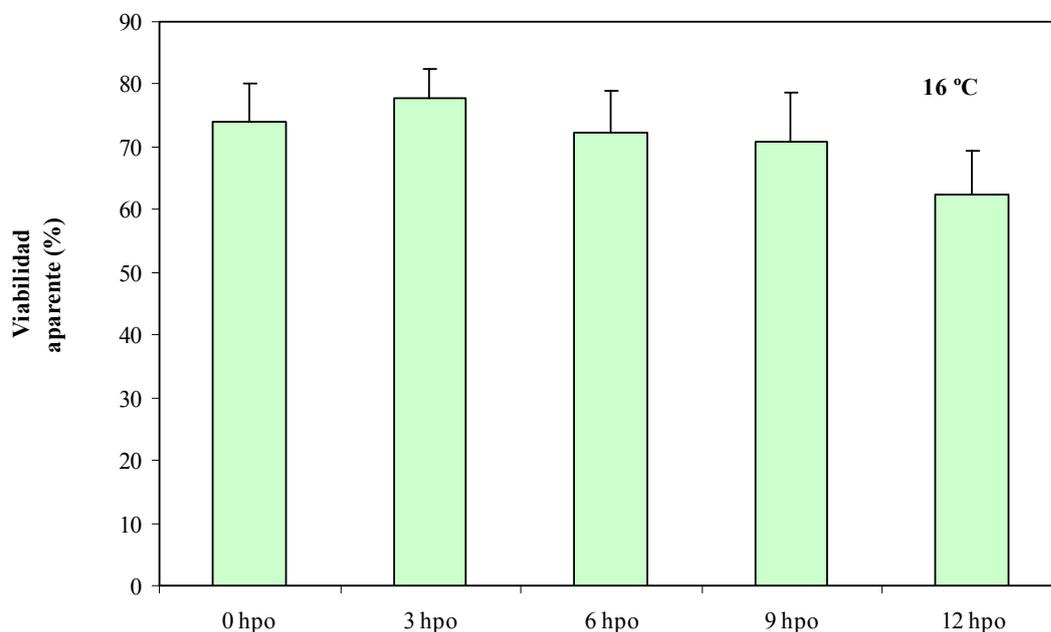
**Figura 5.1.** Distribución de los tiempos de ovulación de las hembras de lenguado senegalés tratadas con GnRH a 14 °C, 16 °C y 18 °C.

El estudio de la duración de la viabilidad de los huevos retenidos en la cavidad ovárica a 16 °C, medido en términos de porcentaje de viabilidad aparente y de resultados de las FAs, se realizó con los lotes de huevos de 9 hembras a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas postovulación. En el momento en el que se detectó la ovulación (0 hpo) las tasas de fecundación fueron altas,  $32,03 \pm 4,06$  %, manteniéndose durante 3 hpo y luego decreciendo. A partir de las 6 hpo, en muchas de las FAs realizadas se observaron divisiones irregulares y/o asincrónicas. En cuanto a las tasas de eclosión también fueron significativamente mayores a las 0 y 3 hpo (Figura 5.2); aunque la tasa media de eclosión en el momento de la ovulación fue menor,  $13,14 \pm 2,71$  %, que en 3 hpo,  $19,88 \pm 4,12$  %, no se encontraron diferencias significativas. Se observó que la tasa de fecundación se mantuvo más tiempo que la de eclosión, incluso a las 12 horas de la ovulación se pudieron observar algunos huevos fecundados pero no llegaron a eclosionar.

Los porcentajes de viabilidad aparente han sido similares en todos los tiempos postovulación, aunque la mayor viabilidad aparente se obtuvo a las 3 hpo (Figura 5.3).

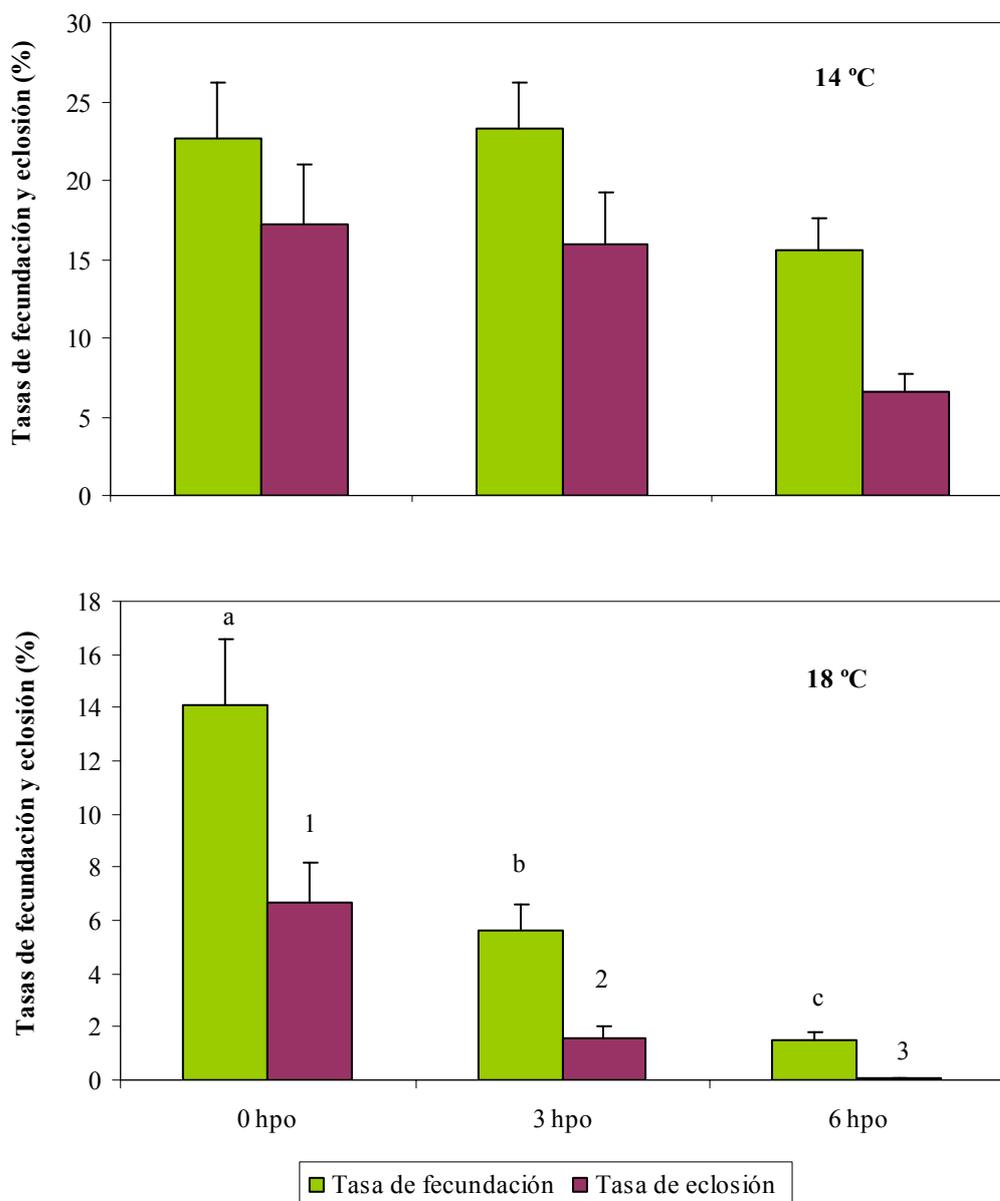


**Figura 5.2.** Evolución de las tasas de fecundación y de eclosión (medias  $\pm$  ESM) de las FAs de los huevos de lenguado senegalés obtenidos, tras inducción hormonal a 16 °C y retenidos en la cavidad ovárica 0, 3, 6, 9 y 12 horas postovulación (hpo). Las letras y números distintos sobre las barras de error indican diferencias significativas en las tasas de fecundación y de eclosión respectivamente.



**Figura 5.3.** Porcentajes medios de viabilidad aparente  $\pm$  ESM de los huevos retenidos en la cavidad ovárica de las hembras de lenguado senegalés 0, 3, 6, 9 y 12 horas después de la ovulación (hpo) a 16 °C.

A la temperatura de 14 °C la viabilidad de los huevos retenidos en la cavidad ovárica se valoró en 8 hembras a las 0, 3 y 6 hpo mediante FA. No se encontraron diferencias significativas en las tasas de fecundación y eclosión en ninguna de las tres horas postovulación estudiadas. Igualmente a 18 °C se realizaron FA a las 0, 3 y 6 hpo; se utilizaron los huevos de 10 hembras ST y se encontraron diferencias significativas, tanto en las tasas de fecundación como en las de eclosión, entre 0, 3 y 6 hpo, siendo la calidad de los huevos recién ovulados superior a los retenidos 3 y 6 horas en la cavidad ovárica (Figura 5.4).



**Figura 5.4.** Evolución de las tasas de fecundación y de eclosión (medias  $\pm$  ESM) de las FAs de los huevos de lenguado senegalés obtenidos tras inducción hormonal a 14 °C y 18 °C, y retenidos en la cavidad ovárica 0, 3 y 6 horas postovulación (hpo). Las letras y números distintos sobre las barras de error indican diferencias significativas en las tasas de fecundación y eclosión respectivamente.

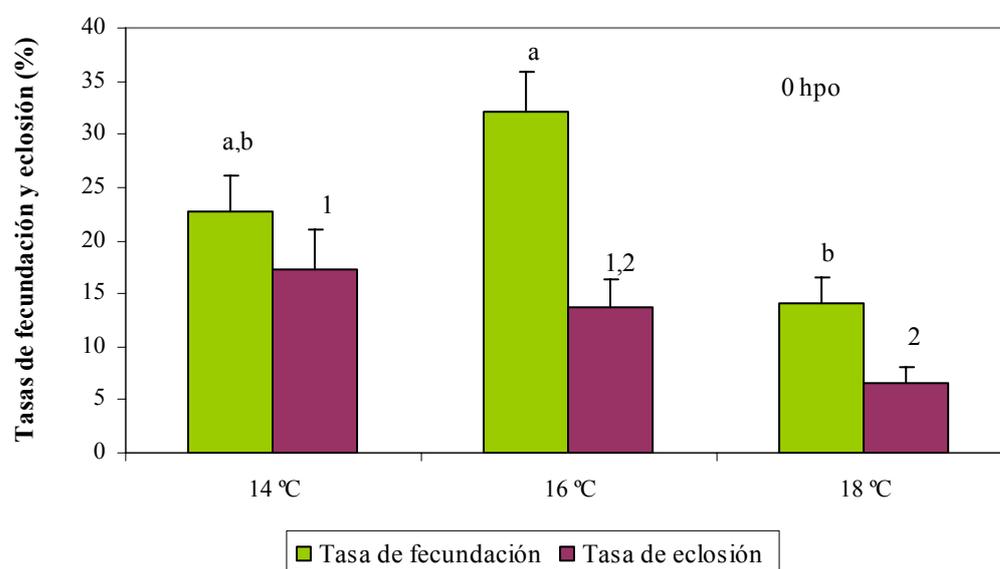
Si consideramos que cuando se detecta la ovulación la calidad de los huevos es máxima, es decir es el 100% de sus posibilidades de fecundación y eclosión, después de 6 horas retenidos en la hembra a 16 °C los huevos mantendrían el 59% y el 17% de las posibles tasas de fecundación y eclosión respectivamente. A 18 °C la pérdida de calidad ya aparece cuando los huevos se fecundan tres horas después de la ovulación y 6 horas después de la ovulación solo

mantendrían el 11% y el 1% de las tasas de fecundación y eclosión, mientras que a 14 °C los huevos mantienen la máxima calidad durante las 6 horas probadas en este estudio (Tabla 5.2). Es decir, a medida que aumenta la temperatura la calidad de los huevos retenidos en el interior de la hembra se mantiene menos tiempo.

**Tabla 5.2.** Pérdida de las posibilidades de fecundación y eclosión de los huevos de lenguado senegalés retenidos 0, 3 y 6 horas postovulación (hpo) en la cavidad ovárica a 14 °C, 16 °C y 18 °C.

	Fecundación			Eclosión		
	0 hpo	3 hpo	6 hpo	0 hpo	3 hpo	6 hpo
14 °C	100%	100%	100%	100%	100%	100%
16 °C	100%	100%	59%	100%	100%	17%
18 °C	100%	40%	11%	100%	30%	1%

Al comparar las tasas de fecundación y eclosión en el momento de la ovulación (0hpo) entre las tres temperaturas se encontraron diferencias significativas en las tasas de fecundación entre 16 °C y 18 °C y en las tasas de eclosión entre 14 °C y 18 °C (Figura 5.5).



**Figura 5.5.** Tasas medias  $\pm$  ESM de fecundación y eclosión en el momento de la ovulación (0 hpo) a 14 °C, 16 °C y 18 °C, obtenidas en las FAs de huevos de lenguado senegalés después de inducción a la ovulación con GnRH $\alpha$ . Las letras y números distintos sobre las barras de error indican diferencias significativas en las tasas de fecundación y eclosión respectivamente.

## 5.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El tiempo transcurrido entre la ovulación y la extracción de los huevos por masaje abdominal es de suma importancia para el éxito de la fecundación artificial, debido a que los huevos cuando están retenidos en el interior de la hembra, sufren un proceso de deterioro conocido como sobremaduración durante el cual pierden la capacidad de producir embriones viables. Por este motivo hay que predecir con exactitud cuando se produce la ovulación para cada especie sometida a una determinada terapia hormonal y realizar el masaje abdominal durante el periodo de tiempo que los huevos mantienen la calidad máxima (Mylonas et al., 2010). El tiempo transcurrido entre el tratamiento hormonal y la ovulación (tiempo de ovulación) depende de la especie, del estado de madurez inicial de la hembra (Takushima et al., 2003), del tipo de hormona (Drori et al., 1994), de la dosis (Sahoo et al., 2008), de la temperatura (Fortuny et al., 1988, Drori et al., 1994, Sato et al., 2000, Arabaci et al., 2001, Phelps et al., 2007) y de la hora del día en la que se administra el tratamiento (García 1990, Alvariño et al., 1992).

Según Drori et al. (1994) generalmente el tiempo de ovulación está negativamente correlacionado con la temperatura, y en varias especies se han establecido relaciones de tipo exponencial (Legendre et al., 2000, Sato et al., 2000) o lineal (Fortuny et al., 1988) entre la temperatura y el tiempo de ovulación. En el lenguado el tiempo de ovulación al utilizar análogos sintéticos de la gonadotropina, en una dosis de  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  PC y con un estado E III de desarrollo gonadal, estuvo inversamente correlacionado con la temperatura dentro del rango entre  $14^\circ\text{C}$  y  $18^\circ\text{C}$  y la ovulación se produjo a las 53,2 horas a  $14^\circ\text{C}$ , a las 43,4 horas a  $16^\circ\text{C}$ , y a las 39,8 horas a  $18^\circ\text{C}$ . Según Harmin y Crim (1992), la ovulación inducida mediante tratamiento hormonal ocurre más rápidamente con temperaturas del agua calientes que con frías. Con temperaturas entre  $17^\circ\text{C}$  y  $32^\circ\text{C}$ , la ovulación se produce entre las 24 y 48 horas después del tratamiento hormonal, sin embargo, este tiempo se alarga mucho con temperaturas relativamente bajas (inferiores a  $10^\circ\text{C}$ ), así por ejemplo *Pseudopleuronectes americanus* tarda 13 días en ovular a  $2^\circ\text{C}$ . En la Tabla 5. 3 figuran los tiempos de ovulación y la duración de la viabilidad de los huevos retenidos en la hembra de varias especies de teleósteos.

## Tiempo de ovulación y viabilidad de los huevos

**Tabla 5.3.** Tiempo de ovulación y duración de la viabilidad de los huevos retenidos en el interior de la hembra de varias especies de Teleósteos cuando la ovulación fue inducida mediante tratamiento hormonal.

Especie	Hormona	Tiempo de ovulación	viabilidad	Autor
<i>Clarias lazera</i>	Extracto de pituitaria	20 °C: 16 a 30 h 25 °C: 9 a 13,5 h 30 °C: 6,5 a 9 h		Hogendoorn y Vismans, 1980
<i>Salmo gairdneri</i>	17 $\alpha$ - hydroxy 20 $\beta$ hydroprogesterona		10 °C: 3 días; 19 °C: 2 días	Billard y Gillet, 1981
<i>Salmo trutta</i>	17 $\alpha$ - hydroxy 20 $\beta$ hydroprogesterona		10 °C: 3 días; 15 °C: 1 día	Billard y Gillet, 1981
<i>Prochilodus platensis</i>	Extracto de pituitaria y hCG	24,5 °C: 12 h 28 °C: 9 h	26 °C-27 °C: 1 h	Fortuny et al., 1988
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	LHRHa	0 °C: 28 días 0,5 °C: 25,8 días 2 °C: 13 días		Harmin y Crim, 1992
<i>Cyprinus carpio</i>	LHRHa	22,5 °C a 25 °C: 14 h		Drori et al., 1994
<i>Heterobranchus longifilis</i>	hCG	30 °C: 8 a 11h	29 °C: <2 h	Legendre y Otéeme, 1995
<i>Pangasius hypophthalmus</i>	Ovaprim; hCG	27,1 °C: 3 h 31, 7 °C: 11h	(27,1 - 28,8) °C: 2 h	Legendre et al., 2000
<i>Leporinus elongatus</i>	Pituitaria de carpa	23 °C: 9,8 h 25 °C: 8,4 h		Sato et al., 2000
<i>Cyprinus carpio</i>	LHRHa	20 °C: 20 h 21 °C: 17 h 22 °C a 25 °C: 14 h 26 °C: 11 h		Arabaci et al., 2001
<i>Ictalurus punctatus</i>	LHRHa	24 °C: 58 a 64 h 26 °C: 48 a 52 h 28 °C: 24 a 30 h	2 h	Phelps et al., 2007
<i>Solea senegalensis</i>	LHRHa	14 °C: 50 a 56 h 16 °C: 38 a 50 h 18 °C: 35 a 42 h	14 °C: 6 h 16 °C: 3 h 18 °C: <3 h	Datos de esta tesis

Los pesos de las hembras empleados en los experimentos realizados en las distintas instalaciones (G y ST) fueron diferentes, sin embargo no parece que el peso tenga un papel relevante en el tiempo de ovulación ya que no hubo diferencias significativas a 18 °C en hembras G de peso  $2118 \pm 90$  g y hembras ST de peso  $1436 \pm 96$  g.

En las tres temperaturas estudiadas se ha encontrado variabilidad en el tiempo de ovulación entre las hembras, así a 14 °C el tiempo de ovulación varió entre 50 a 56 horas, a 16 °C entre 38 y 50 horas y a 18 °C entre 35 y 42 horas. Esta variabilidad en el tiempo de ovulación puede ser debida a que las hembras no estaban exactamente en el mismo estado de desarrollo gonadal. El estado de maduración elegido fue E III, según la escala de Anguis y Cañavate (2005), que se corresponde principalmente con ovocitos en estado vitelógeno final (García-López et al., 2007). Este método de determinación del estado de madurez se basa en la apariencia externa del ejemplar y es útil para seguir la evolución de la maduración de las hembras en la gestión del stock reproductor salvaje; sin embargo podría no ser suficientemente preciso para seleccionar las hembras F1 que van a recibir el tratamiento hormonal. Por otro lado parte de la variabilidad encontrada en el tiempo de ovulación podría ser dependiente de la propia especie; así Phelps et al. (2007) citan una serie de especies, como la carpa común *Cyprinus carpio*, *Heteropneustes fossilis* y el sábalo rayado *Prochilodus platensis*, en que el tiempo entre la inducción hormonal y la ovulación es predecible con un margen de variación pequeño, mientras que en otras especies, como la panga *Pangasius hypophthalmus*, la lubina estriada *Morone saxatilis* y el esturión blanco *Acipenser transmontanus*, no es predecible.

El periodo de tiempo en que los huevos mantienen su calidad máxima es específico y puede variar desde los 4 - 6 días en la trucha arco iris *Salmo gairdneri* (Springate et al., 1984) a las 2 horas en el bagre de canal *Ictalurus punctatus* (Phelps et al., 2007) o 1 hora en *Morone chrysops* (Mylonas et al., 1996). Esta pérdida de viabilidad o sobremaduración de los huevos puede deberse a una hipoxia (Stevensa, 1966 citado en Springate et al., 1984), a cambios en la permeabilidad de la membrana (Hirose et al., 1977) o a una disminución en las reservas de ATP que afecten al desarrollo embrionario (Boulckbache et al., 1989, citado en Legendre y Otéeme, 1995). Además, en los últimos estados de sobremaduración, hay una ruptura proteolítica de las proteínas del huevo y una pérdida de moléculas orgánicas pequeñas y fragmentos a través de su membrana (Crack y Harvey, 1984, citado en Van Der Kraak y

Pankhurst, 1996). En nuestro estudio los huevos han mantenido la calidad durante un periodo máximo de 6 horas a 14 °C. Este periodo relativamente corto también se ha encontrado en el bagre de canal y en el híbrido *M. chrysops* (hembra) x *M. saxatilis* (macho), ya citados anteriormente, y en otras especies como *Heterobranchus longifilis*, (Legendre y Otémé 1995), el sábalo rayado (Fortuny et al., 1988) y la panga (Legendre et al., 2000) (ver Tabla 5.3).

La temperatura a la que se mantienen los reproductores durante el periodo de postovulación es un factor importante que determina la duración de la viabilidad de los huevos (Phelps et al., 2007, Van der Kraak y Pankhurst, 1996), y existe una tendencia general a aumentar la duración de la viabilidad al disminuir la temperatura (Woynarovich y Horvath, 1980 citado por Phelps et al., 2007). En este estudio, la duración de la viabilidad de los huevos ha aumentado al disminuir la temperatura: a 18 °C los huevos ya habían perdido gran parte de la viabilidad cuando se extrajeron 3 horas después de la ovulación, a 16 °C la viabilidad se mantenía 3 horas y a 14 °C 6 horas.

En las temperaturas más altas estudiadas, 16 °C y 18 °C, cuando la viabilidad de los huevos empezó a decrecer, las tasas de eclosión se redujeron más dramáticamente que las de fecundación; incluso 12 horas después de la ovulación a 16 °C y 6 horas después a 18 °C aún era posible la fecundación, si bien en muchos de los huevos fecundados se observaron divisiones irregulares y/o asincrónicas que eran indicadoras de la calidad mala de los huevos (Kjørsvik et al., 2003). En las especies de agua dulce como *C. carpio*, *Inimicus japonicus*, *Anguilla japonica* y *Clarias batrachus*, también se observó que la capacidad de eclosión se redujo en mayor medida que la capacidad de fecundación (Statova et al., 1982, Ohta et al., 1996, Takushima et al., 2003, Sahoo et al., 2008). Otros estudios de especies marinas como el bacalao (*Gadus morhua*) o el halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) han mostrado que la tasa de fecundación se mantiene durante más tiempo que la capacidad de desarrollo normal de los embriones (Kjørsvik et al., 1990).

A 16 °C las tasas medias de eclosión fueron menores en el momento de la ovulación que tres horas después aunque no se encontraron diferencias significativas. Estos resultados podrían deberse a que al realizar la presión abdominal al ejemplar, el primer lote contiene huevos de ovulaciones anteriores y por tanto sobremaduros. Los porcentajes de viabilidad aparente a las 0 hpo fueron menores que a las 3 hpo, lo cual apoyaría la idea de que el primer lote de huevos contiene mayor número de huevos sobremaduros. Otra posible explicación de la inferior

viabilidad del huevo recién ovulado, que también se ha observado en la trucha arco iris *Salmo gairdneri* (Bromage et al., 1994), en el ayu *Plecoglossus altivelis* (Hirose et al., 1977), en el salmón plateado *Oncorhynchus kisutch* (Fitzpatrick et al., 1984) y en *Limanda yokahamae* (Hirose et al., 1979), podría ser la necesidad de un periodo de maduración postovulatorio en el ovario de la hembra, quedando este aspecto por investigar en el caso del lenguado senegalés.

Las tasas de fecundación y eclosión obtenidas cuando los huevos se han extraído y fecundado a las 0 y 3 horas postovulación a 16 °C son mejores que las obtenidas en el Capítulo anterior, donde se estudió el método de administración de la terapia hormonal pero no se consideró ni la hora en la que se administró el tratamiento ni la hora en la que se extrajeron los huevos (Tabla 5.4).

**Tabla 5.4.** Tasas medias  $\pm$  ESM de fecundación y eclosión obtenidas en la FA cuando la extracción de los huevos de lenguado senegalés se realizó considerando el tiempo de ovulación y la duración de la viabilidad de los huevos en el interior de la hembra (0 hpo y 3hpo) y cuando no se consideró en la experiencia del Capítulo anterior, implante frente a la inyección.

	Tasa de fecundación	Tasa de eclosión
<b>0 hpo</b>	32,03 $\pm$ 4,06	13,14 $\pm$ 2,71
<b>3 hpo</b>	32,06 $\pm$ 4,59	19,88 $\pm$ 4,12
<b>Implante- Inyección</b>	16,6 $\pm$ 2,5	3,9 $\pm$ 1,6

Como se explicó en el Capítulo 1 de esta tesis, la mayoría de las puestas recogidas en tanque de lenguado senegalés F1 no están fecundadas. Aunque Mañanos et al. (2007) sugieren una importante disfunción reproductiva de los machos F1, ya que obtienen puestas fecundadas procedentes de hembras F1 con machos salvajes, no se puede descartar que, dado el corto periodo de viabilidad de los huevos en el interior de la hembra obtenido en este estudio, la falta de huevos fecundados en la F1 podría ser también debida a un retraso en la liberación de los huevos después de la ovulación. Esta posibilidad ya ha sido sugerida en lenguado senegalés por Guzmán et al. (2008) y en *Rhombosolea tapirina* por Pankhurst y Fitzgibbon (2006).

Los resultados de las FAs realizadas en el momento en el que se detectó la ovulación apuntan a una peor calidad de los huevos a 18 °C ya que la tasa de fecundación a esta temperatura fue significativamente inferior a la obtenida a 16 °C y la tasa de eclosión inferior a la obtenida a

14 °C; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en fecundación y eclosión entre 14 °C y 16 °C. La temperatura de 18 °C está dentro del rango óptimo de reproducción de esta especie y en cautividad se obtienen puestas fecundadas de forma regular de ejemplares salvajes a esta temperatura. Además, en un ensayo preliminar no incluido en este trabajo, dos hembras tratadas hormonalmente a 18 °C que fueron chequeadas cada dos horas para determinar el tiempo de ovulación produjeron huevos que al ser fecundados artificialmente dieron unas tasas de fecundación y eclosión del 52,7% y 46,9% respectivamente, por lo que la temperatura *per se* no debe ser la causa de las diferencias obtenidas. Sin embargo, tres horas podría ser un intervalo de tiempo demasiado amplio para determinar con precisión el momento de la ovulación a 18 °C y dada la rápida pérdida de viabilidad de los huevos a esta temperatura es posible que los primeros huevos obtenidos de algunas hembras ya hubieran empezado el proceso de sobremaduración.

A 18 °C ovularon la totalidad de las hembras tratadas mientras que a 14 °C y 16 °C algunas hembras no respondieron al tratamiento hormonal. Esta tendencia a aumentar el número de hembras que responden al tratamiento al aumentar la temperatura coincide con los datos obtenidos en *Ictalurus punctatus* (Phelps et al., 2007) donde a 26 °C y 28 °C el porcentaje de hembras que ovularon era superior que a 24 °C. Sin embargo, cuando la temperatura supera el rango óptimo de puesta, el número de hembras que responden a la inyección hormonal también puede verse reducido (Rottmann y Shireman, 1985).

En conclusión, el tiempo de ovulación y la duración de la viabilidad de los huevos de lenguado senegalés retenidos en la cavidad ovárica de la hembra están fuertemente influidos por la temperatura. El corto periodo de tiempo en el que los huevos mantienen la calidad una vez ovulados hace que en el lenguado senegalés sea muy importante, para cada tipo de tratamiento hormonal, predecir con la mayor exactitud el tiempo de ovulación, y realizar el masaje abdominal cuando los huevos sean aún viables. Las temperaturas de 14 a 16 °C aumentan la ventana de tiempo en que los huevos permanecen viables después de la ovulación, por lo que se recomiendan para el protocolo de inducción hormonal a la ovulación y extracción de los huevos por masaje abdominal.

**CAPÍTULO 6. EFECTO DE LA HORA DE ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO HORMONAL EN EL TIEMPO DE OVULACIÓN Y EN LA CALIDAD Y CANTIDAD DE LOS HUEVOS**



## 6.1 RESUMEN

Para desarrollar un protocolo de inducción hormonal a la ovulación y fecundación artificial en el lenguado senegalés es necesario determinar la influencia de la hora del día de administración del tratamiento hormonal en el tiempo de ovulación y en la calidad de los huevos. Para ello se inyectó GnRHa a tres grupos de hembras, a las 06:00 horas (Grupo 6), a las 12:00 horas (Grupo 12) y a las 19:00 horas (Grupo 19). La ovulación se detectó  $42,5 \pm 0,6$  horas después del tratamiento, independientemente de la hora de la inyección hormonal; sin embargo, el tiempo de ovulación fue más homogéneo en los Grupos 6 y 12 al ovular la mayoría de las hembras a las 41 ó 44 horas después del tratamiento. Además, las tasas de fecundación fueron más bajas en las puestas obtenidas de las hembras inyectadas a las 19:00 horas que en las inyectadas a las 06:00 horas ó a las 12:00 horas y el mayor número de larvas se obtuvo cuando el tratamiento se administró a las 06:00 horas. Estos resultados sugieren que el tratamiento hormonal se debe aplicar en las primeras horas de la mañana para obtener el máximo número de huevos de buena calidad.

## 6.2 INTRODUCCIÓN

Para obtener huevos mediante masaje abdominal para la fecundación artificial, se debe determinar cuando sucede la ovulación, ya que los huevos una vez ovulados, si no se extraen de la cavidad ovárica o abdominal del pez, comienzan a perder viabilidad en un proceso conocido como sobremaduración (Mylonas et al., 2010). El tiempo transcurrido entre la inducción hormonal y la ovulación o tiempo de ovulación, depende de la especie, del tipo de hormona (Drori et al., 1994), de la dosis (Sahoo et al., 2008), de la temperatura (Fortuny et al., 1988, Arabaci et al., 2001, Phelps et al., 2007) y de la hora del día en la que se administre el tratamiento (García, 1990). En capítulos anteriores de esta tesis hemos establecido que la inyección es un método apropiado para la administración del tratamiento de GnRHa en lenguado senegalés y que la viabilidad de los huevos en la cavidad ovárica de la hembra no

supera las tres horas a 16 °C. Esta corta viabilidad hace que, en esta especie, sea muy importante detectar con precisión el tiempo de ovulación para las condiciones específicas de cada tratamiento y realizar la presión abdominal cuando los huevos tienen la mejor calidad.

En diversas especies de Teleósteos se ha sugerido que la hora de administración del tratamiento de GnRHa puede influir en el tiempo de ovulación y en la calidad de los huevos; así por ejemplo en *Lates calcarifer* si el tratamiento se aplica a las 11:00 ó a las 17:00 horas la puesta se produce 33,7 - 40 horas después, pero si el tratamiento se aplica a las 23:00 ó a las 05:00 horas, la puesta se retrasa a las 38 - 47,3 horas postratamiento (García, 1990); en *Anguilla japonica* se obtienen mejores tasas de fecundación y eclosión cuando el tratamiento se da a las 18:00 horas en vez de a las 09:00 horas (Kagawa et al., 1997). Sin embargo, en otras especies la ovulación parece ser independiente de la hora del día en la que se administra el tratamiento (Drori et al., 1994, Arabaci et al., 2001).

El objetivo del presente trabajo fue determinar si en el lenguado senegalés la hora del día en la que se da el tratamiento hormonal influye en el tiempo de ovulación y en la calidad de los huevos, comparando la administración de la terapia hormonal en tres horas distintas del día: 06:00, 12:00 y 19:00 horas.

### **6.3 MATERIALES Y MÉTODOS ESPECÍFICOS.**

Se seleccionaron tres grupos de hembras a las que se inyectó, intramuscularmente, 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  PC de GnRHa disuelto en suero salino, en los siguientes horarios: a las 06:00 horas (Grupo 6), a las 12:00 horas (Grupo 12) y a las 19:00 horas (Grupo 19). Cada hembra recibió una sola inyección. La temperatura del agua de los tanques donde se encontraban los reproductores se mantuvo a 16 °C desde el día anterior al tratamiento hormonal hasta que se obtuvieron los huevos por masaje abdominal. Treinta y dos horas después de la inyección, y luego cada tres horas, se muestrearon los ejemplares realizando suaves presiones abdominales para detectar la ovulación. Cuando ésta se detectó, se extrajeron los huevos mediante masaje abdominal y se determinó el tiempo de ovulación (número de horas transcurridas entre la inyección y la ovulación). Se midió el volumen de huevos obtenido y se calculó la fecundidad relativa como

el volumen de huevos (mL) x 1493/peso hembra (kg), donde 1493 es el número medio de huevos que hay en 1 mL (Capítulo 4). Se determinó el porcentaje de viabilidad aparente de los huevos e inmediatamente se fecundaron tres alícuotas de 1 mL de huevos de cada puesta con espermatozoides criopreservados y se determinaron las tasas de fecundación y eclosión. El Grupo 12 fue el utilizado en el Capítulo 5, los datos de volumen total de huevos se obtuvieron como la suma de las cantidades extraídas en los distintos tiempos postovulación y las tasas de fecundación y eclosión, así como los porcentajes de viabilidad aparente, son los correspondientes a las 0 horas postovulación.

Los datos de peso, edad, tiempo de ovulación, fecundidad relativa, porcentaje de viabilidad aparente, y tasas de fecundación y eclosión se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM). La normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas se analizaron mediante los test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Los resultados obtenidos en los tres grupos se compararon mediante ANOVA o mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Las comparaciones post-hoc se realizaron mediante el test de Gabriel o el test de Mann-Whitney. En todos los casos se utilizó el nivel de significación  $p < 0.05$ .

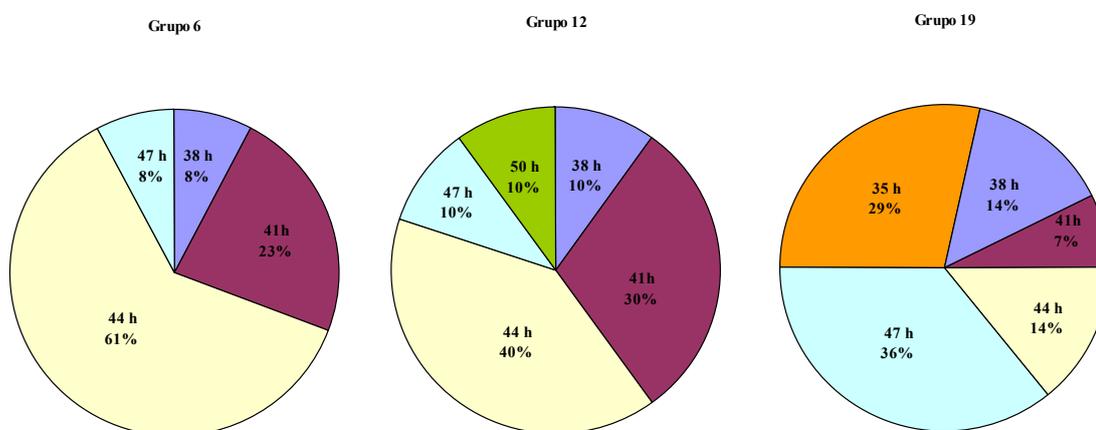
## 6.4 RESULTADOS

No se encontraron diferencias en el peso y edad media de las hembras de los tres grupos. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el tiempo medio de ovulación, siendo la media global de los tres grupos  $42,5 \pm 0,6$  horas (Tabla 6.1). En los Grupos 6 y 12 los tiempos de ovulación variaron entre las 38 y las 47 horas y entre las 38 y las 50 horas respectivamente, y el 85% de las hembras del Grupo 6 y el 70% de las del Grupo 12 ovularon a las 41 o 44 horas. En el Grupo 19 el tiempo de ovulación varió entre las 35 y las 47 horas, y la mayoría de las hembras ovularon en estos tiempos extremos (Figura 6.1). Así, las ovulaciones se obtuvieron principalmente entre las 23:00 y las 02:00, las 05:00 y las 08:00 o las 06:00 y las 18:00 horas según que el tratamiento se diera a las 06:00, a las 12:00 ó a las 19:00 horas,

respectivamente. No obstante, no todas las hembras respondieron al tratamiento, el mayor porcentaje de hembras que ovularon se encontró en el Grupo 6 mientras que el menor en el Grupo 12. Si consideramos solo las hembras que ovularon después del tratamiento hormonal, no se encontraron diferencias significativas en la fecundidad relativa entre los tres grupos como se refleja en la Tabla 6.1. Por otro lado, considerando el total de las hembras que recibieron el tratamiento hormonal, se encontraron diferencias significativas en la fecundidad relativa entre el Grupo 6 ( $134 \pm 15 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$ ) y el Grupo 12 ( $65 \pm 16 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$ ), pero no entre el Grupo 19 ( $102 \pm 19 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$ ) y el Grupo 6 ó 12.

**Tabla 6.1.** Número de hembras, pesos, edades, tasas de ovulación, tiempos de ovulación, fecundidades relativas, porcentajes de viabilidad aparente y tasas de fecundación y eclosión de las FAs realizadas con los huevos de lenguado senegalés obtenidos después del tratamiento con una inyección de GnRH $\alpha$  a diferentes horas del día (Grupo 6 inyectado a las 06:00, Grupo 12 inyectado a las 12:00 y Grupo 19 inyectado a las 19:00 horas). Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM. Los valores de las filas con distintas letras superíndices son significativamente diferentes.

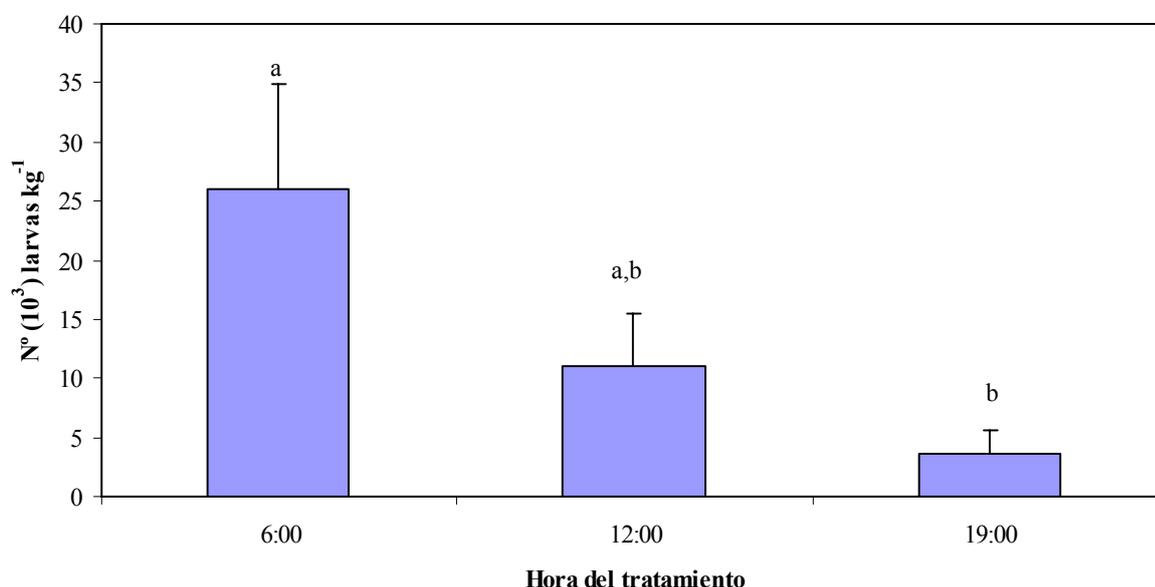
	Grupo 6	Grupo 12	Grupo 19
Nº de hembras tratadas	14	15	17
Peso (g)	1539 $\pm$ 120	1278 $\pm$ 120	1266 $\pm$ 93
Edad (años)	4,8 $\pm$ 0,5	5,1 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,3
<b>Efectos en la ovulación</b>			
Tasa de ovulación (%)	93	67	82
Tiempo de ovulación (horas)	43,1 $\pm$ 0,6	43,4 $\pm$ 1,1	41,4 $\pm$ 1,4
<b>Efectos en la cantidad y calidad de los huevos (excluyendo a las hembras que no ovularon)</b>			
Fecundidad relativa (Nº huevos ( $10^3$ ) $\text{kg}^{-1}$ ♀)	145 $\pm$ 12	98 $\pm$ 16	123 $\pm$ 19
Porcentaje de viabilidad aparente (%)	68,3 $\pm$ 6,9	74,1 $\pm$ 6,1	52,4 $\pm$ 11,0
<b>Pruebas de fecundación artificial (excluyendo las puestas totalmente sobremaduras)</b>			
Tasa de fecundación (%)	25,0 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	31,0 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>	11,3 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>
Tasa de eclosión (%)	17,9 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	14,4 $\pm$ 2,6 <sup>a,b</sup>	7,8 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>



**Figura 6.1.** Porcentajes de hembras de lenguado senegalés que ovularon en los distintos tiempos de ovulación según la hora del día de la administración del tratamiento hormonal. Grupo 6 inyectado a las 06:00, Grupo 12 inyectado a las 12:00 y Grupo 19 inyectado a las 19:00 horas.

No se han encontrado diferencias significativas en los porcentajes medios de viabilidad aparente entre los tres grupos (Tabla 6.1), sin embargo es de destacar que en el Grupo 19 hubo 5 hembras cuya viabilidad aparente fue cero, es decir todos los huevos estaban claramente sobremaduros, frente a los Grupos 6 y 12 que tuvieron una y ninguna respectivamente. Las pruebas de fecundación artificial se realizaron excluyendo las puestas en las que los huevos estaban sobremaduros y las tasas de fecundación del Grupo 19 fueron significativamente inferiores a las encontradas en los Grupos 6 y 12. Las tasas de eclosión del Grupo 19 también fueron significativamente inferiores a las del Grupo 12 (Tabla 6.1).

Teniendo en cuenta la acumulación de efectos desde la administración del tratamiento hormonal a un grupo de hembras hasta la obtención de las larvas recién eclosionadas, es decir, el número de hembras que respondieron al tratamiento o tasa de ovulación, la producción y la calidad de los huevos y el número de huevos fecundados y eclosionados, el método más productivo fue el realizado a las 06:00 horas, encontrando diferencias significativas en el número de larvas por kg de hembra entre el Grupo 6 y el Grupo 19, como se refleja en la Figura 6.2.



**Figura 6.2.** Número medio  $\pm$  ESM de larvas por kg de hembra de lenguado senegalés que se pueden obtener según la hora del día en la que se administre el tratamiento hormonal. Grupo 6 inyectado a las 06:00, Grupo 12 inyectado a las 12:00 y Grupo 19 inyectado a las 19:00 horas.

## 6.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el lenguado senegalés el tiempo transcurrido entre la inyección hormonal y la ovulación no varió con la hora del día en que se administró el tratamiento aunque la respuesta fue más homogénea cuando el tratamiento se aplicó por la mañana. En algunas especies como *A. japonica* (Kagawa et al., 1997) y *Cyprinus carpio* (Drori et al., 1994, Arabaci et al., 2001) el tiempo de ovulación es independiente de la hora de administración del tratamiento hormonal mientras que en otras especies como *L. calcarifer* es dependiente (García, 1990). También en *Dicentrarchus labrax* la hora del día de administración de la hormona modificó tanto el ritmo de desarrollo del ovocito como los niveles de secreción de esteroides sexuales, de modo que los ovocitos completaron la ruptura de la vesícula germinal más rápidamente en el grupo de

hembras inyectadas con LHRHa a las 10:00 horas que en el grupo inyectado a las 22:00 horas (Alvariño et al., 1992).

En el lenguado senegalés, cuando la inyección se administró a las 12:00 horas, el número de hembras que respondió al tratamiento fue menor que en los otros grupos, y por lo tanto también el número total de huevos obtenidos. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otras especies; así en *Sparus aurata* el tratamiento con GnRHa a las 22:00 horas inducía la puesta de forma más efectiva que cuando se administraba a cualquier otra hora del día (Zohar 1988); en carpa, la inyección de homogenizado de hipófisis de carpa era más eficiente a las 09:00 horas que a las 21:00 horas (Bieniarz et al., 1985) y en *L. calcarifer* cuando el tratamiento hormonal con GnRHa se administró durante el día la producción de huevos por kg de hembra fue mayor que por la noche (García, 1990). Por otro lado, la diferencia encontrada en la producción de huevos podría también deberse a la variabilidad de las hembras ya que no se encontraron diferencias significativas en la fecundidad relativa de las hembras que ovularon entre los tres tratamientos.

La hora de administración de la inyección de hormona afectó a la calidad de los huevos, obteniéndose tasas de fecundación y eclosión mejores cuando el tratamiento se realizó por la mañana, como se refleja en la Tabla 6.1. En *A. japonica* los resultados de fecundación y eclosión fueron mejores en las hembras tratadas a las 18:00 horas que a las 09:00 horas (Kagawa et al., 1997). La diferente calidad de los huevos de lenguado senegalés según la hora del día en la que se administró el tratamiento hormonal podría deberse a la existencia de ciclos diarios en la sensibilidad de la pituitaria a la GnRHa o del ovario a la gonadotropina como se ha demostrado en otras especies de Teleósteos. En *Carassius auratus* se han demostrado variaciones temporales en la respuesta del ovario a la gonadotropina (Peter et al., 1982) así como un ciclo diario en los niveles de GtH en plasma (Peter, 1981). En machos de carpa tratados a las 6:00 horas hay una elevación de GtH a las 24 horas que no ocurre cuando el tratamiento se da a las 20:00 horas (Billard et al 1987). También se han descrito modelos diarios en los niveles de las hormonas involucradas en el ciclo reproductivo en *Pagrus major* (Matsuyama et al., 1988), *Pagrus auratus* (Carragher y Pankhusrt, 1993) y en machos de *D. labrax* (Bayarri et al., 2004b). En el lenguado senegalés se han descrito, en primavera, ritmos diarios de estradiol y testosterona con acrofases al final de la tarde que preceden a la puesta, la

cual se extiende durante 11 horas, desde las 21:00 horas a las 08:00 horas (Oliveira et al., 2009a, b). La mejor calidad de los huevos obtenidos en este estudio cuando el tratamiento hormonal se administró por la mañana podría estar relacionada con este ritmo nocturno de puesta del lenguado ya que cuando se inyecta a las 06:00 horas ó a las 12:00 horas, la respuesta se obtiene durante la noche, entre las 23:00 horas y las 08:00 horas.

En conclusión, la hora del día en la que se aplica el tratamiento hormonal de GnRH $\alpha$  no influye en el tiempo de ovulación pero si en la homogeneidad de dichos tiempos y en la cantidad y calidad de los huevos. Se recomienda que, para obtener el mayor número de larvas a 16 °C, el tratamiento se administre en las primeras horas de la mañana y se realice el masaje abdominal a las 41-44 horas para obtener los huevos de la mejor calidad posible para la fecundación artificial. Este aspecto es importante para planificar el trabajo en el criadero, pues la obtención de huevos se deberá hacer en las últimas horas de la noche o primeras de la mañana.

**CAPÍTULO 7. VALORACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS HUEVOS ANTES DE LA  
FECUNDACIÓN ARTIFICIAL**



## 7.1 RESUMEN

La práctica de la fecundación artificial requiere indicadores de calidad de los huevos, rápidos y fáciles de medir, que nos permitan predecir el éxito de la misma, especialmente en el caso del lenguado senegalés, dada la poca cantidad de espermatozoides que se obtiene de cada macho. Como posibles indicadores de calidad se valoraron: a) el porcentaje de viabilidad aparente basado en el aspecto externo de los huevos, b) la flotabilidad y c) el pH del líquido ovárico, en 57 puestas obtenidas mediante un protocolo estándar de inducción hormonal a la ovulación y masaje abdominal. Además, estas puestas se fecundaron artificialmente y se determinaron las tasas de fecundación y eclosión. El porcentaje de viabilidad aparente presentó una débil correlación con la tasa de fecundación. No obstante, ninguno de los indicadores estudiados resultó fiable para predecir el éxito de la fecundación artificial. Es de destacar que con puestas de flotabilidad nula se obtuvieron tasas de fecundación y eclosión altas.

## 7.2 INTRODUCCIÓN

La calidad de los huevos de los peces marinos cultivados, definida como el potencial de los huevos de producir alevines viables (Kjørsvik et al., 1990), es muy variable y puede ser un factor limitante en el éxito de las técnicas de reproducción utilizadas en los criaderos.

Aunque los huevos poseen características intrínsecas que determinan la calidad, como por ejemplo la edad de las madres, la genética, la composición del huevo y el tamaño (Lahnsteiner et al., 2009), la calidad es altamente dependiente del envejecimiento que sufren los huevos en la cavidad ovárica de la hembra desde el momento de la ovulación. Este fenómeno se conoce como sobremaduración y está siempre asociado a un empeoramiento de la calidad. La sobremaduración debe ser evitada, pero como hoy en día no es posible determinar el momento de la ovulación sin causar un estrés considerable a los reproductores, puede ser útil investigar los cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante la

sobremaduración y definir aquellas características que se correlacionen con la calidad de los huevos y que pueden ser usadas como indicadores (Lahnsteiner 2000).

Los indicadores deben ser sencillos y no requerir largos o sofisticados procedimientos de laboratorio. Además, en el caso de realizar la fecundación artificial y especialmente en el lenguado senegalés, en que la cantidad de esperma que se obtiene de cada macho es de unos pocos microlitros (Cabrita et al., 2006, Chereguini et al., 2006, García- López et al., 2006b), deben ser determinados rápidamente después del masaje abdominal, para poder decidir la conveniencia de realizar o no la fecundación artificial.

Los huevos de la mayoría de los peces marinos de cultivo son pequeños y transparentes, por lo que se pueden utilizar criterios morfológicos para valorar la calidad. De hecho, características como la transparencia, la forma, la distribución de las gotas de grasa y la existencia de espacio perivitelino se han usado para diferenciar entre huevos de buena y mala calidad, puesto que estos últimos suelen ser opacos (Lahnsteiner et al., 2009). En peces pelágicos se ha usado la flotabilidad para distinguir entre huevos malos y buenos, ya que los primeros normalmente no flotan. Además, en varias especies se ha encontrado una relación positiva entre flotabilidad y eclosión. Por último, el pH del líquido ovárico también se ha relacionado con la calidad de los huevos en varias especies de peces (Fauvel et al., 1993b, Lahnsteiner et al., 1999, Mansour et al., 2008).

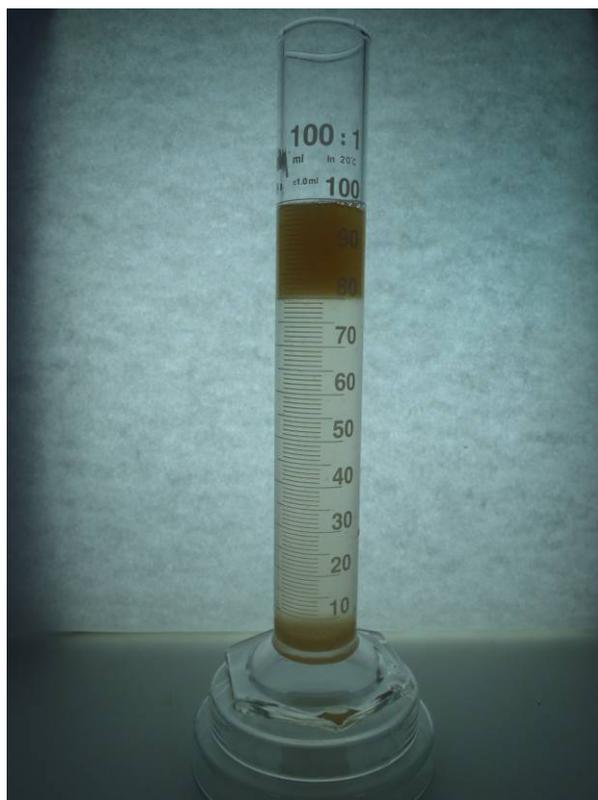
El objetivo de este Capítulo ha sido estudiar la relación de la morfología del huevo, la flotabilidad y el pH del líquido ovárico, características fáciles y rápidas de determinar antes de realizar la fecundación artificial, con el éxito de la misma y proponer su posible uso como indicadores de calidad de los huevos.

### **7.3 MATERIALES Y MÉTODOS ESPECÍFICOS**

Se estableció un protocolo estándar de inducción hormonal a la ovulación y obtención de huevos por masaje abdominal que consistió en: mantener la temperatura del agua de los reproductores a 16 °C, inducir la ovulación de hembras en estado E III de desarrollo gonadal

mediante inyección de 25  $\mu\text{g}$  de GnRH $\alpha$  Kg $^{-1}$  PC a las 12 a.m. y posteriormente realizar el masaje abdominal para extraer los huevos a las 44 horas (08:00 a.m.).

Se valoraron las siguientes características de los huevos como indicadores de calidad de las puestas: porcentajes de viabilidad aparente (como se describe en el Capítulo 3), porcentaje de flotabilidad de los huevos y pH del líquido ovárico. La flotabilidad de los huevos se determinó colocando 20 mL de huevos en una probeta graduada de 100 mL y enrasando a 100 con agua de salinidad 35; pasados 15 minutos se midió la cantidad de huevos flotantes y no flotantes y se calculó el porcentaje de flotabilidad como mL de huevos flotantes x 100 / mL de huevos totales (Figura 7.1). El pH del líquido ovárico se registró con un pHmetro Crisol GLP22.



**Figura 7.1.** Determinación de la flotabilidad de los huevos de lenguado senegales obtenidos mediante inducción hormonal a la ovulación y masaje abdominal, antes de realizar la fecundación artificial.

Para establecer si los parámetros valorados podrían ser indicadores de la calidad de los huevos antes de realizar la fecundación, en cada puesta se realizaron pruebas de FA según el protocolo descrito en el Capítulo 3 (Apartado 3.6) y se determinaron las tasas de fecundación y eclosión.

Las posibles relaciones entre el pH, el porcentaje de viabilidad aparente y el de flotabilidad con las tasas de fecundación y eclosión se analizaron mediante los test de correlación de Pearson o Spearman después de estudiar la normalidad de los datos con el test de Kolmogorov-Smirnov.

#### 7.4 RESULTADOS

En este estudio se obtuvieron 57 puestas en las que se midieron los pH, los porcentajes de viabilidad aparente y de flotabilidad, y se realizaron pruebas de FA. La Tabla 7.1 refleja el número de puestas, los valores medios  $\pm$  ESM, los valores máximos y mínimos de la flotabilidad, de la viabilidad aparente, del pH y las tasas de fecundación y de eclosión.

**Tabla 7.1.** Número de puestas de lenguado senegalés obtenidas mediante un protocolo estándar de inducción hormonal a la ovulación y masaje abdominal, porcentajes de flotabilidad y viabilidad aparente y pH de las puestas, tasas de fecundación y eclosión de los ensayos de FA.

	Flotabilidad (%)	Viabilidad aparente (%)	pH	Tasa de fecundación	Tasa de eclosión
<b>Número de puestas</b>	48	57	57	57	38
<b>media <math>\pm</math> S. E. M</b>	53,6 $\pm$ 6,2	80,2 $\pm$ 1,9	7,92 $\pm$ 0,03	36,5 $\pm$ 2,9	19,8 $\pm$ 2,8
<b>max</b>	100,0	97,8	8,75	85,1	59,3
<b>min</b>	0,0	36,9	7,51	0,9	0,0

Se encontraron correlaciones significativas bajas entre el porcentaje de viabilidad aparente y la tasa de fecundación, entre los porcentajes de viabilidad y flotabilidad, y entre el pH y la flotabilidad. Sin embargo, el coeficiente de correlación entre las tasas de fecundación y eclosión fue alto y significativo (Tabla 7.2). Es de destacar que puestas con una flotabilidad

nula presentaron tasas de fecundación y eclosión que variaron desde 12,5% a 74,9% y de 0,1% a 36,5% respectivamente, valores similares a los encontrados cuando la flotabilidad fue del 100% (Tabla 7.3).

**Tabla 7.2.** Coeficientes de correlación entre los indicadores estudiados para evaluar la calidad de las puestas de lenguado senegalés y las tasas de fecundación y eclosión de las FAs. \* Nivel de significación  $p=0.05$ ; \*\* nivel de significación  $p=0.000$ .

	Flotabilidad	Viabilidad aparente	pH	Tasa de fecundación
Viabilidad aparente	0,338*			
pH	0,365*	0,143		
Tasa de fecundación	0,067	0,291*	-0,085	
Tasa de eclosión	0,141	0,151	0,267	0,690**

**Tabla 7.3.** Valores medios, máximo y mínimo de las tasas de fecundación y eclosión obtenidas cuando la flotabilidad de los huevos de lenguado senegalés fue nula ó fue del 100%.

		Flotabilidad (%)	
		0	100
Tasa de fecundación	media	37,7±4,7	39,2±8,8
	Max	74,9	85,1
	min	12,5	1,7
Tasa de eclosión	media	16,9±3,7	24,6±9,2
	Max	36,5	58,5
	min	0,1	2,2

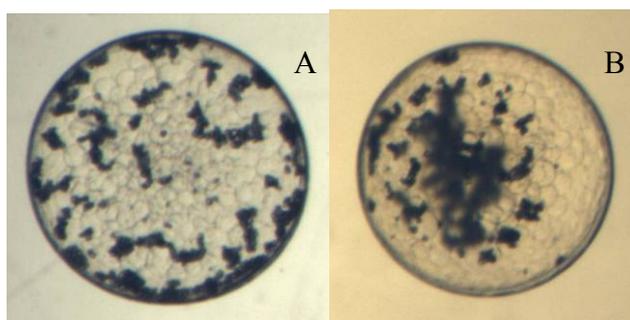
## 7.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Al realizar la fecundación artificial, una de las cuestiones más importantes es la determinación rápida y fácil de la calidad de los huevos obtenidos, es decir, si los huevos tienen la capacidad de ser fecundados y desarrollarse posteriormente en embriones normales. En el caso del lenguado senegalés es crucial dada la poca cantidad de esperma que se obtiene mediante el

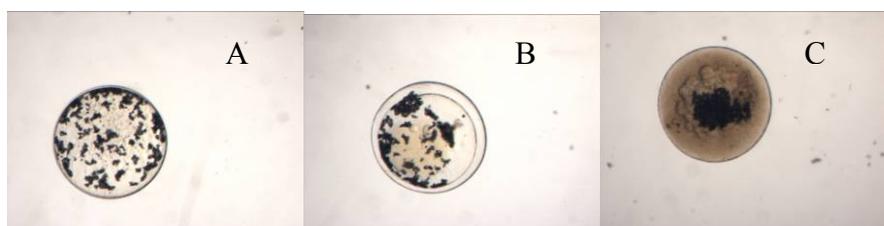
masaje abdominal de cada macho, que debería ser utilizada para fecundar puestas de buena calidad. Como estimadores de la calidad de los huevos antes de la fecundación se han utilizado la flotabilidad, la morfología, el tamaño, la transparencia y la posición o disposición de las gotas de grasa cuando hay más de una, y parámetros bioquímicos, principalmente el pH del fluido ovárico (Lahnsteiner et al., 2009).

En este estudio solo el porcentaje de viabilidad aparente estuvo débilmente correlacionado con la tasa de fecundación. El porcentaje de viabilidad aparente utilizado tiene en cuenta características morfológicas como la distribución de las gotas de grasa, la forma del huevo y su transparencia. Se consideraron huevos de buena calidad aquellos que tenían una distribución homogénea de las gotas de grasa, sin signos de inicio de coalescencia de las mismas (Figura 7.2). En *Salmo trutta fario*, la distribución homogénea de las gotas de grasa es una característica de huevos de alta calidad (Mansour et al., 2007). En *Salvelinus alpinus* (Mansour et al., 2008) el modelo de distribución de las gotas de grasa también está relacionado con el porcentaje de embriones que llegan al estado de “huevo con ojos”, pero no siempre los huevos con una distribución homogénea de las gotas de grasa presentan porcentajes altos de fecundación o de huevo con ojos. Sin embargo, en ambas especies, cuando las gotas de grasa comienzan a coalescer en uno de los polos la calidad del huevo comienza a decrecer claramente. Ciereszko et al. (2009) consideran que en *Oncorhynchus mykiss* la distribución de las gotas de grasa para la evaluación de la calidad de los huevos se debe tomar con precaución. Los huevos de buena calidad se describen generalmente como transparentes y perfectamente esféricos (Kjørsvik et al., 1990). En la Figura 7.3 se muestran fotografías de huevos “aparentemente viables” y no viables de lenguado senegalés según este criterio. Si bien la opacidad normalmente indica mala calidad, se ha encontrado una gran variabilidad cuando se atiende a la transparencia. En algunas especies como la platija amarilla, la proporción de huevos esféricos, transparentes, flotantes y sin espacio perivitelino es un indicador del éxito en la fecundación y eclosión (Larsson et al., 1997). Sin embargo, en otros casos la sobremaduración reduce las capacidades de desarrollo del huevo sin que se aprecie ningún cambio morfológico (Bromage et al., 1994, Bobe y Labbé 2010). En el caso de los huevos de lenguado senegalés obtenidos mediante inducción hormonal a la ovulación y masaje abdominal, la transparencia, la distribución homogénea de las gotas de grasa y la falta de espacio perivitelino no son buenos indicadores del potencial de ser fecundados, de avanzar en el desarrollo embrionario y de dar lugar a larvas. Además, como se explicó en el Capítulo

5, la viabilidad aparente de los huevos retenidos en la cavidad ovárica de la hembra durante 12 horas prácticamente no varió, mientras que las tasas de fecundación y eclosión decrecieron después de las tres horas. En el lenguado, en vez de calcular el porcentaje de viabilidad aparente, sería mas práctico y útil calcular el porcentaje de huevos claramente sobremaduros (Figura 7.2 B y Figura 7.3 B y C) y, en función de esta tasa, decidir realizar o no realizar la fecundación artificial.



**Figura 7.2.** (A) Huevo de lenguado senegalés con las gotas de grasa distribuidas homogéneamente y “aparentemente” viable. (B) huevo con inicio de coalescencia de las gotas de grasa y “claramente” sobremaduro.



**Figura 7.3.** (A) Huevo de lenguado senegalés transparente sin espacio perivitelino y “aparentemente” viable. (B) Huevo con espacio perivitelino y (C) Huevo opaco “claramente” sobremaduros.

En el lenguado senegalés no se ha encontrado correlación entre el pH del fluido ovárico y las tasas de fecundación y eclosión. El pH del fluido ovárico está relacionado con la calidad de los huevos en rodaballo (Fauvel et al., 1993b), en *Salmo trutta lacustris* (Lahnsteiner et al., 1999), en ciprínidos (Lahnsteiner et al., 2001), en *O.mykiss* (Lahnsteiner, 2000, Aegerter y Jalabert, 2004) y en la trucha alpina *S. alpinus* (Mansour et al., 2008). En otras especies como en el salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) no se ha podido demostrar esa relación (Barnes et al., 2003 citado en Lahnsteiner et al., 2009).

Los huevos pelágicos de buena calidad tienen, a menudo, mejor capacidad para flotar que los de mala calidad y esta característica se ha usado frecuentemente en los criaderos de peces marinos. Sin embargo, hay una serie de especies, como por ejemplo el halibut (Bromage et al., 1994) y el dentón *Dentex dentex* (Giménez et al., 2006), en las cuales no existe correlación demostrada entre la flotabilidad de los huevos y la calidad de estos. En este estudio, las puestas de lenguado senegalés obtenidas mediante masaje abdominal con huevos no flotantes dieron tasas altas de fecundación y eclosión, por lo que no se recomienda la práctica común de desechar los huevos no flotantes.

Las fecundaciones artificiales realizadas con huevos obtenidos según el protocolo aquí establecido (inducción mediante inyección de GnRHa suministrada a las 12 a.m., dosis 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  PC, a 16 °C y masaje abdominal a las 44 horas de la inducción), han dado unas tasas medias de fecundación y eclosión de 36,5% y 19,8% respectivamente. Estas tasas de fecundación y de eclosión conseguidas mediante fecundación artificial son similares a los datos obtenidos con las puestas naturales de reproductores salvajes cuando se refieren al volumen total de huevos producidos en vez de a la fracción flotante (datos no publicados). Por otro lado, estas tasas son las más altas obtenidas hasta ahora y son considerablemente mejores a las obtenidas cuando el masaje abdominal se realizó sin tener en cuenta el tiempo de ovulación (Capítulo 4 de esta tesis).

En conclusión, ninguno de los indicadores estudiados: porcentaje de viabilidad aparente, flotabilidad o pH de líquido ovárico pueden ser utilizados como indicadores de calidad del huevo antes de realizar la fecundación artificial. Por el momento, no es posible predecir la calidad del huevo de una forma rápida y fiable, y el único medio para obtener el máximo número de larvas de lenguado senegalés es determinar con exactitud el momento de la ovulación y realizar el masaje abdominal y la fecundación artificial inmediatamente.

**CAPÍTULO 8. INDUCCIÓN HORMONAL MÚLTIPLE A LA OVULACIÓN:  
RESULTADOS DE PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE HUEVOS**



### 8.1 RESUMEN

Las especies con puestas múltiples como el lenguado senegalés pueden responder a varios tratamientos hormonales consecutivos si el intervalo entre los mismos es el adecuado. Para optimizar el rendimiento del stock reproductor se estudió el número e intervalo de tiempo entre inyecciones hormonales de GnRHa que producen el número máximo de huevos de buena calidad de una misma hembra. Las inyecciones de GnRHa se administraron siguiendo tres pautas de intervalos de tiempo entre ellas: inyecciones en los días (A) 0, 7, 22 y 29; (B) 0, 7, 37 y 44; (C) 0, 15, 30 y 45. En el tratamiento A solo hubo respuesta a las dos primeras inyecciones y en el B y C hubo respuestas a las 4 inyecciones. La mayor fecundidad relativa global se obtuvo con el tratamiento B,  $493 \pm 76 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$ , seguido por el tratamiento C,  $328 \pm 56 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$ , y el tratamiento A,  $216 \pm 32 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$ , habiéndose encontrado diferencias significativas entre los tratamientos A y B. En los tratamientos A y B no hubo diferencias en las tasas de fecundación entre las inyecciones, mientras que en el tratamiento C si hubo diferencias en las tasas de fecundación según el día de administración de la inyección hormonal, pero sin una tendencia en cuanto al número de orden de la inyección. En otro ensayo se trató a otro grupo de hembras con inyecciones los días 0, 7 y 43, y se determinaron las tasas de fecundación y eclosión. Estas tasas, así como la cantidad de huevos, fueron similares en las tres inyecciones. Por lo que, para obtener gran cantidad de huevos de calidad, se pueden administrar dos inyecciones consecutivas separadas 7 días, pero se recomienda un descanso de un mes para obtener una respuesta satisfactoria a la tercera inyección.

### 8.2 INTRODUCCIÓN

La adquisición y el mantenimiento de los reproductores es un coste importante en una empresa de acuicultura, por ello es necesario ajustar el stock de reproductores para que con el menor número de ejemplares se pueda obtener la cantidad necesaria de huevos fecundados

para la producción industrial. En el caso de obtener los huevos mediante inducción hormonal y masaje abdominal, el rendimiento del stock de reproductores vendría determinado por el número de veces que se pueda inducir la ovulación de una misma hembra con buenos resultados en la cantidad y la calidad de los huevos.

El desarrollo del ovario de lenguado senegalés es de tipo asincrónico, como corresponde a especies que realizan puestas múltiples a lo largo de una dilatada época de puesta, y durante la mayor parte del año se encuentran simultáneamente diferentes estadios de desarrollo del ovocito (García-López et al., 2007). En cautividad, el periodo de puestas espontáneas de ejemplares salvajes se prolonga más de 9 meses, con dos picos de puesta, uno principal entre febrero y mayo, en el cual stocks formados por 8 - 15 hembras pueden dar puestas en más del 50% de los días, y un periodo secundario de puesta en el otoño, obteniéndose hasta  $1,65 \times 10^6$  huevos por kg de hembra y año (Anguis y Cañavate 2005). La pérdida de variabilidad genética y la alta proporción de hermanos encontrada en los lenguados nacidos y criados en cautividad (Porta et al., 2006) refleja que solo unas pocas parejas del stock salvaje se reproducen activamente y, en consecuencia, la fecundidad de las hembras que participan en la liberación de huevos podría ser aún mayor. En el caso de reproductores F1, la liberación espontánea de huevos al tanque es siempre menos frecuente y en menor número que en los stocks salvajes, pero el tratamiento con GnRHa ha mejorado la fecundidad (Guzmán et al., 2008 y 2009).

En varias especies con puestas múltiples se han utilizado los implantes de GnRHa para obtener puestas consecutivas en tanque (Berlinsky et al., 1997, Mugnier et al., 2000). Sin embargo, cuando la finalidad es obtener huevos por masaje abdominal, no hay ventajas en el uso de los sistemas de liberación sostenida frente a las inyecciones (Berlinsky et al., 1997). En el lenguado senegalés, como se describió en el Capítulo 4 de esta tesis, el número de huevos por kg de hembra obtenido mediante masaje abdominal fue similar cuando el tratamiento de GnRHa se administró con una única inyección o con un implante. Además, al realizar la inducción hormonal a la ovulación mediante inyecciones semanales, las hembras respondieron a tres inyecciones consecutivas pero no se valoró adecuadamente la calidad de los huevos conseguidos. Se ha sugerido que en las especies de puestas múltiples, los intervalos necesarios entre las primeras ovulaciones inducidas hormonalmente podrían ser

más cortos que en las inducciones subsiguientes (Mylonas et al., 2003) y que la respuesta dependería del intervalo de descanso entre las mismas (Hogendoorn y Vismans, 1980).

El objetivo de este trabajo fue determinar los intervalos de tiempo adecuados entre las inyecciones hormonales que permitan inducir la ovulación de una hembra varias veces para aumentar la producción de huevos sin disminuir la calidad de los mismos. De esta manera, se conseguiría reducir y optimizar el stock de hembras F1 de lenguado senegalés y programar la obtención de huevos en los momentos deseados.

### **8.3 MATERIALES Y MÉTODOS ESPECÍFICOS.**

Se realizaron dos experimentos, uno en las instalaciones del IEO en Santander (Experimento 1) y otro en las instalaciones de una empresa de acuicultura gallega (Experimento 2).

Para el Experimento 1 se seleccionaron 3 grupos de 6 hembras en estado de madurez E III a las que se administraron cuatro inyecciones intramusculares de 25 ug kg<sup>-1</sup> PC de GnRHa siguiendo tres pautas de intervalos de tiempo entre las inyecciones:

- Tratamiento A, dos inyecciones separadas 7 días, descanso de 15 días y otras dos inyecciones separadas 7 días (días 0, 7, 22 y 29).
- Tratamiento B, dos inyecciones separadas 7 días, descanso de 30 días y otras dos inyecciones separadas 7 días (días 0, 7, 37 y 44).
- Tratamiento C, el intervalo entre las cuatro inyecciones fue de 15 días (días 0, 15, 30 y 45).

La temperatura del agua de mar se mantuvo a 16 °C desde el día anterior a la inyección hormonal hasta que se obtuvieron los huevos. Siempre se administraron las inyecciones a las 12 a.m. y los masajes abdominales para extraer los huevos se realizaron 44 h después (8 a.m.). En cada tratamiento se determinó el número de hembras que respondieron a cada inyección, el número de huevos por mL de puesta, la fecundidad relativa parcial (FRP) como el número de

huevos por kg de hembra obtenido tras cada inyección hormonal y la fecundidad relativa global (FRG) como el número de huevos totales por kg de hembra. Para valorar la calidad de los huevos se realizaron fecundaciones artificiales (FA) con distintos “pooles” de espermatozoides criopreservados, tal y como se describió en el Capítulo 3, y se determinó la tasa de fecundación.

Para el Experimento 2 se seleccionaron 10 hembras F1 en estado de madurez E III a las que se inyectó GnRHa en los días 0, 7 y 49. El protocolo de inducción hormonal y de extracción de los huevos mediante masaje abdominal fue el mismo que en el Experimento 1. Se determinó el número de hembras que respondieron a cada inyección, el número de huevos por mL de puesta, la FRP y la FRG; además se determinó el porcentaje de viabilidad aparente de cada puesta. En este caso los huevos obtenidos de la misma hembra en los días 0 y 7 se fecundaron con el mismo “pool” de espermatozoides mientras que los huevos obtenidos en el día 49 se fecundaron con un pool distinto, aunque fue el mismo para todos los lotes de huevos obtenidos de las distintas hembras. El resultado de cada FA se valoró mediante la tasa de fecundación y la posterior tasa de eclosión. Finalmente, se estimó el número de larvas por kg de hembra multiplicando el número de huevos por kg de hembra por la tasa de eclosión.

Los resultados de ambos experimentos se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM). El número de huevos por mL se analizó mediante ANOVA de dos vías (tratamiento y número de inyección). El análisis de los datos de peso, edad, FRG, FRP entre tratamientos, y las tasa de fecundación y de eclosión se realizaron mediante t de Student, ANOVA o los test no paramétricos equivalentes, después de comprobar la normalidad de los datos y homogeneidad de las varianzas con los test de Kolmogorov-Smirnov y de Levene respectivamente. Dentro del mismo tratamiento, la FRP de las sucesivas inyecciones se analizó mediante ANOVA de medidas repetidas. La correlación entre los porcentajes de viabilidad aparente, tasas de fecundación y eclosión se estudiaron mediante el test de Pearson. El nivel de significación fue  $p < 0.05$ .

## 8.4 RESULTADOS

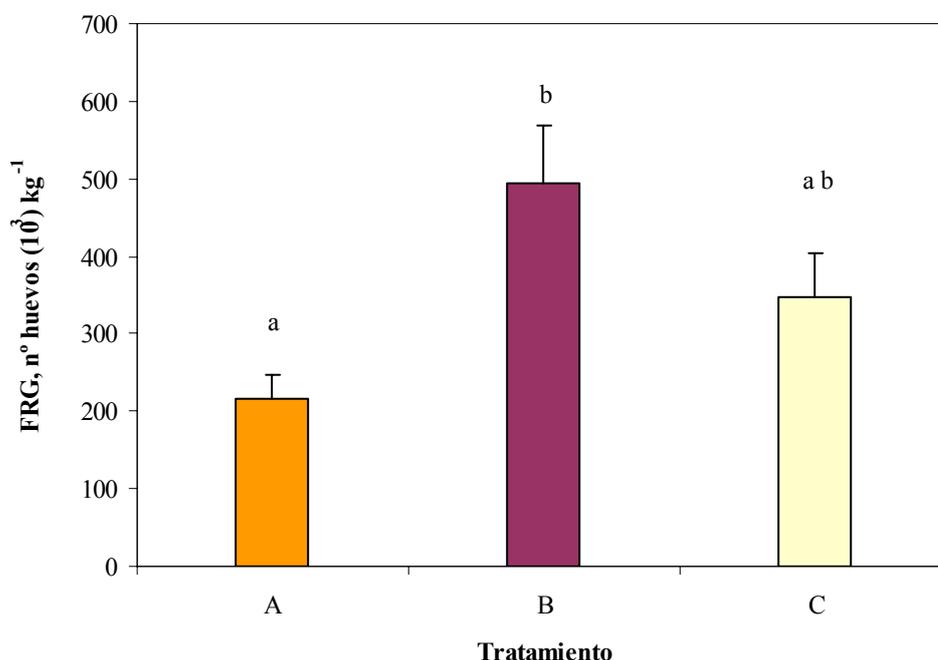
### Experimento 1

El número de hembras, sus pesos y edades y el porcentaje de hembras que respondieron a cada inyección hormonal según el tratamiento aplicado se refleja en la Tabla 8.1. Los pesos y edades de las hembras de los tres grupos fueron similares. El número inicial de hembras de cada tratamiento fue el mismo pero en el C hubo una hembra que no respondió a ninguna de las inyecciones por lo que se excluyó del experimento. A la primera inyección respondieron todas las demás hembras. En los Tratamientos A y C, en los que habían transcurrido 7 y 15 días respectivamente entre la primera y segunda inyección hormonal, hubo una hembra en cada caso que no ovuló tras la segunda inyección, mientras que en el tratamiento B, en el que también habían transcurrido 7 días entre las dos primeras inyecciones ovularon todas las hembras. Cuando después de las dos inyecciones separadas 7 días hubo un descanso de solo 15 días (Tratamiento A), ninguna de las hembras respondió ni a la tercera ni a la cuarta inyección hormonal. Sin embargo, cuando el descanso fue de un mes (Tratamiento B), 5 de las 6 hembras tratadas volvieron a ovular en respuesta a la tercera y cuarta inyección hormonal. En el Tratamiento C, en el que el intervalo de tiempo entre cada inyección fue siempre 15 días, las mismas hembras respondieron a la segunda y tercera inyección, mientras que a la cuarta inyección solo respondieron 3 hembras.

**Tabla 8.1.** Experimento 1. Peso, edad y porcentaje de hembras de lenguado senegalés que respondieron a cada inyección de hormona según el tratamiento. A (inyecciones los días: 0, 7, 22 y 29), B (0, 7, 37 y 44) y C (0, 15, 30 y 45).

Tratamiento	Peso medio (g)	Edad (años)	1ª inyección	2ª inyección	3ª inyección	4ª inyección
A (N=6)	1353±185	6,7±0,4	100%	83%	0%	0%
B (N=6)	1353±123	4,8±1,0	100%	100%	83%	83%
C (N=5)	1672±187	5,0±0,8	100%	80%	80%	60%

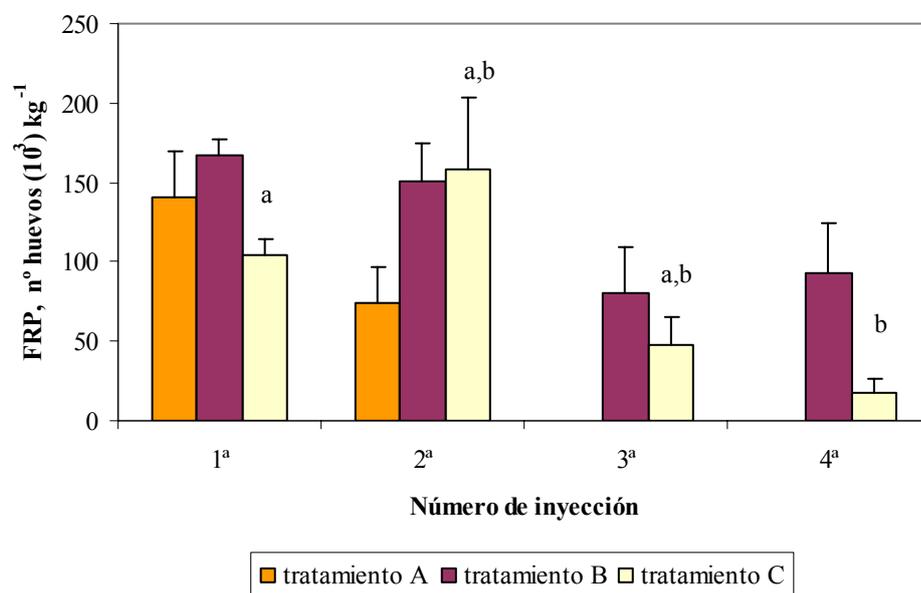
La mayor FRG se obtuvo con el tratamiento B,  $493 \pm 76 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$ , seguido por el tratamiento C,  $328 \pm 56 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$ , y el tratamiento A,  $216 \pm 32 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$ , habiéndose encontrado diferencias significativas entre los tratamientos B y A (Figura 8.1).



**Figura 8.1.** Experimento 1. Fecundidad relativa global (FRG), media  $\pm$  ESM, obtenida en hembras de lenguado senegalés tras 4 inyecciones de GnRH $\alpha$  administradas con diferentes intervalos de tiempo. Tratamientos: A (inyecciones los días: 0, 7, 22 y 29), B (0, 7, 37 y 44) y C (0, 15, 30 y 45).

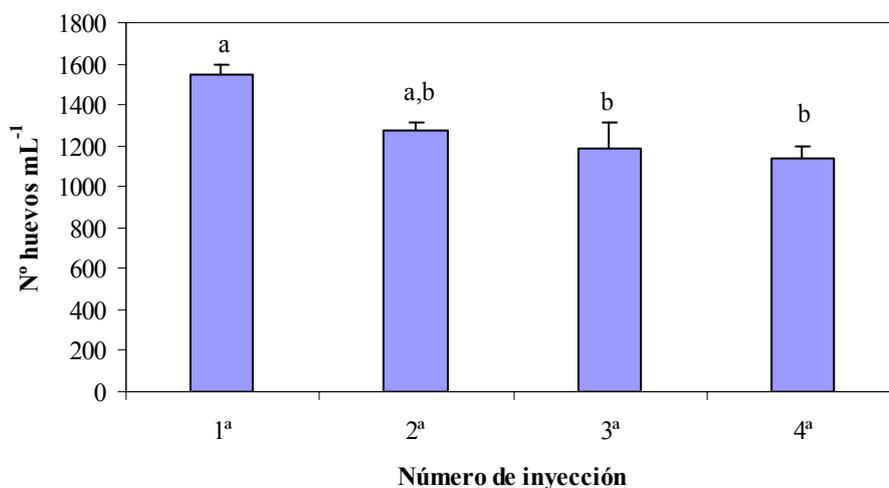
En la Figura 8.2 se muestra la FRP obtenida en respuesta a cada inyección hormonal según el tratamiento. Para el análisis estadístico se consideró que cuando no se obtenían huevos en respuesta a la inyección hormonal, la FRP era cero. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- Entre los tratamientos B y C, en los que hubo respuesta a las 4 inyecciones, se encontraron diferencias en la FRP, de modo que ésta fue significativamente superior en el tratamiento B que en el C,  $123 \pm 12 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$  y  $82 \pm 13 \times 10^3$  huevos  $\text{kg}^{-1}$  respectivamente.
- En el tratamiento A no hubo diferencias en la FRP de las dos primeras inyecciones, en el tratamiento B no hubo diferencias significativas entre las 4 inyecciones mientras que en el tratamiento C existieron diferencias significativas entre la primera y la cuarta inyección (Figura 8.2).
- No se encontraron diferencias significativas en las FRP medias de los tratamientos en cada una de las inyecciones (Figura 8.2).



**Figura 8.2.** Experimento 1. Fecundidad relativa parcial (FRP), media  $\pm$  ESM, obtenida en hembras de lenguado senegalés tras 4 inyecciones de GnRHa administradas con diferentes intervalos de tiempo, según el tratamiento y el número de orden de la inyección hormonal. Tratamientos: A (inyecciones los días: 0, 7, 22 y 29), B (0, 7, 37 y 44) y C (0,15, 30 y 45). Las letras diferentes sobre las barras de error indican las diferencias en FRP en las inyecciones del tratamiento C.

El ANOVA de dos vías (factores: tratamiento y número de orden de la inyección) indicó que el intervalo entre las inyecciones no afectó al número de huevos por mL, sin embargo si se encontraron diferencias significativas según el número de orden de la inyección de modo que, en las puestas obtenidas como resultado de la primera inyección el número de huevos por mL fue significativamente superior al obtenido después de la tercera y cuarta inyección pero similar al de la segunda, como se refleja en la Figura 8.3.



**Figura 8.3.** Experimento 1. Número medio  $\pm$  ESM de huevos por mL de las puestas de lenguado senegalés obtenidas mediante inducción hormonal en función del número de orden de la inyección

La Tabla 8.2 representa las tasas de fecundación medias obtenidas en el Experimento 1. No se encontraron diferencias en estas tasas entre los tres tratamientos. En el tratamiento A y en el B no hubo diferencias significativas entre las sucesivas inyecciones. Las tasas de fecundación de la cuarta inyección del tratamiento B no se han incluido por fallos en el esperma. En el tratamiento C la tasa de fecundación media de los huevos obtenida tras la segunda inyección fue superior a las obtenidas en la primera y tercera pero similar a la cuarta.

**Tabla 8.2.** Experimento 1. Tasas de fecundación medias  $\pm$  ESM de las FAs realizadas con las puestas de lenguado senegalés obtenidas después de cada inyección hormonal según el tratamiento: A (inyecciones los días: 0, 7, 22 y 29), B (0, 7, 37 y 44) y C (0,15, 30 y 45). Las diferentes letras superíndices en las filas indican diferencias significativas.

Tratamiento	Tasa de fecundación			
	1º inyección	2º inyección	3º inyección	4º inyección
<b>A</b>	37,7 $\pm$ 5,3	45,4 $\pm$ 10,2		
<b>B</b>	31,2 $\pm$ 3,8	33,4 $\pm$ 6,3	27,0 $\pm$ 5,4	-
<b>C</b>	22,0 $\pm$ 4,0 <sup>a</sup>	52,4 $\pm$ 5,1 <sup>b</sup>	14,9 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	33,8 $\pm$ 8,1 <sup>ab</sup>

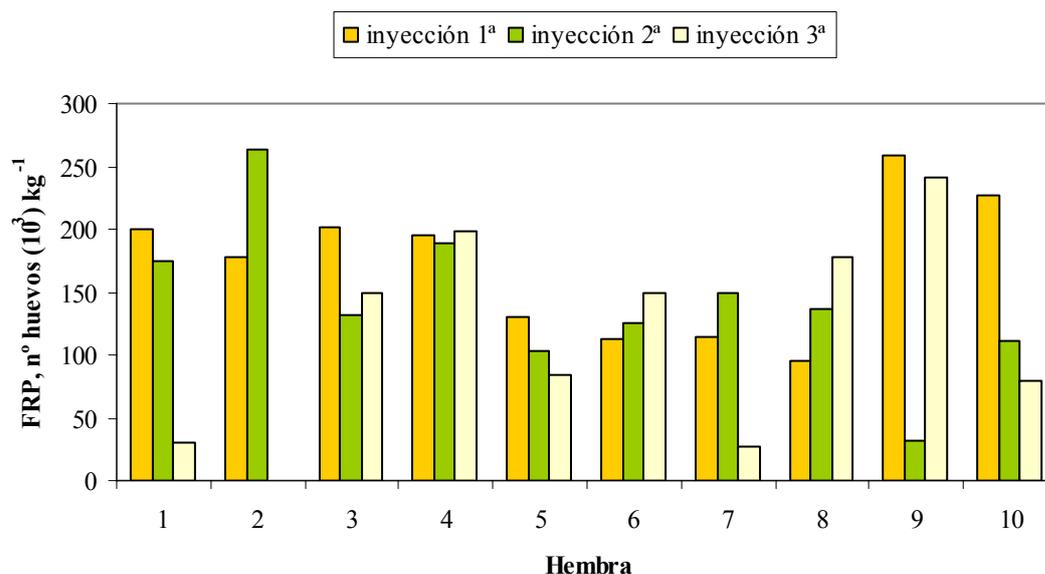
Experimento 2

Las hembras seleccionadas en el Experimento 2 tuvieron un peso medio de  $1737 \pm 72$  g. A las dos primeras inyecciones respondieron todas las hembras (N=10) y en la tercera inyección falló una hembra.

El número medio de huevos por mL de puesta y la FRP disminuyeron de la primera a la tercera inyección pero no se encontraron diferencias significativas (Tabla 8.3). Cada hembra respondió de forma distinta y así en unas hembras las puestas tuvieron mayor número de huevos por mL o mayor FRP en la primera inyección, otras en la segunda y otras en la tercera. Un ejemplo de esta variabilidad se muestra en la Figura 8.4 donde se representa la FRP de cada hembra según el número de orden de la inyección.

**Tabla 8.3.** Experimento 2: Número de huevos por mL, fecundidad relativa parcial (FRP) y número de larvas por kg expresados como medias  $\pm$  ESM según el número de orden de las inyecciones hormonales administradas a hembras de lenguado senegalés los días 0, 7 y 49.

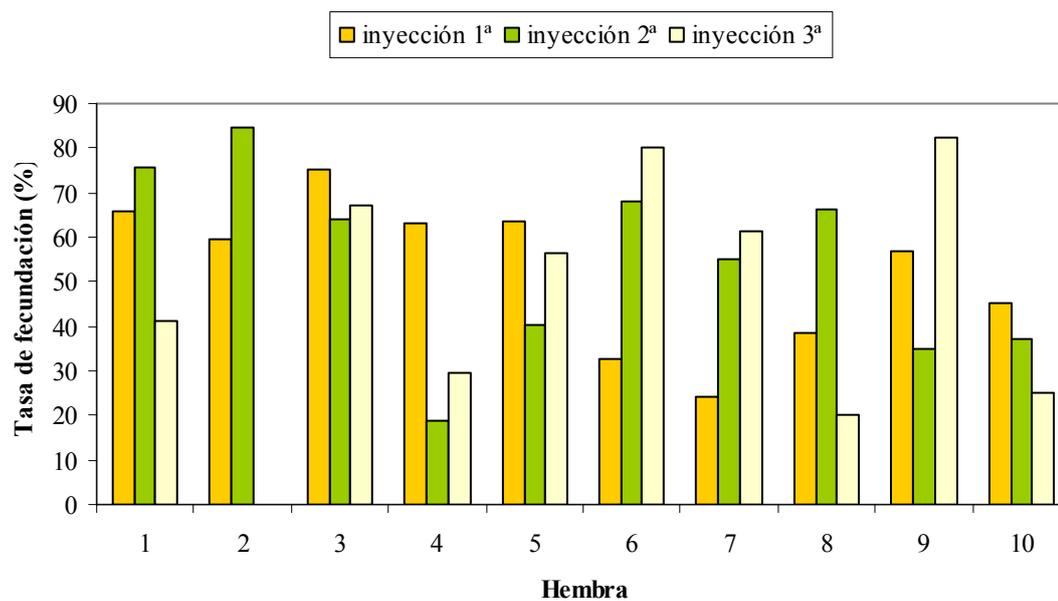
Inyección	Nº huevos mL <sup>-1</sup>	FRP	
		Nº huevos (10 <sup>3</sup> ) Kg <sup>-1</sup>	Nº larvas (10 <sup>3</sup> ) Kg <sup>-1</sup>
1 <sup>a</sup>	1689±72	171±17	60±7
2 <sup>a</sup>	1503±101	142±19	51±6
3 <sup>a</sup>	1482±135	114±26	41±9



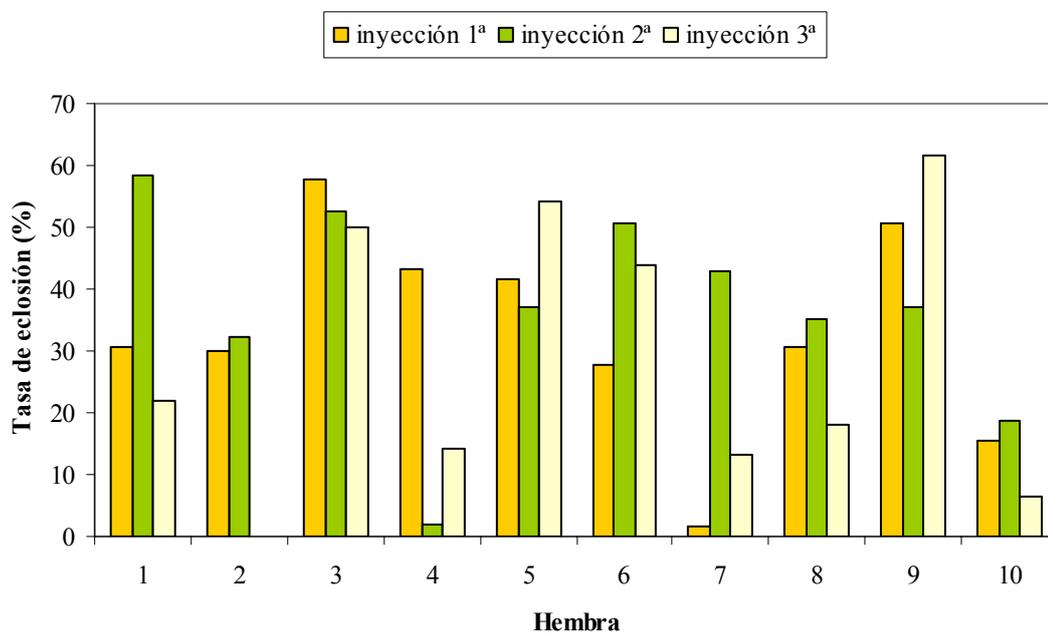
**Figura 8.4.** Experimento 2: Fecundidad relativa parcial (FRP) de las hembras de lenguado senegalés después de las inyecciones hormonales administradas los días 0, 7 y 49.

La calidad de los huevos y del esperma utilizados fueron muy buenos obteniéndose unas tasas de fecundación y eclosión medias de  $52,4 \pm 3,1\%$  y  $32,9 \pm 3,2\%$  respectivamente en la primera inyección,  $55,0 \pm 4,0\%$  y  $36,7 \pm 3,4\%$  en la segunda y  $51,5 \pm 4,5\%$  y  $30,6 \pm 4,1\%$  en la última. En este Experimento se alcanzaron valores máximos de fecundación y eclosión de  $84,6\%$  y  $61,6\%$  respectivamente. Aunque las tasas medias de fecundación y de eclosión son superiores en las FAs realizadas con los huevos obtenidos en las segundas inyecciones no se encontraron diferencias significativas entre la primera y segunda inyección en las que se utilizó el mismo pool de esperma para cada hembra, ni entre éstas y la tercera inyección donde se utilizó un pool de esperma diferente. El número de larvas por kg de hembra (calculado como número de huevos por kg de hembra x tasa de eclosión) fue similar entre las tres inyecciones (Tabla 8.3).

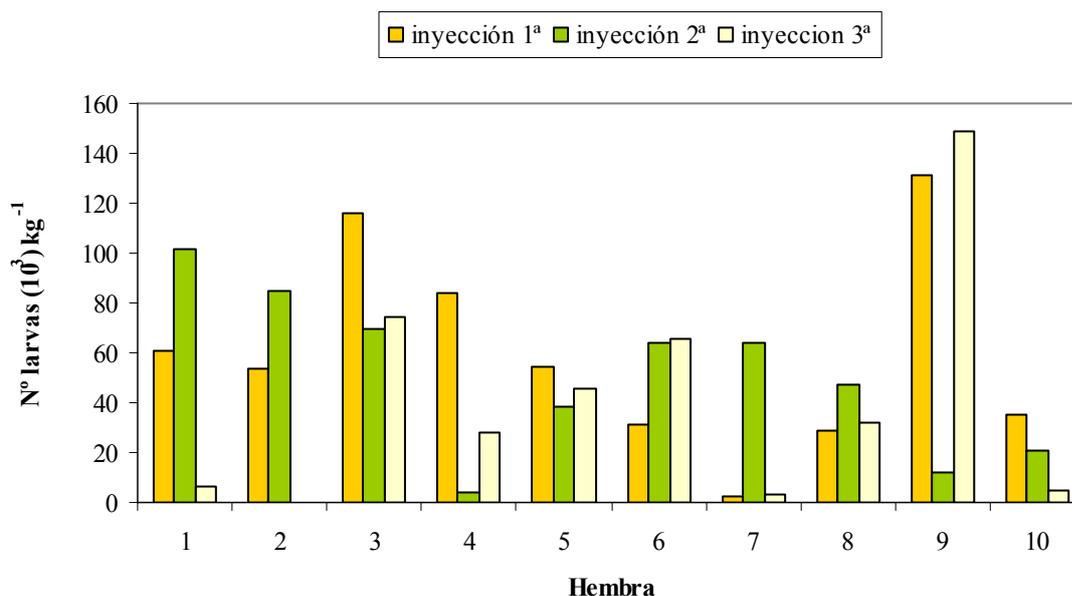
Los valores máximos de las tasas de fecundación y eclosión y del número de larvas por kg de hembra variaron entre las tres inducciones en las distintas hembras, como se puede ver en las Figuras 8.5, 8.6 y 8.7.



**Figura 8.5.** Experimento 2: Tasas de fecundación de las puestas de las hembras de lenguado senegalés después de las inyecciones hormonales administradas los días 0, 7 y 49.



**Figura 8.6.** Experimento 2: Tasa de eclosión de las puestas de las hembras de lenguado senegalés después de las inyecciones hormonales administradas los días 0, 7 y 49.



**Figura 8.7.** Experimento 2: Producción de larvas por kg de hembra de lenguado senegalés después de las inyecciones hormonales administradas los días 0, 7 y 49.

El número medio global de larvas por kg de hembra después de las tres inyecciones hormonales fue  $151 \pm 24 \times 10^3$ . En la Tabla 8.4 figura el número total de larvas que se hubieran podido obtener de cada una de las hembras utilizadas en el Experimento 2 ordenadas de la menos a la más productiva.

**Tabla 8.4.** Experimento 2: Número total de larvas por Kg de hembra después de tres inducciones hormonales administradas los días 0, 7 y 49.

Hembra	Nº larvas totales ( $10^3$ ) $\text{kg}^{-1}$
10	61
7	70
8	109
4	116
5	138
2	138
6	160
1	170
3	260
9	292

No hubo diferencias significativas en los porcentajes de viabilidad aparente entre las tres inducciones y no se encontró correlación entre este porcentaje y las tasas de fecundación y de eclosión. Sin embargo las tasas de fecundación y eclosión si estuvieron significativamente correlacionadas (Tabla 8.5).

**Tabla 8.5.** Experimento 2: Índice de Correlación de Pearson entre la viabilidad aparente y las tasas de fecundación y eclosión cuando se administraron las inyecciones hormonales a las hembras de lenguado senegalés los días 0,7 y 49.

		Tasa de fecundación	Tasa de eclosión
<b>Viabilidad aparente %</b>	<b>Correlación de Pearson</b>	<b>0,233</b>	<b>0,319</b>
	<b>Sig. (Bilateral)</b>	<b>0,224</b>	<b>0,092</b>
	<b>N</b>	<b>29</b>	<b>29</b>
<b>Tasa de fecundación</b>	<b>Correlación de Pearson</b>		<b>0,758**</b>
	<b>Sig. (Bilateral)</b>		<b>0,000</b>
	<b>N</b>		<b>29</b>

Es importante destacar que para obtener respuesta en la primera inducción fue necesario detectar un nivel alto de abultamiento del abdomen que indicaba el estado de madurez E III, pero en las inducciones sucesivas, tanto en el Experimento 1 como en el Experimento 2, las hembras presentaron un nivel de abultamiento del abdomen menor, que se correspondía con estados E II e incluso E I.

## 8.5 DISCUSIÓN

En este trabajo, los resultados permiten afirmar que los intervalos de descanso entre los tratamientos hormonales han influido en la producción de huevos. En hembras F1 de lenguado senegalés, las dos primeras inyecciones de GnRHa con un intervalo de descanso de 7 días produjeron gran cantidad de huevos de buena calidad. En este caso se necesitó al menos un mes de descanso para que hubiera respuesta a la tercera inyección, mientras que cuando el

intervalo de descanso entre la primera y la segunda fue de 15 días, la tercera puesta inducida se obtuvo a los 15 días de la segunda. Los resultados de este trabajo sugieren que se podría realizar una cuarta inducción hormonal a los 7 o 15 días de haber obtenido una tercera puesta con buenos resultados en la cantidad de huevos, como indica el tratamiento B, y en la calidad, como indica el tratamiento C, aunque sería necesario confirmar estos resultados.

El lenguado senegalés es una especie capaz de realizar múltiples puestas durante un largo periodo de tiempo. Así, Rodríguez (1984) describió un modelo de puesta asincrónico para *S. senegalensis* en el medio natural, donde los ovocitos se reclutan, maduran y ponen constantemente a lo largo del periodo reproductivo. Los reproductores salvajes de lenguado senegalés en cautividad han liberado huevos al tanque durante más de 9 meses al año y en el periodo principal de puesta que ocurre en primavera, en dos stocks formados por 8 y 15 hembras, hubo puestas en más del 50% de los días (Anguis y Cañavate, 2005, García-López et al., 2006a). Los reproductores salvajes en cautividad pueden llegar a producir  $1,65 \times 10^6$  huevos al año por kg de hembra, pero teniendo en cuenta que sólo una pequeña parte de los ejemplares participan activamente en la reproducción (Anguis y Cañavate, 2005, Porta et al., 2006), esta fecundidad puede ser mucho mayor. La fecundidad de los ejemplares F1 obtenida con las puestas en tanque es mucho menor que en los salvajes, del orden de  $0,13 \times 10^6$  huevos  $\text{kg}^{-1}$  (Guzmán et al., 2008).

En varias especies como en la lubina, (Mylonas et al., 2003), en *Lates calcarifer*, (Almendras et al., 1988, García, 1989), en el misgurno de Asia *Misgurnus anguillicaudatus* (Suzuki, 1983), en el verrugato fusco *Umbrina cirrosa* (Mylonas et al., 2004), en el sábalo americano *Alosa sapidissima* (Mylonas et al., 1995) y en *Morone chrysops* (Mylonas et al., 1997) se han usado tratamientos hormonales mediante inyecciones consecutivas o implantes para obtener varias puestas sucesivas en tanque. Sin embargo, en el caso del lenguado senegalés, estos tratamientos, aunque aumentaron la fecundidad no produjeron puestas fecundadas (Agulleiro et al., 2006, Guzmán et al., 2009). En otras especies se han utilizado los implantes y el posterior masaje abdominal para obtener puestas sucesivas como en la platija amarilla (Larsson et al., 1997), en el falso halibut de Canadá (Berlinsky et al., 1997), en el trompetero australiano (Morehead et al., 1998), en el rodaballo (Mugnier et al., 2000) y en el mero moreno (Marino et al., 2003). En el lenguado senegalés el uso de implantes, cuando la

finalidad fué obtener huevos por masaje abdominal para la fecundación artificial, no supuso ninguna ventaja frente al uso de inyecciones. Sin embargo, mediante inyecciones sucesivas y masaje abdominal se obtuvieron puestas consecutivas (Capítulo 4), como también se ha citado en el falso halibut de Canadá (Berlinsky et al., 1997), en el pez-gato, *Clarias lazera* (Hogendoorn y Vismans, 1980) y en el verrugato fusco (Mylonas et al., 2004).

En esta experiencia, el intervalo de descanso entre las inyecciones hormonales ha sido importante en la respuesta de las hembras al tratamiento hormonal; si bien entre las dos primeras inyecciones un descanso de 7 días fue suficiente para obtener puestas, para obtener huevos en la tercera inyección ha sido necesario un intervalo de tiempo mayor. En *C. lazera* cuando la hipofisación se realizó 4 veces con intervalos de 1, 2 ó 3 semanas, se obtuvieron puestas en respuesta a las 4 inyecciones independientemente del intervalo de descanso, pero el número de huevos por kg de hembra fue significativamente mayor en el primer tratamiento (Hogendoorn y Vismans, 1980). En el verrugato fusco cuando se administraron tres inyecciones de GnRH $\alpha$  separadas 10 días las hembras no respondieron a la segunda y tercera inyección pero si lo hicieron cuando se separaron 20 días (Mylonas et al., 2004). En la mayoría de las hembras de lenguado senegalés las dos primeras ovulaciones podrían tener lugar en un periodo de tiempo más corto que en la tercera y cuarta ovulación como ha sugerido Mylonas et al. (2003) en lubina. Las biopsias ováricas tomadas durante el periodo de puesta en hembras F1 de lenguado senegalés demostraron que, en el estado de desarrollo gonadal E III, más del 60% de los ovocitos estaban en el estado final de la vitelogénesis (diámetro 325 - 569  $\mu\text{m}$ ) además de existir ovogonias (diámetro 8 - 12  $\mu\text{m}$ ) y ovocitos primarios (diámetro 12 - 23  $\mu\text{m}$ ), indicando la continua disponibilidad de células germinales para el reclutamiento (García-López et al., 2007, Guzmán et al., 2009). La gran proporción de ovocitos en estado vitelogénico final que aparecen en el estado de desarrollo gonadal EIII podrían ser suficientes para producir dos puestas consecutivas en un intervalo de tiempo corto, pero para las sucesivas puestas podría ser necesario un intervalo de tiempo mayor que permitiera el avance del proceso de maduración de nuevos lotes de ovocitos. En lenguado senegalés no se conoce cual es el intervalo natural entre ovulaciones ya que la información publicada se refiere siempre a grupos de hembras, pero en la Planta de Cultivos del IEO se dispone de datos que demuestran que no existe un intervalo fijo entre las puestas de una hembra; por ejemplo una hembra salvaje en el año de máxima fecundidad desovó 63 veces

con unos intervalos interpuestas que variaron entre 1 y 34 días, con una media de 3,7 días (datos no publicados).

En el Capítulo 4 de esta tesis, el 83% de las hembras tratadas con inyecciones separadas con intervalos de 7 días produjeron puestas después de la tercera inyección, indicando que en algunas hembras, el intervalo necesario para una tercera respuesta podría ser más corto; sin embargo solo el 33% de las hembras respondieron a la cuarta inyección, frente al 83% y el 60% obtenidos en los tratamientos B y C respectivamente, en los que los intervalos entre la segunda y tercera inyección han sido mayores. La temperatura también ha podido ser la causa de esta diferencia ya que en el experimento del Capítulo 4, los tratamientos hormonales se administraron tanto a 16 °C como a 18 °C, y como se vió en el Capítulo 5, el porcentaje de hembras que respondieron al tratamiento hormonal fue mayor a mayor temperatura.

En algunas especies se ha visto que el número de huevos por kg de hembra es superior en las primeras puestas obtenidas por tratamiento hormonal y luego decrece, así en *L. calcarifer* tratada con implante de GnRHa el número de huevos por kg de hembra era superior en la primera puesta y declinó después en la segunda, tercera y cuarta puestas (García, 1989). Esta misma especie, tratada con varias inyecciones separadas 24 horas, produjo de 1 a 4 puestas siendo el número de huevos por kg de las dos primeras puestas superior a las siguientes (Almendras et al., 1998). En lubina, el número de huevos también era mayor en las primeras puestas que en las subsiguientes (Mylonas et al., 2003). En lenguado senegalés, aunque la FRP media decreció a medida que se sucedieron las inyecciones de GnRHa, solo se encontraron diferencias significativas en el número de huevos por kg de hembra entre la primera y cuarta inyección cuando los intervalos entre las cuatro inyecciones fueron de 15 días (Figura 8.2). Parece que con un intervalo de descanso de un mes o más entre la segunda y tercera inyección, el número medio de huevos por kg de hembra no se reduce significativamente, y según la hembra se obtendrán más huevos en la primera, segunda o tercera inyección como se ve en la Figura 8.4.

El mayor número de huevos por mL obtenido en la primera inyección del experimento 1 frente a la tercera y cuarta inyecciones se debe a que, en las primeras puestas, generalmente

los huevos se obtienen muy compactados, con muy poco líquido ovárico, mientras que en las sucesivas puestas se obtuvo mayor cantidad de líquido ovárico.

La calidad de los huevos obtenidos en las sucesivas inyecciones no ha estado afectada por el número de orden de la inyección hormonal pudiéndose obtener tasas de fecundación y eclosión similares en cualquiera de las inyecciones, en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores (Hogendoorn y Vismans 1980, Morehead et al., 1998, Mylonas et al., 2003). Probablemente, las variaciones observadas en las tasas de fecundación y eclosión se deban a que el tiempo transcurrido entre la inyección hormonal y la ovulación, es decir, el tiempo de ovulación, no es el mismo en todas las hembras, ni en la misma hembra en momentos distintos del periodo de puesta. El periodo de 44 horas postratamiento corresponde a la ventana de tiempo en que la mayoría de las hembras mantienen la máxima calidad de los huevos, pero no se puede descartar que en algunos casos la calidad ya haya empezado a declinar como se vió en el Capítulo 5.

En este estudio se ha observado una gran variabilidad en las FRP y en las tasas de fecundación y eclosión entre las hembras (Figuras 8.4, 8.5 y 8.6) sin ninguna tendencia respecto al número de orden de la inyección hormonal. Esta variabilidad también se ha encontrado en otras especies como en la lubina (Mylonas et al., 2003) y en *L. calcarifer* (Almendras et al., 1988). También se observa una gran variabilidad en el número de larvas por kg de hembra que se obtiene según la hembra.

En conclusión, los resultados de este trabajo demuestran que en lenguado senegalés es posible inducir varias ovulaciones mediante inyecciones consecutivas de GnRHa y obtener gran cantidad de huevos de buena calidad. Es posible administrar dos inyecciones consecutivas separadas solo 7 días pero para la tercera inyección se recomienda un descanso de un mes. Esta información será de gran utilidad para los criaderos de lenguado, y permitirá ajustar el stock de hembras y la programación más conveniente de las inducciones hormonales.



**CAPÍTULO 9: LARVAS, JUVENILES Y REPRODUCTORES F2**



## 9.1 RESUMEN

Para validar el método de obtención de lenguado senegalés de segunda generación o F2 mediante inducción hormonal a la ovulación de los ejemplares F1 y posterior fecundación artificial de los huevos se realizó el cultivo larvario, el engorde hasta el tamaño comercial y hasta el tamaño reproductor de ejemplares F2. Los resultados indican que tanto el crecimiento de las larvas como de los juveniles es similar al de los ejemplares F1, y que los reproductores F2 presentan problemas reproductivos similares a los F1.

## 9.2 INTRODUCCIÓN

Las terapias hormonales utilizadas para inducir la ovulación pueden afectar a la calidad de los huevos y las larvas. La inducción hormonal a la ovulación modifica la cantidad de ARNm de algunos genes del huevo pero se desconoce como puede influir en el desarrollo embrionario posterior (Bonnet et al., 2007a). En general, las terapias hormonales solo son recomendables cuando la especie no se puede reproducir en cautividad con normalidad o cuando por motivos de gestión, como por ejemplo la sincronización de las puestas, obtención de híbridos interespecíficos o mejora genética, se puede aceptar una pequeña pérdida de calidad respecto a las puestas espontáneas. En rodaballo las tasas de fecundación de los huevos obtenidos por masaje abdominal cuando la ovulación se indujo mediante GnRHa fueron inferiores a las obtenidas sin el tratamiento hormonal, pero las tasas de eclosión fueron similares y se consiguió sincronizar las puestas (Mugnier et al., 2000). Según Mylonas et al. (2010) si el tratamiento hormonal es el adecuado, no suele tener un efecto negativo en la calidad de los huevos. Además, si se determina el tiempo de ovulación y la fecundación artificial se realiza inmediatamente después de obtener los huevos por masaje abdominal, los resultados pueden ser muy satisfactorios.

El lenguado senegalés de cultivo F1 no produce huevos fecundados de manera espontánea y aunque actualmente se realizan numerosas investigaciones encaminadas a comprender las

causas de esta disfunción reproductiva y a aportar soluciones, por el momento no existe ninguna vía para obtener ejemplares F2 aparte de la inducción hormonal a la ovulación y la fecundación artificial, tema de esta tesis. En los capítulos anteriores, la calidad de las puestas obtenidas se ha determinado en términos de cantidad de huevos y tasas de fecundación y de eclosión, sin analizar el desarrollo posterior de las larvas. Para evaluar el potencial de estas técnicas más allá de la eclosión larvaria se ha realizado un ensayo preliminar del cultivo larvario, el engorde de juveniles hasta el tamaño comercial y hasta el tamaño reproductor, de puestas F2 obtenidas mediante inducción hormonal a la ovulación y fecundación artificial, y se han comparado estos resultados con los obtenidos en las generaciones F1.

### **9.3 MATERIALES Y MÉTODOS ESPECÍFICOS**

#### **Cultivo larvario y postlarvario**

A principios de marzo de 2011 se indujo la ovulación de dos hembras F1 (A y B) mediante el protocolo estándar establecido en el Capítulo 7: inyección intramuscular de 25  $\mu\text{g}$  de GnRH $\alpha$  Kg $^{-1}$  PC a las 12 a.m. a hembras en estado E III de maduración gonadal, temperatura del agua a 16 °C y primer masaje abdominal para extraer los huevos 44 horas después del tratamiento (08:00 a.m.). Los huevos obtenidos de la hembra A fueron fecundados con espermatozoides frescos de machos F1, conseguido 1 hora antes de realizar el masaje abdominal a las hembras y mantenido a 4 °C hasta su uso en la FA. Para los huevos de la hembra B además de espermatozoides frescos se utilizó espermatozoides de machos F1 crioconservados en septiembre de 2008 y junio de 2010 (Tabla 9.1). Pasada una hora y media de las FA se determinaron las tasas de fecundación y los huevos de cada hembra se incubaron por separado en dos tanques de 70 L de capacidad, con renovación de agua de mar filtrada a 1  $\mu\text{m}$  y temperatura de 17,8 °C. La cantidad de larvas obtenidas se estimó a los dos días, después de observar que no existían huevos viables sin eclosionar, mediante el conteo del número de larvas en 3 muestras de 100 mL, se calculó la media y se multiplicó por el volumen del incubador. La tasa de eclosión se determinó como número de larvas por 100 y dividido por el número de huevos incubados.

El cultivo de las larvas descendientes de cada hembra se realizó según el protocolo desarrollado por el IEO de Santander, a partir del utilizado en el IFAPA El Toruño (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999) y modificado durante un convenio de colaboración entre el IEO y la empresa de acuicultura Tinamenor S. L. Básicamente, desde el día siguiente a la eclosión y mientras que las larvas fueron pelágicas el cultivo se realizó en tanques circulares de 250 l de capacidad y, cuando las larvas pasaron a ser bentónicas, se transfirieron a tanques cuadrados de 4 m<sup>2</sup>. El agua de mar se filtró por 1 µm y se esterilizó mediante radiación ultravioleta, la temperatura se registró dos veces al día y se mantuvo entre 18,5 °C y 20,5 °C, y el oxígeno al 85% - 100% de saturación. La alimentación fue:

- A día 3 después de eclosión se suministró rotífero (*Brachionus plicatilis*) y fitoplancton (*Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis galvana*).
- A día 7, nauplius de Artemia y pienso de tamaño de partícula de 150 µm.
- A día 9 se retiró el rotífero y el fitoplancton y se fue aumentando la cantidad de Artemia y la cantidad y tamaño de partícula del pienso.
- A día 60 se inició el destete retirando paulatinamente la Artemia.
- A partir del día 80 se suministró solo pienso.

Trece días después de obtener estos huevos fecundados F2 e iniciado su cultivo larvario, se obtuvo una puesta natural de ejemplares salvajes y las larvas F1 se cultivaron del mismo modo que las larvas F2.

Semanalmente se tomaron muestras de larvas para determinar el crecimiento en peso. Para ello se tomaron dos grupos de 10 larvas de cada uno de los dos lotes F2 (F2A y F2B) y del lote F1, que se aclararon con agua destilada, se filtraron mediante equipo Millepore sobre filtro de fibra de vidrio de 1,2 µm y desecaron a 60 °C durante 24 horas; el peso seco (mg) se determinó con una microbalanza Mettler MT5. A partir del día 35 después de la eclosión y hasta el día 68, se determinó el peso húmedo individual de 10 a 25 larvas después de eliminar el exceso de agua con papel de filtro. Posteriormente se continuó calculando el peso húmedo medio de grupos de larvas, para ello, en distintas partes del tanque, con un redeño pequeño se tomaron 5 lotes de aproximadamente 25 ejemplares cada uno, se pesaban después de escurrir

el exceso de agua y se contaba el número exacto de ejemplares. En los días 1, 21, 35, 42, 47, 54 y 61 después de la eclosión se determinó la longitud mediante un proyector de perfiles Nikon V-12B. Se calculó el factor de condición ( $K = \text{Peso húmedo} \times 100 / \text{Longitud}^3$ ) y el coeficiente de variación de la talla y el peso ( $CV = \text{desviación estándar de la media} \times 100 / \text{media}$ ). También se calcularon las tasas de crecimiento específico ( $SGR = (\text{Ln } P_2 - \text{Ln } P_1) \times 100 / (t_2 - t_1)$ ), donde  $P_2$  y  $P_1$  son los pesos en los días  $t_2$  y  $t_1$ ). Al finalizar el experimento, a día 90 después de la eclosión, se determinaron los porcentajes de supervivencia y de malformaciones.

Los datos de peso se expresaron como media  $\pm$  ESM. Las longitudes iniciales de las larvas y los pesos finales se compararon mediante ANOVA, después de comprobar la normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas mediante el Test de Kolmogorov-Smirnov y el estadístico de Levene, respectivamente. Para comparar las tasas de crecimiento de los tres grupos de larvas (2 grupos F2 y 1 grupo F1), los datos de peso seco y peso húmedo, en los diferentes días de cultivo se ajustaron a ecuaciones exponenciales:  $P_t = P_0 e^{gt}$  donde  $P$  es el peso y  $g$  la tasa de crecimiento. Estas expresiones se convirtieron mediante logaritmos en ecuaciones lineales y se compararon mediante el análisis de T-Student de comparación de pendientes (Zar, 1984). El nivel de significación fue de  $p < 0,05$ .

### **Engorde**

Los juveniles procedían de una puesta obtenida por masaje abdominal de una hembra F1 tratada con un implante de GnRHa (dosis  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), que se fecundó artificialmente con esperma crioconservado de machos F1, en el mes de mayo de 2007. Se estabularon 95 juveniles F2 de 12 meses de edad con pesos y tallas medios de  $125,6 \pm 4,3 \text{ g}$  y  $19,3 \pm 0,2 \text{ cm}$ , en un tanque de  $2,3 \text{ m}^2$  de superficie y  $0,7 \text{ m}$  de altura de agua, con circuito abierto de agua y con la temperatura y la salinidad ambiente ( $11,2 \text{ }^\circ\text{C}$  -  $21,7 \text{ }^\circ\text{C}$  y 35 respectivamente). Se alimentaron “ad libitum” 6 días a la semana con piensos comerciales de diferente gránulo según el tamaño de los peces (Elite, Skretting). Todos los ejemplares se muestrearon cada tres meses para determinar la talla y el peso y detectar el inicio de la madurez sexual. A los 21 meses de edad, cuando la biomasa de los juveniles en el tanque alcanzó  $20 \text{ kg m}^{-2}$ , los peces se desdoblaron a otro tanque similar. El periodo de engorde se consideró finalizado cuando el peso medio de los ejemplares superó los 700 g. Con los datos de los muestreos se calcularon las tasas de crecimiento específico (SGR) para cada intervalo de muestreo y para todo el

periodo de engorde, el factor de condición (K) y los coeficientes de variación (CV) de la talla y el peso. Los resultados se compararon con los datos encontrados en la bibliografía.

Finalizado el periodo de engorde se seleccionaron 35 ejemplares como futuros reproductores y se estabularon en un tanque de 7 m<sup>2</sup> de superficie y 1 m de altura (carga 4,4 kg m<sup>-2</sup>) mientras que el resto de los ejemplares se mantuvieron en los dos tanques en los que se había realizado el engorde. El alimento utilizado fue pienso de reproductores (Vitalis Cal, Skretting) “ad libitum”, 6 días a la semana y la temperatura fue la natural de la zona. Se continuaron realizando muestreos periódicos de talla, peso y determinación del sexo.

### **Reproducción**

El sexo de todos los ejemplares estabulados en el tanque de 7 m<sup>2</sup> de superficie se pudo identificar claramente en Julio de 2010 cuando el peso medio del stock era de 885 ± 29 g y finalmente el stock de ejemplares reproductores F2 se constituyó en enero de 2011 con 12 machos de 978 ± 43 g y 17 hembras de 1326 ± 43 g. Todos los ejemplares se identificaron mediante marcas electrónicas. El tanque de reproductores estaba provisto de un circuito abierto de agua y con las condiciones de fotoperiodo e intensidad luminosa descritas en el Capítulo 3. Se alimentaron con pienso de reproductores (Vitalis Cal, Skretting), “ad libitum”, durante 6 días a la semana. La maduración gonadal se indujo mediante manipulación del termoperiodo siguiendo el mismo protocolo utilizado con los demás stocks de reproductores salvajes y F1 de lenguado senegalés de la Planta de Cultivos El Bocal. Así, a finales del mes de enero de 2011, cuando la temperatura del agua de mar era aproximadamente de 13 °C, se comenzó a subir 0,5 °C a la semana y a partir de los 16 °C, cada tres y cuatro días se subió y bajo dos grados respectivamente. En el mes de febrero se colocó una malla en la salida del agua del tanque para recoger las puestas. Se determinó la duración del periodo de puesta, el número de puestas, el número total de huevos y el número de huevos por puesta, la fecundidad relativa diaria, el porcentaje de huevos flotantes y no flotantes y las tasas de fecundación y eclosión.

## 9.4 RESULTADOS

### Cultivo larvario y postlarvario

La Tabla 9.1 refleja el peso y la edad de las dos hembras F1 tratadas hormonalmente (hembras A y B), la cantidad de huevos obtenidos de cada hembra calculado como el volumen de huevos x 1490 (número medio de huevos por mL de puesta obtenida por masaje abdominal, Capítulo 4), el porcentaje de viabilidad aparente y la flotabilidad definidos en los Capítulo 3 y 7, la cantidad y movilidad del esperma utilizado en la FA y las tasas de fecundación y eclosión. También recoge los siguientes datos de la puesta natural obtenida con reproductores salvajes: peso de los ejemplares que participaron en la puesta, la cantidad de huevos, obtenida al multiplicar el volumen de huevos recogido en una malla situada a la salida del tanque de reproductores salvajes por 1080 (número medio de huevos por mL de puesta natural, Anguis y Cañavate, 2005), la flotabilidad a 35 de salinidad y las tasas de fecundación y eclosión. Para poder comparar las tasas de fecundación y eclosión obtenidas en las FAs con las tasas de fecundación y eclosión de la puesta natural, estas últimas se refirieron al total de huevos recogidos a la salida del tanque de puesta, es decir a la suma del número de huevos flotantes y de no flotantes. Entre las dos hembras F1 se obtuvieron  $79 \times 10^3$  larvas y con la puesta natural  $83 \times 10^3$  larvas.

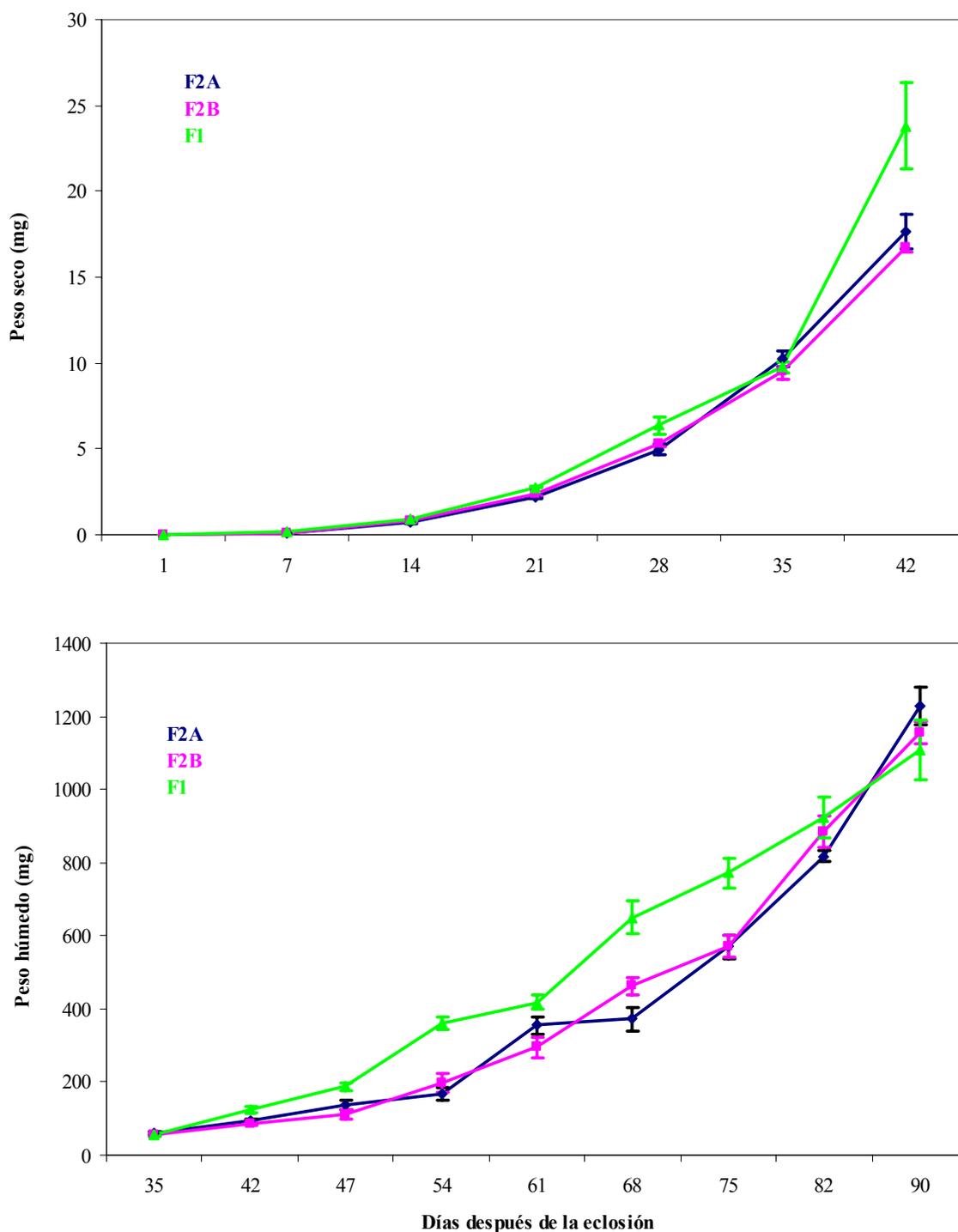
El esperma fresco utilizado en la FA provenía de 17 machos de peso medio  $1101 \pm 67$  g mientras que el esperma criopreservado procedía de 6 machos de peso medio  $1444 \pm 76$  g.

**Tabla 9.1.** El peso y la edad de las hembras F1 tratadas hormonalmente para inducir la ovulación, el número de huevos obtenido por masaje abdominal, la viabilidad aparente (%), la flotabilidad (%), la cantidad y movilidad del esperma utilizado en la FA, las tasas de fecundación y eclosión y el número de larvas obtenidas. Los pesos de los reproductores salvajes que participaron en la puesta natural, el número de huevos, la flotabilidad, las tasas de fecundación y eclosión y el número de larvas obtenidas.

	HEMBRA A	HEMBRA B	REPRODUCTORES SALVAJES
Peso (g)	1590	1056	♀=2096; ♂=1354
Edad (años)	6	7	
Nº huevos (10 <sup>3</sup> )	223,5	220,5	172,8
Viabilidad (%)	47,6	100	
Flotabilidad (%)	n.d	n.d	62,5
µl esperma fresco	260	290	
µl esperma crío	0	374	
Movilidad esperma fresco	1,6	2	
Tasa de fecundación (%)	16	18,6	57,7*
Tasa de eclosión (%)	20,7	15,1	47,8*
Nº larvas (10 <sup>3</sup> )	46	33	83

\*Estas tasas se calcularon sobre el total de huevos (fracción flotante + fracción no flotante) recogidos en la salida del tanque

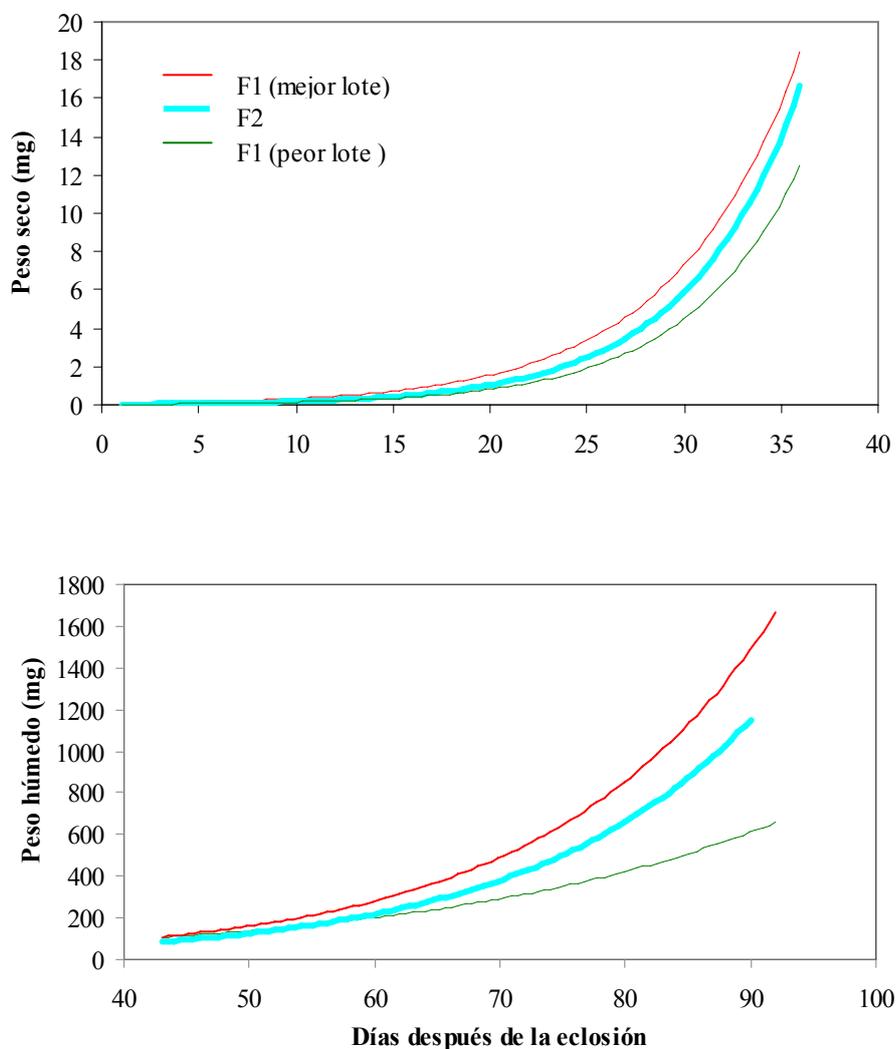
La temperatura media  $\pm$  ESM durante el cultivo larvario fue  $18,7 \pm 0,0$  °C. A día 1 después de la eclosión la longitud media de las larvas de los grupos F2B y F1 fueron  $2,89 \pm 0,02$  mm y  $3,18 \pm 0,02$  mm respectivamente, siendo significativamente diferentes. Al finalizar el cultivo larvario, 90 días después de la eclosión, los pesos húmedos medios de las postlarvas descendientes de la hembra A, de la hembra B y de la puesta natural fueron  $1226,6 \pm 51,2$  mg,  $1154,4 \pm 29,9$  mg y  $1107,8 \pm 79,9$  mg respectivamente, no habiendo diferencias significativas entre los tres grupos. La Figura 9.1 representa las curvas de crecimiento en peso seco desde el día 1 hasta el día 42 después de la eclosión y en peso húmedo desde el día 35 hasta el día 90 después de la eclosión de los tres grupos.



**Figura 9.1** Curvas de crecimiento en peso seco y húmedo (medias  $\pm$  ESM) de las larvas descendientes de las hembras F2 (F2 A y F2 B) y de la puesta natural (F1).

Durante el convenio de colaboración IEO-Tinamenor se realizaron otras 7 producciones larvarias a partir de puestas naturales de ejemplares salvajes. La Figura 9.2 representa las

curvas exponenciales de crecimiento del mejor y del peor lote obtenidos en estas producciones y la curva de crecimiento conjunta de las dos F2 de este experimento.



**Figura 9.2.** Curvas de crecimiento del mejor y del peor lote obtenidos en varios cultivos larvarios de lenguado senegalés realizados en el IEO de Santander en el marco del convenio IEO-Tinamenor S. A. y curva de crecimiento de las larvas F2.

Al final de las Tablas 9.3, 9.4 y 9.5 figuran los datos de CV de la talla y el peso, el SGR y la longitud y el peso de los ejemplares de los tres grupos, F2A, F2B y F1, calculados para diferentes días de cultivo y que fueron seleccionados para coincidir con los días de cultivo e intervalos de tiempo encontrados en la bibliografía de esta especie.

**Tabla 9.3.** Coeficientes de variación (CV) del peso y de la talla en diferentes días del cultivo larvario después de la eclosión (DDE) obtenidos en la presente tesis y encontrados en la bibliografía revisada de lenguado senegalés.

DDE	CV en peso (%)	CV en talla (%)	Autores
69	45	15	Engrola et al., 2005
33	37	14	Engrola et al., 2007
40	26	11	
47	54	16	
50	33	12	
60	31	10	
92	40	14	
98	46	14	
15	51		Engrola et al., 2010
20	49		
35 F2 A	18	8	Datos de esta tesis
F2 B	27	13	
F1	23	8	
42 F2 A	26	8	
F2 B	14	5	
F1	24	7	
47 F2 A	29	10	
F2 B	34	11	
F1	32	13	
54 F2 A	31	13	
F2 B	43	17	
61 F2 A	33	11	
F2 B	50	16	
68 F2 A	46		

**Tabla 9.4** Tasa de crecimiento específica (SGR) en peso y talla en diferentes días del cultivo larvario después de la eclosión (DDE) obtenidos en la presente tesis y encontrados en la bibliografía revisada de lenguado senegalés.

DDE	SGR (peso)	SGR (longitud)	Temperatura (°C)	Autores
0-30	14,5	4,6	22 - 25	Ribeiro et al., 1999b
0-12 12-37	37,6 16,0		20 ± 1	Fernández-Díaz et al., 2001
0-69	6,3		20,9 ± 0,6	Engrola et al., 2005
45-59 59-66 66-75 75-82	3,4 1,1 2,9 6,1		20 ± 3	Ribeiro et al., 2005
0-30	18		20	Villalta y Estevez, 2005
0-12 12-20	10,8-12,7 7,3-9,2		20	Cañavate et al., 2006
8-30	12,0		19	Fernández-Díaz et al., 2006
0-12 12-20	11,5-15,1 4,0-5,6		19 - 20	Cañavate et al., 2007
0-22 22-43 43-70	14,5 7,4 4,8		14 - 20	Chereguini et al., 2007 a
26-33 26-40 33-50 33-63 40-60 40-92	10,0 12,2 7,3 3,6 8,5 6,9		20 - 21	Engrola et al., 2007
0-20	22,4		19,6 ± 0,3	Engrola et al., 2010
1-21 F2 B F1	23,4 20,8	6,7 6,2		
21-42 F2 A F2 B F1	10,0 9,3 11,3	3,0 2,8 3,3		
42-68 F2 A F2B F1	5,3 6,5 5,9		18,7 ± 0,0	Datos de esta tesis
68-90 F2 A F2 B F1	5,7 4,3 2,5			

**Tabla 9.5** Datos de longitud y peso seco en diferentes días del cultivo larvario después de la eclosión (DDE) obtenidos en la presente tesis y encontrados en la bibliografía revisada de lenguado senegalés.

DDE	Longitud (mm)	Peso seco (mg)	Temperatura (°C)	Autores
0 30	2,8 10		16,5 - 19	Ribeiro et al., 1999a
0 15 40	2,4 8 16			Imsland et al., 2003
40 69		13,8 76,2	20,9 ± 0,6	Engrola et al., 2005
36	15	6,2	21	Morais et al., 2005
36 45 59 66 75 82	13 15 17 17 19 22	3,4 4,7 7,7 7,4 9,9 17,9	20 ± 3	Ribeiro et al 2005
37	12,8	5,1	19 ± 1	Villalta et al., 2005a
30	13,5	3,9	20	Villalta y Estévez, 2005
8	3,63	0,03	19	Fernández- Díaz et al., 2006
33 40 47 50 60 63 92 98	10,31 12,98 14,88 15,87 28,28 19,13 48,57 33,58	2,01 4,44 5,12 7,34 50,9 11,85 365,28 99,73	20 - 21	Engrola et al., 2007
40	9,53-11,62	2,29-4,05		Villalta et al., 2008 a
40	13	7,2		Villalta et al., 2008 b
0 15 20		0,03 0,44 1,28	19,6 ± 0,3	Engrola et al., 2010
11 31	5,6 13,7		21,1 ± 1,0	Ribeiro et al., 2011
21 F2 A F2 B F1	11,05 11,16	2,15 2,37 2,77	18,71 ± 0,02	Datos de esta tesis
42 F2 A F2 B F1	20,74 20,02 22,24	17,65 16,71 23,81		

Los factores de condición (K) de ambas F2 y de la F1 en los días 47 y 61 después de la eclosión se muestran en la Tabla 9.6. Las principales malformaciones encontradas fueron la mala pigmentación y la metamorfosis incompleta con porcentajes similares en las F2 y F1 (Tabla 9.7). El porcentaje de supervivencia a día 90 fue del 94 y 88 % para las F2 y del 99 % para la F1 (Tabla 9.8).

**Tabla 9.6** Factor de condición (K) en diferentes días de cultivo larvario después de la eclosión (DDE) obtenidos en la presente tesis y encontrados en la bibliografía revisada de lenguado senegalés.

DDE	Factor de condición (K)	Autores
69	1,3	Engrola et al., 2005
62	0,85	Ribeiro et al., 2005
82	0,78	
47 F2 A	1,2	Datos de esta tesis
F2 B	1,3	
F1	1,2	
61 F2 A	1,2	
F2 B	1,3	

**Tabla 9.7:** Porcentajes de postlarvas malformadas obtenidos en la presente tesis y encontrados en la bibliografía revisada de lenguado senegalés.

DDE	% de malformaciones	Autores
70	10,5	Soares et al., 2001
37	0,2	Villalta et al., 2005 a
40	0,6	Villalta et al., 2008 b
90 F2	0,7	Datos de esta tesis
F1	0,2	

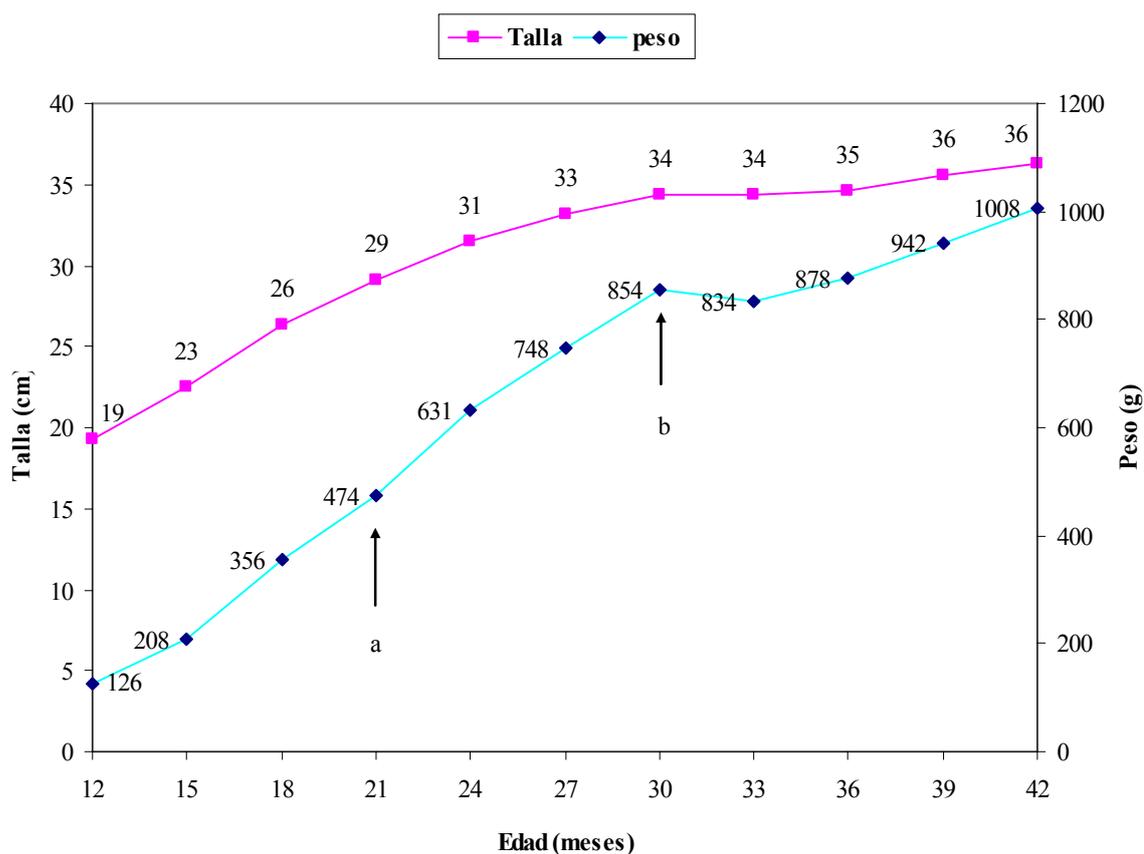
**Tabla 9.8.** Datos de porcentaje de supervivencia en diferentes días de cultivo larvario después de la eclosión (DDE) obtenidos en la presente tesis y encontrados en la bibliografía revisada de langosta senegalés.

DDE	Supervivencia	Autores
69	69	Engrola et al., 2005
36	94	Morais et al., 2005
36 a 82	93,5	Ribeiro et al., 2005
45 a 90	97	Sáenz de Rodrigáñez et al., 2005
45 a 105	61	
37	49	Villalta et al., 2005 a
36	72-90	Villalta et al., 2005b
30	44	Villalta y Estevez, 2005
30	81	Fernández-Díaz et al., 2006
20	74-83	Cañavate et al., 2007
43	100	Chereguini et al., 2007 a
70	81	
85	65	
40 a 92	98	Engrola et al., 2007
26 a 47	90	
33 a 63	39	
40	47,5	Villalta et al., 2008a
40	34	Villalta et al., 2008 b
50	50	Damaso-Rodrigues et al., 2010
60	30	
20	38	Engrola et al., 2010
17	87	Ribeiro et al., 2011
17 a 31	98	
90 F2 A	94	Datos de esta tesis
F2 B	88	
F1	99	

## Engorde

El primer tamaño comercial de 200g - 300g se alcanzó a los tres meses de iniciado el engorde, cuando los ejemplares tenían 15 meses de edad. Los siguientes tamaños comerciales se alcanzaron en los siguientes tiempos: 300g - 400g antes de los 17 meses de edad, 400g - 500g antes de los 19 meses, 500g - 600g antes de los 22 meses, 600g - 700g antes de los 24 meses.

La última talla comercial, > 700g, se alcanzó antes de los 26 meses de edad. En el periodo transcurrido hasta el tamaño >700g la mortalidad fue el 1%. A los 27 meses de edad se consideró finalizado el periodo de engorde. El SGR de este periodo fue 0,4. Posteriormente se redistribuyeron los ejemplares en tres tanques, los dos tanques del experimento de engorde y un nuevo tanque de mayores dimensiones, más adecuado para la reproducción, y se continuó realizando muestreos de talla, peso y estado de madurez gonadal de todos los ejemplares. En la Figura 9.3 se muestran los pesos y tallas medias en los distintos días de muestreo, y en la Tabla 9.9 el factor de condición (K), los CV de la talla y del peso en los distintos días de muestreo y los SGR para cada intervalo de muestreo de todos los ejemplares desde los 12 a los 42 meses de edad, periodo en el que todos los ejemplares estuvieron sometidos al mismo régimen natural de temperatura. En la Figura 9.4 se muestran las temperaturas medias durante este periodo del cultivo.

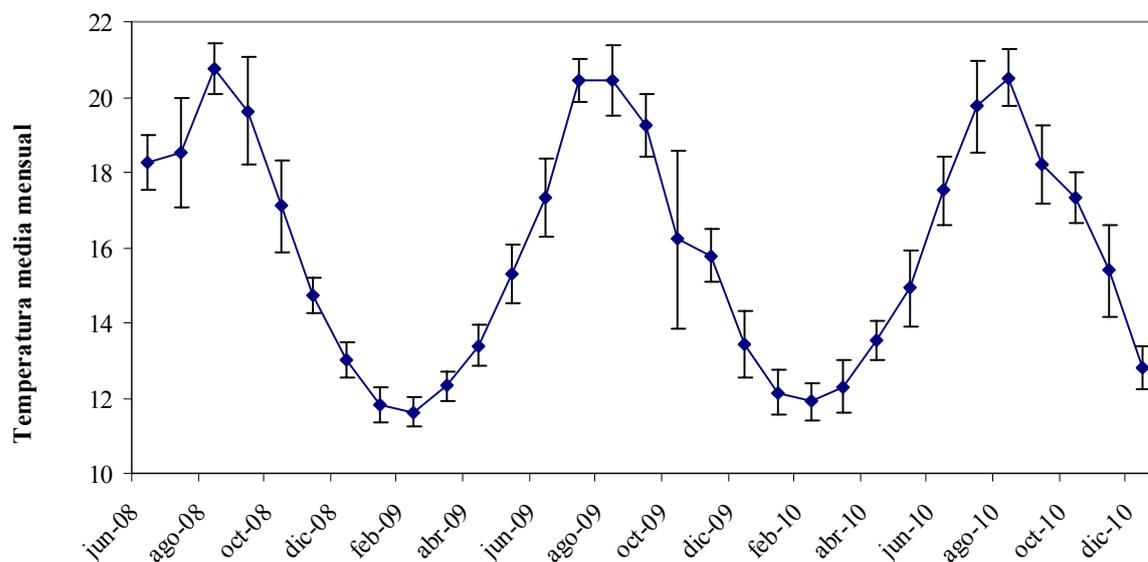


**Figura 9.3.** Crecimiento en talla y peso de los ejemplares de lenguado senegalés F2 durante el engorde, (a) detección de las primeras hembras maduras (b) 30 % de hembras y 70% indeterminados.

A los 21 meses de edad se detectaron 5 hembras maduras cuyo peso y talla medias fueron  $585 \pm 78$  g y  $30 \pm 1$  cm respectivamente, superiores a la media. El crecimiento se ralentizó a partir de los 30 meses de edad coincidiendo con que el 30 % de los ejemplares eran hembras con signos externos de madurez gonadal y cuyos pesos y tallas fueron  $1076 \pm 34$  g y  $36 \pm 0$  cm, también superiores a la media, como se muestra en la Figura 9.3. Incluso se llegó a tasas de crecimiento negativas entre los 30 y los 33 meses, periodo que coincidió con los meses más fríos del año, de primeros de diciembre a primeros de marzo (Figura 9.4).

**Tabla 9.9.** Factor de condición (K) y coeficientes de variación (CV) de talla y peso y tasa de crecimiento específica parcial (SGR) de los ejemplares de lenguado senegalés F2 desde los 12 meses hasta los 42 meses de edad, indicando la época correspondiente del año.

Edad (meses)	Época del año	K	CV (talla)	CV (peso)	SGR (Peso)
12	Jun-08	1,7	9,3	33,7	
15	Sep-08	1,8	9,8	33,7	0,56
18	Dic-08	2,0	9,5	32,5	0,60
21	Mar-09	1,9	10,4	34,8	0,32
24	Jun-09	2,0	9,7	32,4	0,32
27	Sep-09	2,1	9,3	30,1	0,19
30	Dic-09	2,1	9,1	29,5	0,15
33	Mar-10	2,0	8,8	29,0	-0,03
36	Jun-10	2,1	8,9	31,5	0,06
39	Sep-10	2,1	8,9	29,3	0,08
42	Dic-10	2,1	8,9	30,2	0,08



**Figura 9.4.** Temperatura media y desviación estándar desde junio de 2008 hasta diciembre de 2010, periodo en el que se realizó el engorde de lenguado senegalés F2 hasta la talla comercial y de reproductores.

## Reproductores

El periodo de puesta duró aproximadamente 8 meses: la primera puesta se obtuvo el 10 de marzo y la última el 21 de octubre. Hubo 49 puestas espontáneas con un total de  $3,5 \times 10^6$  huevos, de los cuales solo el 3,2 % fueron huevos flotantes. El número medio de huevos por puesta fue  $70 \pm 7 \times 10^3$  con una fecundidad relativa diaria de 703 huevos  $\text{kg}^{-1}$  de hembra. No se obtuvieron huevos fecundados y por tanto ninguna larva.

## 9.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En varios trabajos se ha estudiado la hipótesis de si los tratamientos hormonales aplicados a los reproductores podrían afectar a la calidad de los huevos y larvas, pero los resultados han sido dispares. Los huevos y larvas de *Lutjanus campechanus* procedentes de puestas naturales fueron menos numerosos pero más viables en términos de tasas de fecundación, eclosión y

supervivencia de las larvas a las 36 horas que los procedentes de puestas inducidas con hCG; además, los huevos de puestas naturales fueron de mayor tamaño y con mayores reservas lipídicas, lo que podría ser ventajoso en el inicio de la alimentación exógena (Papanikos et al., 2003). También en rodaballo *Scophthalmus maximus* L. las tasas de fecundación de los huevos obtenidos con implante de GnRHa fueron menores que las tasas de los obtenidos sin tratamiento hormonal, pero no se encontraron diferencias en las tasas de eclosión (Mugnier et al., 2000). Un estudio en lubina europea mostró que la tasa de eclosión de los huevos obtenidos mediante técnicas hormonales de inducción a la puesta era menor que la de los huevos obtenidos mediante ovulación natural (Fornies et al., 2001). También en *Limanda ferruginea* la calidad de los huevos fue peor con tratamientos hormonales (Avery et al., 2004). Sin embargo, en otros estudios la calidad fue igual; por ejemplo, en *Latris lineata* no hubo diferencias en las tasas de fecundación y eclosión de los huevos obtenidos mediante masaje abdominal con o sin tratamiento hormonal de GnRha (Morehead et al., 1998); tampoco hubo diferencias en las tasas de fecundación en lubina (Mylonas et al. 2003); en dorada los porcentajes de huevos viables fueron similares con o sin tratamiento con GnRHa (Barbaro et al., 1997); en *Sphoeroides annulatus* el tratamiento con GnRha aumentó el número de hembras que ovularon y no se encontraron diferencias ni en el tamaño del huevo ni en las tasas de fecundación (Duncan et al., 2003); en *Salvelinus alpinus* la tasa de supervivencia hasta el estado de “huevo con ojos” fue igual con y sin tratamiento hormonal (Gillet et al., 1996); la tasa de fecundación, el porcentaje de “huevos con ojos”, la tasa de eclosión y el tamaño de los huevos fue igual para hembras de *Oncorhynchus mykiss* tratadas o no con GnRHa (Arabaci et al., 2004), al igual que las tasa de supervivencia y de malformaciones en el estado de larvas con el saco vitelino reabsorbido (Bonnet et al., 2007b). En algunos casos los huevos y larvas obtenidos por tratamiento hormonal han sido mejores que los de las puestas naturales. Así, en *Pleuronectes ferrugineus* el uso de implantes de GnRHa permitió, además de obtener mayor cantidad de huevos y sincronía en las puestas, que los huevos fueran de mejor calidad en términos de tasas de fecundación y eclosión que los controles sin tratamiento hormonal (Larsson et al., 1997). Los posibles perjuicios del tratamiento hormonal a los reproductores pueden deberse al estado de desarrollo del ovario cuando se da el tratamiento, al desarrollo acelerado del ovocito, a las dosis de hormona o al tiempo de ovulación y al momento del masaje abdominal para obtener los huevos (Duncan et al., 2003).

En el caso del lenguado senegalés de cultivo (Generación F1), la inducción hormonal a la ovulación, la obtención de huevos por masaje abdominal y la fecundación artificial es, por el momento, la única vía para obtener larvas de segunda generación F2 y cerrar el ciclo de cultivo. Sin embargo, las pruebas realizadas en los capítulos anteriores de esta tesis, al igual que en la mayoría de los trabajos anteriormente citados, han valorado la calidad de los huevos y larvas en términos de tasas de fecundación y eclosión. Según Bonnet et al. (2007a) la inducción hormonal a la ovulación modifica la cantidad de ARNm de algunos genes del huevo, pero se desconoce como puede influir en el desarrollo embrionario posterior. No hemos encontrado referencias bibliográficas en que se estudie el desarrollo larvario en estadios avanzados, por lo que resulta de gran interés evaluar el crecimiento y la supervivencia de larvas, juveniles y reproductores nacidos mediante estas técnicas, información que puede ser útil para el sector industrial.

El crecimiento durante el cultivo larvario, postlarvario y el engorde hasta tamaño comercial y tamaño reproductor de los ejemplares F2 ha sido similar al de los ejemplares F1 de lenguado senegalés. Igualmente los ejemplares reproductores F2 han presentado problemas reproductivos similares a los ejemplares F1.

Las larvas F2 han tenido crecimientos, supervivencias, coeficientes de variación y malformaciones similares al cultivo de larvas F1 realizado simultáneamente, así como a otras producciones larvarias F1 realizadas en la Planta de Cultivos del Bocal. Los pesos inferiores de las larvas F2 en las primeras etapas del cultivo larvario respecto al de las larvas F1, se pueden deber al inferior tamaño inicial de las larvas F2, pero al final del cultivo, a día 90 después de la eclosión, se alcanzaron los mismos pesos medios en los tres grupos. Los resultados de los cultivos larvarios F2 y F1 de este estudio son, en algunos casos mejores que los mejores datos encontrados en la bibliografía sobre el cultivo larvario de esta especie, como se puede ver en las Tablas 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7 y 9.8. Aunque es necesario incrementar nuestro conocimiento en el cultivo de larvas F2, los datos de esta tesis avalan la idoneidad de la técnica de inducción hormonal y fecundación artificial.

El primer tamaño comercial, 200-300 g, y el último, mayores de 700 g, se alcanzaron entre los 15 y los 26 meses de edad, estando en el rango de los datos de juveniles F1 de otros autores. Según los datos aportados por Fernández y Rodríguez en la Guía de la Piscicultura Europea 2002, el tamaño comercial de 300g - 400g se alcanza a los 19 - 20 meses a 18 °C. En otros

estudios realizados a 20 °C se obtuvieron tasas de crecimiento específico (SGR) de 0,89 entre los pesos de 129 y 288 g y de 0,44 entre 124 g y 635 g (Rodríguez y Souto, 2003 y 2004). En esta tesis se han obtenido SGRs de 0,58 y 0,45 para los rangos de pesos entre 125 – 356 g y 126 - 631 g respectivamente. Las diferencias existentes pueden ser debidas al efecto de la temperatura además de posibles diferencias genéticas. Así, Olmedo et al., (2003) con ejemplares capturados en el mar y realizando el engorde en temperaturas de 11,8 °C a 20,4 °C obtuvieron un SGR de 0,49 entre 112 – 363 g, mientras que en esta tesis se ha obtenido un SGR de 0,58 entre 125 y 356 g con temperaturas similares. Estos resultados indican que en términos de crecimiento la fase final de engorde es satisfactoria, y se abre el camino a posibles mejoras en el rendimiento del cultivo del lenguado senegalés al facilitar la selección genética de los progenitores de acuerdo a las características que interesen al acuicultor.

El principal problema encontrado en la fecundación artificial ha sido la necesidad de un gran número de machos para obtener el esperma. El lenguado senegalés es una especie con un testículo muy pequeño que produce cantidades pequeñas de esperma (García López et al., 2005 y 2006b, Cabrita et al., 2006). Mediante tratamientos hormonales con GnRH $\alpha$  y hCG se ha podido estimular la espermatogénesis (Chereguini et al., 2006, Agulleiro et al., 2007, Cabrita et al., 2011, Guzmán et al., 2011 a y b) pero su eficacia ha sido limitada y la cantidad de esperma que se ha podido extraer por masaje abdominal ha sido escasa. Actualmente se han abierto nuevas líneas de investigación en gonadotropinas recombinantes de lenguado que podrían permitir el desarrollo de métodos biotecnológicos para el estudio y control de la espermatogénesis (Cerdà et al., 2008, Verdura et al., 2011). En la fecundación artificial realizada para obtener los huevos fecundados F2, el esperma fresco procedía de 17 machos mientras que el esperma crioconservado era solo de 6. Estas diferencias podrían deberse a que el esperma fresco se obtuvo de machos pequeños a principio del periodo reproductivo (finales de febrero) cuando la producción de esperma es menor (Anguis et al., 2007), mientras que el esperma crioconservado se obtuvo en pleno periodo de puesta y de machos de mayor tamaño, indicando la importancia de la época de recogida del esperma y la necesidad de seleccionar los machos en función de la cantidad y de la calidad del esperma que producen (Cabrita et al., 2006). Por otro lado, en este estudio se obtuvieron tasas de fecundación similares con 260  $\mu$ l de esperma y con 664  $\mu$ l, indicando que, al menos, en el segundo caso se utilizó un exceso de esperma. Dado el carácter oligoespérmico de esta especie, es esperable que la cantidad de

espermatozoides necesarios para fecundar un huevo sea menor que en otras especies que producen más cantidad de esperma como el rodaballo o como las especies de agua dulce *Salmo gairdneri*, *Cyprinus carpio* y *Esox lucius* (Chereguini et al., 1999); por lo que es necesario realizar el estudio de la relación esperma : huevo adecuada para la fecundación artificial en el lenguado senegalés, a fin de determinar la cantidad mínima de esperma que debería utilizarse en esta técnica.

A los 21 meses de edad se pudo detectar las primeras 5 hembras con claros signos de madurez sexual y a los 30 meses, el 30% de los ejemplares pudieron ser perfectamente identificados como hembras cuyo peso de  $1075 \pm 34$  g era superior al medio; el resto de los ejemplares podrían ser machos o hembras que aún no habían alcanzado la madurez sexual. A partir de este momento el crecimiento se ralentizó ya que parte del alimento consumido se empezó a destinar al proceso de la reproducción. El sexo de los ejemplares seleccionados para formar el stock reproductor F2 se pudo determinar externamente a los 3 años y 2 meses de edad, cuando el peso medio del stock era 885 g, mientras que Vazquez et al. (2003) en un estudio de crecimiento desde alevín hasta reproductor encontraron hembras maduras cuando el stock tenía un peso medio de 1168 g y más de 3 años de edad.

Los reproductores F2, durante la época de puesta del 2011 presentaron los mismos problemas que los ejemplares F1, es decir menor productividad que los ejemplares salvajes y huevos no fecundados (Anguis y Cañavate 2005, Guzmán et al., 2009, Oliveira et al., 2011). El periodo de puesta del stock F2 ha sido similar al de los stocks salvajes y F1 de la Planta de Cultivos de El Bocal (Martín et al., 2007).

En estudios genéticos realizados en diferentes stocks de reproductores compuestos por ejemplares salvajes o por ejemplares F1 se determinó que los individuos F1 mostraban una reducción sustancial de su variabilidad genética cuando se compararon con los salvajes, revelándose que más del 75 % de los componentes de los stocks F1 eran hermanos o medio hermanos. Esta alta proporción sugiere un modelo reproductivo del stock salvaje en cautividad en el cual solo unos pocos individuos se reproducen con éxito, conduciendo a una pérdida sustancial de variabilidad genética en una sola generación. Estos stocks F1 formados por hermanos pueden en parte explicar los crecientes problemas reproductivos de los ejemplares F1 comparados con los salvajes (Porta et al., 2006, Duncan et al., 2007, Mira et al., 2010). El stock de reproductores F2 estaba formado por ejemplares al menos medio

hermanos ya que provenían de la fecundación de una sola hembra F1 con un pool de varios machos F1, que a su vez podrían ya tener un alto grado de parentesco entre ellos, al proceder todos ellos de puestas de los reproductores salvajes de la Planta de Cultivos de “El Bocal”. La inducción hormonal a la ovulación y la fecundación artificial puede ser una herramienta útil para el manejo del stock de reproductores salvajes y mediante el programa adecuado de cruces reproductivos permitir mantener la variabilidad genética del stock salvaje evitando los efectos indeseables de la consanguinidad.

En conclusión, los alevines obtenidos mediante inducción hormonal a la ovulación y fecundación artificial tienen igual calidad que los alevines procedentes de las puestas espontáneas de los reproductores salvajes y los reproductores F2, al igual que los reproductores F1 producen huevos sin fecundar y en menor cantidad que los salvajes. Por ello, el método de obtención de alevines F2 presentado en esta tesis puede ser una vía adecuada para la industria acuícola, que permitiría planificar todo el proceso de producción y además abriría el camino a la mejora genética necesaria para rentabilizar el cultivo del lenguado senegalés.

**CAPÍTULO 10. CONCLUSIONES GENERALES**



1. Para obtener huevos de lenguado senegalés por masaje abdominal, la inyección intramuscular es mejor método de administración de la terapia hormonal para la inducción de la ovulación de hembras de lenguado senegalés que el implante de liberación sostenida.
2. El tiempo que transcurre entre la inyección hormonal y la ovulación está inversamente correlacionado con la temperatura a la que se mantiene a las hembras durante el tratamiento hormonal en el rango entre 14 °C y 18 °C. Los tiempos de ovulación son  $53,2 \pm 0,5$  horas,  $43,4 \pm 1,1$  horas y  $39,5 \pm 0,7$  horas a 14 °C, 16 °C y 18 °C respectivamente.
3. Una vez producida la ovulación, el periodo de viabilidad de los huevos en el interior de la hembra esta inversamente correlacionado con la temperatura a la que se mantiene a las hembras en el rango de temperaturas entre 14 °C y 18 °C. La viabilidad de los huevos a 14 °C se mantiene durante 6 horas, a 16 °C durante 3 horas y a 18 °C es menor de 3 horas
4. La hora del día en la que se administra el tratamiento hormonal influye en la ovulación, obteniéndose la mayor cantidad de huevos y la mejor calidad cuando, a 16 °C, el tratamiento se administra en las primeras horas de la mañana en lugar de al atardecer.
5. La transparencia, la ausencia de espacio perivitelino y la distribución homogénea de las gotas de grasa en los huevos, el pH de líquido ovárico o la flotabilidad no son buenos indicadores de la calidad de los huevos de lenguado senegalés antes de la fecundación artificial.
6. Se pueden inducir varias ovulaciones mediante inyecciones consecutivas de GnRH $\alpha$  y obtener gran cantidad de huevos de buena calidad. Es posible administrar dos inyecciones consecutivas separadas solo 7 días, pero se recomienda un descanso de un mes para la tercera inyección.
7. El crecimiento de las larvas, juveniles hasta tamaño comercial y tamaño reproductor de lenguados F2 obtenidos mediante inducción hormonal a la ovulación, masaje

abdominal y fecundación artificial es similar al de los ejemplares F1. Así mismo, los reproductores F2 y los F1 presentan problemas reproductivos similares.

8. Se ha demostrado eficaz el siguiente protocolo para obtener huevos para la fecundación artificial: inducción hormonal a hembras en estado E III de madurez gonadal mediante inyección intramuscular de GnRHa en dosis de  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corporal, a primera hora de la mañana, temperatura durante el tratamiento de  $16^\circ\text{C}$ , y obtención de los huevos por presión abdominal a las 41 - 44 horas después del tratamiento. Siete días después es posible realizar la segunda inducción hormonal y después de un mes la tercera.

Las futuras investigaciones encaminadas a obtener larvas F2 en cantidad suficiente para el cultivo a escala industrial podrían agruparse en tres grupos o líneas:

1. Continuar el estudio de los factores que influyen en la inducción hormonal a la ovulación como la dosis de hormona, el estado de desarrollo gonadal, el tamaño y la edad de la hembra y la época del periodo de puesta. Además es necesario el desarrollo de metodologías para determinar la calidad de los huevos antes de la fecundación.
2. Estudio de los protocolos de fecundación artificial específicos para el lenguado senegalés, principalmente la relación espermatozoide: huevo, así como métodos de conservación a corto y largo plazo de los gametos.
3. Búsqueda de dietas específicas para reproductores de lenguado senegalés, con el fin de mejorar la calidad de los gametos, no solo destinados a la fecundación artificial sino también a la mejora de las puestas espontáneas de los reproductores salvajes.

**CAPÍTULO 11. BIBLIOGRAFÍA**





- Abellan, E., Basurco, B., 1999. Marine Finfish Species Diversification: Current Situation and Prospects in Mediterranean Aquaculture. Options Méditerranéennes, Serie B: Etudes et recherches, n° 24. Zaragoza, Spain, 139pp.
- Aegerter, S., Jalabert, B., 2004. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 231, 59-71.
- Agulleiro, M. J., Anguís, V., Cañavate, J. P., Martínez-Rodríguez, G., Mylonas, C. C., Cerdà, J., 2006. Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. Aquaculture 257, 511-524.
- Agulleiro, M. J., Scott, A. P., Duncan, N., Mylonas, C. C., Cerdà, J., 2007. Treatment of GnRH $\alpha$ -implanted Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with 11-ketoandrostenedione stimulates spermatogenesis and increases sperm motility. Comparative Biochemistry and Physiology 147, 885-892.
- Almendras, J. M., Duenas, C., Nacario, J., Sherwood, N. M., Crim, L. W., 1988. Sustained hormone release. III. Use of gonadotropin releasing hormone analogues to induce multiple spawnings in sea bass, *Lates calcarifer*. Aquaculture 74, 97-111.
- Alvariño, J. M. R., Zanuy, S., Prat, F., Carrillo, M., Mañanós, E., 1992. Stimulation of ovulation and steroid secretion by LHRHa injection in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of time of day. Aquaculture 102, 177-186.
- Ambrosio, P. P., Costa, C., Sánchez, P., Flos, R., 2008. Stocking density and its influence on shape of Senegalese sole adults. Aquaculture International 16, 333-343.
- Anguís, V., Calvo, A., Gil, J., Cañavate, J. P., 2005. Influencia de la reducción en el régimen natural de fluctuación de temperatura sobre la puesta en cautividad del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Resúmenes X Congreso Nacional de Acuicultura, Tomo II, 488-489.
- Anguís, V., Cañavate, J. P., 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. Aquaculture 243, 133-145.
- Anguís, V., Chereguini, O., Rodríguez, C., Moure, M. 2007. Seasonal changes in sperm quality and production of Senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup, 1958) in facilities from northern (Santander) and southern (Cádiz) of Spain. En: Abstracts Aquaculture Europe 2007 Conference. 25-27 Octubre, Estambul, Turquía.
- APROMAR 2009. La Acuicultura Marina de Peces en España 2009. <http://www.apomar.es/informes.asp>.
- APROMAR 2013. La Acuicultura Marina de Peces en España 2013. <http://www.apomar.es/informes.asp>.
- Arabaci, M., Çağırhan, H., Sari, M., 2001. Induction of spawning in common carp (*Cyprinus carpio*) using LHRHa ([D-Ser (tBu)<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-Net]-LHRH) combined with haloperidol: effects of different treatment time and determination of latency period dependence on temperature. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 1, 1-5.
- Arabaci, M., Diler, I., Sari, M., 2004. Induction and synchronisation of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRha) and its effects on egg quality. Aquaculture 237, 475-484.
- Avery, T. S., Boyce, D., Brown, J. A., 2004. Mortality of yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (Storer), eggs: effects of temperature and hormone-induced ovulation. Aquaculture 230, 297-311.

## B

- Bambill, G. A., Oka, M., Radonić, M., López, A. V., Müller, M. I., Boccanfuso, J. J., Bianca, F. A., 2006. Broodstock management and induced spawning of flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) under a closed recirculated system. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 41, 45-55.
- Barbaro, A., Francescon, A., Bozzato, G., Merlin, A., Belvedere, P., Colombo, L., 1997. Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by a long-acting GnRH agonist and its effects on egg quality and daily timing of spawning. *Aquaculture* 154, 349-359.
- Bayarri, M. J., Muñoz-Cueto, J. A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Rol de Lama, M. A., Madrid, J. A., Sánchez-Vázquez, F. J., 2004a. Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Physiology & Behavior* 81, 577-583.
- Bayarri, M. J., Rodríguez, L., Zanuy, S., Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J., Kagawa, H., Okuzawa, K., Carrillo, M., 2004b. Effect of photoperiod manipulation on the daily rhythms of melatonin and reproductive hormones in caged European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology* 136, 72-81.
- Beirão, J., Cabrita, E., Soares, F., Herráez, M. P., Dinis, M. T., 2008. Cellular damage in spermatozoa from wild-captured *Solea senegalensis* as detected by two different assays: comet analysis and Annexin V-Fluorescein staining. *Journal of Applied Ichthyology* 24, 508-513.
- Beirão, J., Soares, F., Herraez, M. P., Dinis, M. T., Cabrita, E., 2011. Changes in *Solea senegalensis* sperm quality throughout the year. *Animal Reproduction Science* 126, 122-129.
- Ben-Tuvia, A., 1990. A taxonomic reappraisal of the Atlanto-Mediterranean soles *Solea solea*, *S. senegalensis*, and *S. lascaris*. *Journal of Fish Biology*. 36, 947-960
- Berlinsky, D. L., King V, W., Smith, T. I. J., 2005. The use of luteinizing hormone releasing hormone analogue for ovulation induction in black sea bass (*Centropristis striata*). *Aquaculture* 250, 813-822.
- Berlinsky, D. L., King V, W., Hodson, R. G., Sullivan, C. V., 1997. Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 28, 79-86.
- Bieniarz, K., Popek, W., Breton, B., Epler, P., 1985. Daily changes in the gonadotropin levels and response of carp oocytes to hypophysial homogenate. *Chronobiology International* 2, 93-101.
- Billard, R., 1988. Artificial insemination and gamete management in fish. *Marine Behaviour and Physiology* 14, 3-21.
- Billard, R., Bieniarz, K., Popek, W., Epler, P., Breton, B., Alagarwami, K., 1987. Stimulation of gonadotropin secretion and spermiation in carp by pimozide-LRH-A treatment: effects of dose and time of day. *Aquaculture* 62, 161-170.
- Billard, R., Gillet, C., 1981. Vieillissement des ovules et potentialisation par la température des effets des micropolluants du milieu aqueux sur les gamètes chez la truite. *Cahiers du Laboratoire d'Hydrobiologie de Montereau* 12, 35-42.
- Bobe, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 535-548.

- Bonnet, E., Fostier, A., Bobe, J., 2007a . Microarray-based analysis of fish egg quality after natural or controlled ovulation. *BMC Genomics* 8, 55.
- Bonnet, E., Fostier, A., Bobe, J., 2007b. Characterization of rainbow trout egg quality: A case study using four different breeding protocols, with emphasis on the incidence of embryonic malformations. *Theriogenology* 67, 786-794.
- Bromage, N., Bruce, M., Basavaraja, N., Rana, K., Shields, R., Young, C., Dye, J., Smith, P., Gillespie, M., Gamble, J., 1994. Egg quality determinants in finfish: the role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Journal of The World Aquaculture Society* 25, 13-21.

## C

- Cabrita, E., Soares, F., Dinis, M. T., 2006. Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. *Aquaculture* 261, 967-975.
- Cabrita, E., Soares, F., Beirão, J., García-López, A., Martínez-Rodríguez, G., Dinis, M. T., 2011. Endocrine and milt response of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, males maintained in captivity. *Theriogenology* 75, 1-9.
- Calvo, A., Gil, J., Moure, M., Álvarez, C. M., Cañavate, J. P., Anguís, V., 2005. Primeros resultados de puestas naturales obtenidas en reproductores de primera generación (F1) de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Tomo II, 2005. Resúmenes X Congreso Nacional de Acuicultura. Gandía. Valencia, España, pp. 506-507.
- Cañavate, J. P., 2005. Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 21, 147-154.
- Cañavate J. P., Fernández-Díaz C., 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174, 255-263.
- Cañavate, J. P., Prieto, A., Zerolo, R., Sole, M., Sarasquete, C., Fernández-Díaz, C., 2007. Effects of light intensity and addition of carotene rich *Dunaliella salina* live cells on growth and antioxidant activity of *Solea senegalensis* Kaup (1858) larval and metamorphic stages. *Journal of Fish Biology* 71, 781-794.
- Cañavate, J. P., Zerolo, R., Fernández-Díaz, C., 2006. Feeding and development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in different photoperiods. *Aquaculture* 258, 368-377.
- Carazo, I.; Chereguini, O., Hubbard, P., Huerta, M., Martin, I., Mañanós, E., Duncan, N., 2011. Reproductive behaviour, the absence of reproductive behaviour in cultured (G1 generation) and chemical communication in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). En "Libro de Actas del 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Cochin, India, 9-14 August 2011.
- Carragher, J. F., Pankhurst, N. W., 1993. Plasma levels of sex steroids during sexual maturation of snapper, *Pagrus auratus* (Sparidae), caught from the wild. *Aquaculture* 109, 375-388.
- Castelo Branco, M. A., Moura, O., Gamito, S., 2006. Growth and survival of post-larvae of sole (*Solea senegalensis*) in net cages at the bottom of earthen ponds. *Aquaculture* 259, 278-282.
- Castro J., Pino A., Hermida M., Bouza C., Riaza A., Ferreiro I., Sanchez L., Martinez, P., 2006. A microsatellite marker tool for parentage analysis in Senegal sole (*Solea senegalensis*): Genotyping errors, null alleles and conformance to theoretical assumptions. *Aquaculture* 261, 1194-1203.

- Cerdà, J., Chauvigne, F., Agulleiro, M. J., Marin, E., Halm, S., Martínez-Rodríguez, G., Prat, F., 2008. Molecular cloning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits and expression pattern during spermatogenesis. *General and Comparative Endocrinology* 156, 470-481.
- Chereguini, O., Anguís, V., Peleteiro, B., Guzmán, J. M. 2006. Sperm quality in Senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup 1958): motility, density and response to hormonal treatments. *European Aquaculture Society*, Florencia.
- Chereguini, O., Cal, R. M., Dreanno, C., Ogier de Baulny, B., Suquet, M., Maise, G., 1997. Short-term storage and cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm. *Aquatic Living Resources* 10, 251-255.
- Chereguini, O., Díez, J., De la Hera, M., 2007 a. First results of rearing *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae using a co-feeding regime in Cantabria (northern Spain). *Informes Técnicos. Instituto Español de Oceanografía* 186, 14 pp.
- Chereguini, O., García de la Banda, I., Rasines, I., Fernandez, A., 1999. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. *Aquaculture Research* 30, 1-6.
- Chereguini, O., García de la Banda, I., Herrera, M., Martínez, C., De la Hera, M., 2003. Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. *Aquaculture Research* 34, 739-747.
- Chereguini, O., Rasines, I., Anguís, V., Cal, R., Martín, I., Rodríguez, C., Guzmán, J. M., Mylonas, C. C., Mañanós, E., 2007 b. Primeras fecundaciones artificiales en lenguado senegalés cultivado (Generación F1). *Resúmenes del XI Congreso Nacional de Acuicultura*. Xunta de Galicia, Vigo, España, 2007, vol II, 1435-1438.
- Ciereszko, A., Wojtczak, M., Dietrich, G.J., Kuźmiński, H., Dobosz, S., 2009. A lack of consistent relationship between distribution of lipid droplets and egg quality in hatchery-raised rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 289, 150-153.
- Conceição, L. E. C., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragão, C., Morais, S., Lacuisse, M., Soares, F., Dinis, M. T., 2007. Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 268, 64-81.
- Conklin, D. E., Piedrahita, R., 2010. California halibut. En: *Practical Flatfish Culture and Stock Enhancement*. Daniels, H. V., Watanabe, W. O. (Eds). Wiley - Blackwell. Singapore 2010. pp., 48-64.
- Costas B., Aragão C., Soengas J. L., Míguez J. M., Rema P., Dias J., Afonso A., Conceição, L. E. C., 2012. Effects of dietary amino acids and repeated handling on stress response and brain monoaminergic neurotransmitters in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology* 161, 18-26.

## D

- Dâmaso-Rodrigues, M. L., Pousão-Ferreira, P., Ribeiro, L., Couthinho, J., Bandarra, N. M., Gavaia, P. J., Narciso, L., Morais, S., 2010. Lack of essential fatty acids in live feed during larval and post-larval rearing: effect on the performance of juvenile *Solea senegalensis*. *Aquaculture International* 18, 741-757.

- Daniels, H., Watanabe, W. O., Murashige, R., Losordo, T., Dumas, C., 2010. Culture of southern flounder. En: Practical Flatfish Culture and Stock Enhancement. Daniels, H. V., Watanabe, W. O. (Eds). Wiley - Blackwell. Singapore 2010. pp., 82-100.
- Dinis, M. T., 1986. Quatre Soleidae de l'Estuaire du Tage. Reproduction et Croissance. Essai d'Élevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858. Thèse d'Etat dès Sciences Naturelles, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C., 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176, 27-38.
- Drake, P., Arias, A. M., Rodríguez, A., 1984. Cultivo extensivo de peces marinos en los esteros de las salinas de San Fernando (Cádiz) II: características de la producción de peces. Informes Técnicos del Instituto de Investigaciones Pesqueras 116, 1-23.
- Drori, S., Ofir, M., Levavi-Sivan, B., Yaron, Z., 1994. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature. *Aquaculture* 119, 393-407.
- Duncan, N. J., Rodriguez M. de O., G. A., Alok, D., Zohar, Y., 2003. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRHa on bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. *Aquaculture* 218, 625-635.
- Duncan, N., Porta, J., Carazo, I., Porta, J. M., Agulleiro, M. J., Cerdà, J., 2007. Genetic diversity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) stocks reared in captivity. Abstracts of the 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, June 3-8, 2007, Saint Malo, Francia.

## E

- Engrola, S., Conceição, L. E. C., Gavaia, P. J., Cancela, M. L., Dinis, M. T., 2005. Effects of pre-weaning feeding frequency on growth, survival, and deformation of Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 57, 10-18.
- Engrola, S., Conceição, L. E. C., Dias, L., Pereira, R., Ribeiro, L., Dinis, M. T., 2007. Improving weaning strategies for Senegalese sole: effects of body weight and digestive capacity. *Aquaculture Research* 38, 696-707.
- Engrola, S., Dinis, M. T., Conceição, L. E. C., 2010. Senegalese sole larvae growth and protein utilization is depressed when co-fed high levels of inert diet and *Artemia* since first feeding. *Aquaculture Nutrition* 16, 457-465.

## F

- Fairchild, E., 2010. Culture of winter flounder. En: Practical Flatfish Culture and Stock Enhancement. Daniels, H. V., Watanabe, W. O. (eds). Wiley - Blackwell. Singapore 2010. pp., 101-122.
- Fauvel, C., Omnès, M. H., Mugnier, C., Normant, Y., Dorange, G., Suquet, M., 1993a. La reproduction du turbot. Aspects biologiques et gestion des reproducteurs. *La pisciculture française* 112, 23-39.
- Fauvel, C., Omnès, M., Suquet, M., Normant, Y., 1993b. Reliable assessment of overripening in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a simple pH measurement. *Aquaculture* 117, 107-113.

- Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., Cañavate, J. P., Moyano, F. J., Alarcón, F. J., Díaz, M., 2001. Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of Fish Biology* 58, 1086-1097.
- Fernández-Díaz, C., Kopecka, J., Cañavate, J. P., Sarasquete, C., Solé, M., 2006. Variations on development and stress defences in *Solea senegalensis* larvae fed on live and microencapsulated diets. *Aquaculture* 251, 573-584.
- Fernández, B. y Rodríguez X. L. 2002. Guía de la Piscicultura Europea. Xunta de Galicia. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos. Comunidad Europea, Fondo Social Europeo.
- FishBase. Froese, R. y D. Pauly. (Eds.) 2011. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).
- Fitzpatrick, M. S., Suzumoto, B. K., Schreck, C. B., Oberbilling, D., 1984. Luteinizing hormone-releasing hormone analogue induces precocious ovulation in adult coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 43, 67-73.
- Flajšhans, M., Kohlmann, K., Ráb, P., 2007. Autotriploid tench *Tinca tinca* (L.) larvae obtained by fertilization of eggs previously subjected to postovulatory ageing *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Fish Biology* 71, 868-876.
- Forniés, M. A., Mañanós, E., Carrillo, M., Rocha, A., Laureau, S., Mylonas, C. C., Zohar, Y., Zanuy, S., 2001. Spawning induction of individual European sea bass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture* 202, 221-234.
- Fortuny, A., Espinach Ros, A., Amutio, V. G., 1988. Hormonal induction of final maturation and ovulation in the sábalo, *Prochilodus platensis* Holmberg: Treatments, latency and incubation times and viability of ovules retained in the ovary after ovulation. *Aquaculture* 73, 373-381.

## G

- García, L. M. B., 1989. Dose-dependent spawning response of mature female sea bass, *Lates calcarifer*, (Bloch), to pelleted luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa). *Aquaculture* 77, 85-96.
- García, L. M. B., 1990. Spawning response latency and egg production capacity of LHRHa-injected mature female sea bass, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Applied Ichthyology* 6, 167-172.
- García-López, A., 2005. Efectos del fotoperiodo y del termoperiodo sobre el ciclo reproductor en cautividad del lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales.
- García-López, A., Anguis, V., Couto, E., Canario, A. V. M., Cañavate, J. P., Sarasquete, C., Martínez-Rodríguez, G., 2006a. Non-invasive assessment of reproductive status and cycle of sex steroid levels in a captive wild broodstock of Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup). *Aquaculture* 254, 583-593.
- García-López, A., Couto, E., Canario, A. V. M., Sarasquete, C., Martínez-Rodríguez, G., 2007. Ovarian development and plasma sex steroid levels in cultured female Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146, 342-354.
- García-López, A., Fernández-Pasquier, V., Couto, E., Canario, A. V. M., Sarasquete, C., Martínez-Rodríguez, G., 2006 b. Testicular development and plasma sex steroid levels in cultured male Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup. *General and Comparative Endocrinology* 147, 343-351.

- García-López, A., Martínez-Rodríguez, G., Sarasquete, C., 2005. Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): Anatomy, histology and histochemistry. *Histology and Histopathology* 20, 1179-1189.
- García de la Banda, I., Lobo, C., Chabrilón, M., León-Rubio, J. M., Arijo, S., Pazos, G., María Lucas, L., Moriñigo, M. A., 2011. Influence of dietary administration of a probiotic strain *Shewanella putrefaciens* on Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) growth, body composition and resistance to *Photobacterium damsela subsp piscicida*. *Aquaculture Research* 43, 662-669.
- Gardes, L., Villanove, P., Buchet, V., Fauvel, C., 2000. Induced spawning of red drum, *Sciaenops ocellatus*: use of multivariate and univariate analysis methods in the search for side effects of LH-RHa treatments and ovarian development state upon spawn quality. *Aquatic Living Resources* 13, 19-27.
- Gavaia, P. J., Dinis, M. T., Cancela, M. L., 2002. Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 211, 305-323.
- Gillet, C., Breton, B., Mikolajczyk, T., 1996. Effects of GnRHa and pimozide treatments on the timing of ovulation and on egg quality in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) at 5 and 10 °C. *Aquatic Living Resources* 9, 257-263.
- Giménez, G., Estévez, A., Lahnsteiner, F., Zecevic, B., Bell, G., Henderson, R. J., Piñera, J. A., Sanchez-Prado, J. A., 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). *Aquaculture* 260, 232-243.
- Guzmán, J. M., Cal, R., García-López, A., Chereguini, O., Kight, K., Olmedo, M., Sarasquete, C., Mylonas, C.C., Peleteiro, B., Zohar, M., Mañanós, E., 2011b. Effects of in vivo treatment with the dopamine antagonist pimozide and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) on the reproductive axis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 158 (2), 235-245.
- Guzmán, J. M., Norberg, B., Ramos, J., Mylonas, C. C., Mañanós, E., 2008. Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *General and Comparative Endocrinology* 156, 285-297.
- Guzmán, J. M., Ramos, J., Mylonas, C. C., Mañanós, E., 2009. Spawning performance and plasma levels of GnRHa and sex steroids in cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*) treated with different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture* 291, 200-209.
- Guzmán, J. M., Ramos, J., Mylonas, C. C., Mañanós, E., 2011a. Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) treatments on the stimulation of male Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction. *Aquaculture* 316, 121-128.

## H

- Haraldsson, H., Sveinsson, T., Skúlason, S., 1993. Effects of LHRHa treatments upon the timing of ovulation and upon egg and offspring quality in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture and Fisheries Management* 24, 145-150.
- Harmin, S. A., Crim, L. W., 1992. Gonadotropic hormone-releasing hormone analog (GnRH-A) induced ovulation and spawning in female winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Aquaculture* 104, 375-390.

- Hirose, K., Ishida, R., Sakai, K., 1977. Induced ovulation of ayu using human chorionic gonadotropin (HCG), with special reference to changes in several characteristics of eggs retained in the body cavity after ovulation. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 43, 409-416.
- Hirose, K., Machida, Y., Donaldson, E. M., 1979. Induced ovulation of Japanese flounder (*Limanda yokohamae*) with human chorionic gonadotropin and salmon gonadotropin, with special reference to changes in quality of eggs retained in the ovarian cavity after ovulation. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 45, 31-36.
- Hogendoorn, H., Vismans, M. M., 1980. Controlled propagation of the African catfish, *Clarias lazera* (C. & V.) II. Artificial reproduction. *Aquaculture* 21, 39-53.
- Howell, B., Conceição, L. E. C., Prickett, R., Cañavate, J. P., Mañanós, E., 2009. Sole farming: nearly there but not quite. A report of 4th Workshop on the Cultivation of Soles. *Aquaculture Europe* 34, 24-27.
- Howell, B., Scott, A.P., 1989. Ovulation cycles and post-ovulatory deterioration of eggs of the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Rapports et Procès-Verbaux des Réunions. Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée*, 191, 21-26.

### I

- Imsland, A. K., Foss, A., Conceição, L. E. C., Dinis, M. T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P., 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13, 379-407.

### J

- JACUMAR, 2006 Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos. Comunicación Internet (<http://www.mapa.es/es/pesca/pags/jacumar/>).

### K

- Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Okuzawa, K., Iinuma, N., 1997. Induced ovulation by injection of 17, 20  $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one in the artificially matured Japanese eel, with special reference to ovulation time. *Fisheries Science* 63, 365-367.
- Kjørsvik, E., Hoehne-Reitan, K., Reitan, K. I., 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 227, 9-20.
- Kjørsvik, E., Mangor-Jensen, A., Holmefjord, I., 1990. Egg quality in fishes. *Advances in Marine Biology* 26, 71-113.

### L

- Lahnsteiner, F., 2000. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. *Fish Physiology and Biochemistry* 23, 107-118.

- Lahnsteiner, F., Soares, F., Ribeiro, L., Dinis, M. T., 2009. Egg quality determination in teleost fish, En: Cabrita, E., Robles, V., Herraéz, M. P., (Eds.), *Methods in Reproductive Aquaculture. Marine and Freshwater Species*. CRC Press, Boca Raton, pp. 149-180.
- Lahnsteiner, F., Urbanyi, B., Horvath, A., Weismann, T., 2001. Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish. *Aquaculture* 195, 331-352.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. A., 1999. Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. *Fish Physiology and Biochemistry* 20, 375-388.
- Larsson, D. G. J., Mylonas, C. C., Zohar, Y., Crim, L. W., 1997. Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-a) induces multiple ovulations of high-quality eggs in a cold-water, batch-spawning teleost, the yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 1957-1964.
- Legendre, M., Billard, R., 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reproduction Nutrition Développement* 20, 1859-1868.
- Legendre, M., Otémé, Z., 1995. Effect of varying latency period on the quantity and quality of ova after hCG-induced ovulation in the African catfish, *Heterobranchus longifilis* (Teleostei, Clariidae). *Aquatic Living Resources* 8, 309-316.
- Legendre, M., Slembrouck, J., Subagja, J., Kristanto, A. H., 2000. Ovulation rate, latency period and ova viability after GnRH- or hCG-induced breeding in the Asian catfish *Pangasius hypophthalmus* (Siluriformes, Pangasiidae). *Aquatic Living Resources* 13, 145-151.
- López-Vázquez, C., Conde, M., Dopazo, C. P., Barja, J. L., Bandín, I., 2011. Susceptibility of juvenile sole *Solea senegalensis* to marine isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus from wild and farmed fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 93, 111-116.
- Luckenbach, J. A., Sullivan, C.V., 2004. Effective GnRHa dose and gamete ratio for reproduction of southern flounder, *Paralichthys lethostigma* (Jordan and Gilbert 1884). *Aquaculture Research* 35, 1482-1486.

## M

- Manchado, M., Infante, C., Asensio, E., Crespo, A., Zuasti, E., Cañavate, J. P., 2008. Molecular characterization and gene expression of six trypsinogens in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) during larval development and in tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology* 149, 334-344.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., McNiven, M. A., Richardson, G. F., 2008. Morphological characterization of Artic char, *Salvelinus alpinus*, eggs subjected to rapid post-ovulatory aging at 7 °C. *Aquaculture* 279, 204-208.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., Patzner, R. A., 2007. Distribution of lipid droplets is an indicator for egg quality in brown trout, *Salmo trutta fario*. *Aquaculture* 273, 744-747.
- Mañanós, E., Duncan, N., Mylonas, C., 2009. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. En: Cabrita, E., Robles, V., Herraéz, M. P., (Eds). *Methods in Reproductive Aquaculture. Marine and Freshwater Species*, CRC Press, Boca Raton pp. 3-80.
- Mañanós, E., Ferreira, I., Bolón, D., Guzmán, J. M., Mylonas, C. C., Riaza, A., 2007. Different responses of Senegalese sole *Solea senegalensis* broodstock to a hormonal spawning induction therapy,

- depending on their wild or captive-reared origin. Congreso Europeo de Acuicultura, Estambul, Turquía, Octubre 2007.
- Marino, G., Panini, E., Longobardi, A., Mandich, A., Finoia, M. G., Zohar, Y., Mylonas, C. C., 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Ephinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRH $\alpha$  implant. *Aquaculture* 219, 841-858.
- Martín, I., Carazo, I., Gómez, M., Rodríguez, C., Rasines, I., Duncan, N, Chereguini, O. 2011 Puestas naturales y comportamiento reproductivo en individuos salvajes y cultivados (F1/F2) de *Solea senegalensis* estabulados conjuntamente. En: Resúmenes del XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Casteldefels, Barcelona, España 2011.
- Martín I., Rodríguez C., Chereguini, O. 2007. Puestas naturales de lenguado senegalés, salvajes y cultivados (generación F1), obtenidos por manipulación del termoperiodo en Cantabria. En: Resúmenes del XI Congreso Nacional de Acuicultura. Vigo, España 2007.
- Martins, C. I. M., Castanheira, M. F., Engrola, S., Costas, B., Conceição, L. E. C., 2011. Individual differences in metabolism predict coping styles in fish. *Applied Animal Behaviour Science* 130, 135-143.
- Matsuyama, M., Adachi, S., Nagahama, Y., Matsuura, S., 1988. Diurnal rhythm of oocyte development and plasma steroid hormone levels in the female red sea bream, *Pagrus major*, during the spawning season. *Aquaculture* 73, 357-372.
- Mira, S., Madeira, C., Cabrita, E., Soares, F., Cancela, M. L., Dinis, M. T. 2010. Parental contribution of *Solea senegalensis* assessed with microsatellite markers. En: Resúmenes de Acuicultura Europe Oct 5-8, 2010. Porto, Portugal.
- Morais, S., Koven, W, Rønnestad, I., Dinis, M. T., Conceição, L. E. C., 2005. Dietary protein/lipid ratio affects growth and amino acid and fatty acid absorption and metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) larvae. *Aquaculture* 246, 347-357.
- Morehead, D. T., Pankhurst, N. W., Ritar, A. J., 1998. Effect of treatment with LHRH analogue on oocyte maturation, plasma sex steroid levels and egg production in female striped trumpeter *Latris lineata* (Latrididae). *Aquaculture* 169, 315-331.
- Mota Silva, P. I., Martins, C. I. M., Engrola, S., Marino, G., Øverli, Ø., Conceição, L. E. C., 2010. Individual differences in cortisol levels and behaviour of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles: Evidence for coping styles. *Applied Animal Behaviour Science* 124, 75-81.
- Mugnier, C., Guennoc, M., Lebegue, E., Fostier, A., Breton, B., 2000. Induction and synchronisation of spawning in cultivated turbot (*Scophthalmus maximus* L.) broodstock by implantation of a sustained-released GnRH $\alpha$  pellet. *Aquaculture* 181, 241-255.
- Mylonas, C. C., Bridges, C., Gordin, H., Belmonte, A., García, A., De la Gándara, F., Fauvel, C., Suquet, M., Medina, A., Papadaki, M., Heinisch, G., De Metrio, G., Corriero, A., Vassallo-Agius, R., Guzmán, J. M., Mañanós, E., Zohar, Y., 2007. Preparation and administration of gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH $\alpha$ ) implants for the artificial control of reproductive maturation in captive-reared Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Reviews in Fisheries Science* 15, 183-210.
- Mylonas, C. C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 165, 516-534.
- Mylonas, C. C., Hinshaw, J. M., Sullivan, C. V., 1992. GnRH $\alpha$ - induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. *Aquaculture* 106, 379-392.

## Bibliografía

---

- Mylonas, C. C., Kyriakou, Y., Sigelaki, I., Georgiou, G., Stephanou, D., Divanach, P., 2004. Reproductive biology of the shi drum (*Umbrina cirrosa*) in captivity and induction of spawning using GnRHa. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 56, 75-92.
- Mylonas, C. C., Magnus, Y., Gissis, A., Klebanov, Y., Zohar, Y., 1996. Application of controlled-released, GnRHa-delivery systems in commercial production of white bass x striped bass hybrids (sunshine bass), using captive broodstocks. *Aquaculture* 140, 265-280.
- Mylonas, C. C., Magnus, Y., Klebanov, Y., Gissis, A., Zohar, Y., 1997. Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass. *Journal of Fish Biology* 51, 234-250.
- Mylonas, C. C., Sigelaki, I., Divanach, P., Mañanós, E., Carrillo, M., Afonso-Polyviou, A., 2003. Multiple spawning and egg quality of individual European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) females after repeated injections of GnRHa. *Aquaculture* 221, 605-620.
- Mylonas, C. C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10, 463-491.
- Mylonas, C. C., Zohar, Y., 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. En: Babin, P. J., Cerdà, J., Lubzens, E. (Eds), *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*, Springer, pp. 437-474.
- Mylonas, C. C., Zohar, Y., Richardson, B. M., Minkinen, S. P., 1995. Induced spawning of wild american shad *Alosa sapidissima* using sustained administration of gonadotropin-releasing hormone analog (GnRHa). *Journal of the World Aquaculture Society* 26, 240-251.

## N

- Norambuena, F., Estévez, A., Bell, G., Carazo, I., Duncan, N., 2012. Proximate and fatty acid composition in muscle, liver and gonads of wild versus cultured broodstock of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 356-357, 176-185.
- Norambuena, F., Morais, S., Estévez, A., Bell, G., Tocher, D. R., Navarro, J. C., Cerdà, J., Duncan, N., 2013. Dietary modulation of arachidonic acid metabolism in senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstock reared in captivity. *Aquaculture* 372-375, 80-88.

## O

- Oliveira, C., Dinis, M.T., Soares, F., Cabrita, E., Pousão-Ferreira, P., Sánchez-Vázquez, F. J., 2009. Lunar and daily spawning rhythms of Senegal sole *Solea senegalensis*. *Journal of Fish Biology* 75, 61-74.
- Oliveira, C., Duncan, N. J., Pousão-Ferreira, P., Mañanós, E., Sánchez-Vázquez, F. J., 2010. Influence of the lunar cycle on plasma melatonin, vitellogenin and sex steroids rhythms in Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Aquaculture* 306, 343-347.
- Oliveira, C., Mañanós, E., Ramos, J., Sánchez-Vázquez, F. J., 2011. Impact of photoperiod manipulation on day/night changes in melatonin, sex steroids and vitellogenin plasma levels and spawning rhythms in Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 159, 291-295.
- Oliveira, C., Ortega, A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Sánchez-Vázquez, F. J., 2007. Influence of constant light and darkness, light intensity, and light spectrum on plasma melatonin rhythms in Senegal sole. *Chronobiology International* 24, 615-627.

Oliveira, C., Vera, L. M., López-Olmeda, J. F., Guzmán, J. M., Mañanós, E., Ramos, J., Sánchez-Vázquez, F. J., 2009 a. Monthly day/night changes and seasonal daily rhythms of sexual steroids in Senegal sole (*Solea senegalensis*) under natural fluctuating or controlled environmental conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 152, 168-175.

Olmedo, M., Peleteiro, J. B., Cal, R., Linares, F. 2003. Crecimiento de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858) en Galicia. En: Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, Mayo 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, España, pp., 383-385.

Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Hirose, K., 1996. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17, 20 $\beta$ -dihidroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 139, 291-301.

## P

Pankhurst, N. W., Fitzgibbon, Q. P., 2006. Characteristics of spawning behaviour in cultured greenback flounder *Rhombosolea tapirina*. *Aquaculture* 253, 279-289.

Papanikos, N., Phelps, R. P., Williams, K., Ferry, A., Maus, D., 2003. Egg and larval quality of natural and induced spawns of red snapper, *Lutjanus campechanus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 487-488.

Peter, R.E., 1981. Gonadotropin secretion during reproductive cycles in teleosts: Influences of environmental factors. *General and Comparative Endocrinology* 45, 294-305.

Peter, R.E., Paulencu, C.R., Breton, B., 1982. Temporal responsiveness of the ovary of goldfish to gonadotropin. *Journal of Interdisciplinary Cycle Research* 13, 229-239

Phelps, R. P., Haste, R., Pendetar, A., Linley, L., Papanikos, N., Dunham, R. A., 2007. Effects of temperature on the induced spawning of channel catfish and the production of channel x blue catfish hybrid fry. *Aquaculture* 273, 80-86.

Pinto, W., Aragão, C., Soares, F., Dinis, M. T., Conceição, L. E. C., 2007. Growth, stress response and free amino acid levels in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) chronically exposed to exogenous ammonia. *Aquaculture Research* 38, 1198-1204.

Porta, J., Porta, J. M., Martínez-Rodríguez, G., Alvarez, M. C., 2006. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture* 251, 46-55.

## R

Rema, P., Conceição, L. E. C., Evers, F., Castro-Cunha, M., Dinis, M. T., Dias, J., 2008. Optimal dietary protein levels in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Nutrition* 14, 263-269.

Ribeiro, L., Engrola, S., Dinis, M. T., 2005. Weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) postlarvae to an inert diet with a co-feeding regime. *Ciencias Marinas* 31, 327-337.

Ribeiro, A. R. A., Ribeiro, L., Sæle, Ø., Hamre, K., Dinis, M. T., Moren, M., 2011. Iodine-enriched rotifers and *Artemia* prevent goitre in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in a recirculation system. *Aquaculture Nutrition* 17, 248-257.

- Ribeiro, L., Sarasquete, C., Dinis, M. T., 1999 a. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture* 171, 293-308.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C., Dinis, M. T., 1999 b. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 179, 465-473.
- Rodríguez, R. B., 1984. Biología y cultivo de *Solea senegalensis* Kaup 1858 en el Golfo de Cádiz. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, España, 207pp.
- Rodríguez, J. L.; Souto, B. F., 2003. Engorde de lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) en Galicia con temperatura controlada. En: Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, Mayo 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, España, pp., 407-409.
- Rodríguez, J. L., Souto, B. F. 2004. Growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup, 1868) under a controlled temperature and with automatically supplied feeding. *European Aquaculture Society Special Publication* 34, 687-668.
- Rottmann, R. W., Shireman, J. V., 1985. The use of synthetic LH-RH analogue to spawn Chinese carps. *Aquaculture and Fisheries Management* 1, 1-6.
- Ruane, N. M., Makridis, P., Balm, P. H. M., Dinis, M. T., 2005. Skin darkness is related to cortisol, but not MSH, content in post-larval *Solea senegalensis*. *Journal of Fish Biology* 67, 555-581.
- Russel F. S., 1976. The eggs and planktonic stages of British marine fishes. *Academic Press Lond* pp., 40.

## S

- Sáenz de Rodrigáñez, M., de Oña, C., Alarcón, F. J., Martínez, M. I., Díaz, M., Moyano, F. J., 2005. Crecimiento y enzimas digestivas de larvas de *Solea senegalensis* Kaup, 1858 alimentadas con piensos comerciales. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 21, 105-113.
- Sahoo, S. K., Giri, S. S., Chandra, S., 2008. Effects of latency periods and injection doses with carp pituitary extract on spawning performance and egg quality of Asian Catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). *Journal of Applied Aquaculture* 20, 295-303.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J. V., Infante, C., Cañavate, J. P., Manchado, M., 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potencial effects on the immune response. *Fish and Shellfish Immunology* 28, 296-302.
- Sato, Y., Fenerich-Verani, N., Verani, J. R., Vieira, L. J. S., Godinho, H. P., 2000. Induced reproductive responses of the neotropical anostomid fish *Leporinus elongatus* Val. under captive breeding. *Aquaculture Research* 31, 189-193.
- Silva, A., 2010. Culture of Chilean flounder. En: *Practical Flatfish Culture and Stock Enhancement*. Daniels, H. V., Watanabe, W. O., (Eds). Wiley - Blackwell. Singapore 2010. pp., 30-45.
- Silva, J. M. G., Espe, M., Conceição, L. E. C., Dias, J., Valente, L. M. P., 2009. Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) grow equally well on diets devoid of fish meal provided the dietary amino acids are balanced. *Aquaculture* 296, 309-317.
- De Silva, S. S., Nguyen, T. T. T., Ingram, B. A., 2008. Fish reproduction in relation to aquaculture. En: *Fish Reproduction*. Rocha, M. J., Arukwe, A., Kapoor, B. G., (Eds). Science Publishers. Enfield, NH, USA. 2008. pp., 535-575.

- Soares, F., Engrola, S., Dinis, M. T., 2001. Anomalías en la pigmentación de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*). AquaTIC 13.
- Springate, J. R. C., Bromage, N. R., Elliott, J. A. K., Hudson, D. L., 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eying, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Aquaculture 43, 313-322.
- Statova, N. P., Talikina, M. G., Kalinich, R. A., 1982. Physiological-chemical characteristics of the eggs of common carp, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae), under conditions of fish farming. Journal of Ichthyology 22, 117-127.
- Suquet, M., Billard, R., Cosson, J., Normant, Y., Fauvel, C., 1995. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. Aquaculture 133, 83-90.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., Billard, R., 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. Aquaculture Research 31, 231-243.
- Suzuki, R., 1983. Multiple spawning of the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, Aquaculture 31, 233-243.

## T

- Takushima, M., Nozaki, R., Kadomura, K., Yasumoto, S., Soyano, K., 2003. Induced ovulation using LHRHa and artificial fertilization in devil stinger, *Inimicus japonicus*. Fish Physiology and Biochemistry 28, 521-522.

## U

- Urbányi, B., Horváth, Á., Bokor, Z., 2009. Artificial fertilization in Aquaculture species: from normal practice to chromosome manipulation. En: Cabrita, E., Robles, V., Herraez, M. P. (Eds.), Methods in reproductive aquaculture. Marine and Freshwater Species pp., 183-216.

## V

- Valdebenito, I., 2008. Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. Archivos de Medicina Veterinaria 40, 115-123.
- Van der Kraak, G., Pankhurst, N. W., 1996. Temperature effects on the reproductive performance of fish, En: Wood, C. M., McDonald, D. G., (Eds.), Global Warming: Implications for freshwater and Marine Fish. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 159-176.
- Vázquez, R., Álvarez, A., Aragón, A., García de Lara, M., Mazonra, M. T., Rendón, M. C., González de Canales, M. L. 2003. Engorde de juveniles de lenguado *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) utilizando condiciones especiales de cautividad. En: Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, Mayo 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, España. 2003
- Vera, L. M., De Oliveira, C., López-Olmeda, J. F., Ramos, J., Mañanos, E., Madrid, J. A., Sánchez-Vázquez, F. J., 2007. Seasonal and daily plasma melatonin rhythms and reproduction in Senegal sole kept under natural photoperiod and natural or controlled water temperature. Journal of Pineal Research 43, 50-55.

## Bibliografía

---

- Verdura, S., Chauvigné, F., Mazón, M. J., Zanuy, S., Gómez, A., Cerdà, J. 2011. Producción de gonadotropinas recombinantes de lenguado Senegalés (*Solea senegalensis*) para el control de la reproducción. En: Resúmenes del XIII Congreso Nacional de Acuicultura, 21-24 Noviembre de 2011. Casteldefels, Barcelona, España.
- Vermeirssen, E. L. M., Mazorra de Quero, C., Shields, R. J., Norberg, B., Kime, D. E., Scott, A. P., 2004. Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotrophin-releasing hormone agonist implant. *Aquaculture* 230, 547-567.
- Villalta, M. y Estévez, A., 2005. Culture of Senegal sole larvae without the need for rotifers. *Aquaculture International* 13, 469-478.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M. P., 2005 a. Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture* 245, 193-209.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M. P., Bell, J. G., 2005 b. The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture* 249, 353-365.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M. P., Bell, J. G., 2008 a. Arachidonic acid, arachidonic / eicosapentaenoic acid ratio, stearidonic acid and eicosanoids are involved in dietary-induced albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Nutrition* 14, 120-128.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M. P., Bell, J. G., 2008 b. Effects of dietary eicosapentaenoic acid on growth, survival, pigmentation and fatty acid composition in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture Nutrition* 14, 232-241.

## Y

- Yúfera, M., Darías, M. J., 2007. Changes in the gastrointestinal pH from larvae to adult in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 267, 94-99.

## Z

- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey, 718 pp.
- Zohar, Y., 1988. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in Teleosts: basic and applied considerations. En: Zohar, Y., Breton, B. (Eds.), *Reproduction in Fish: Basic and applied aspects in endocrinology and genetics*. INRA, Paris, Les Colloques de l'INRA 44, 47-62.



## ABREVIATURAS

**ANOVA:** Análisis de la varianza

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**CV:** Coeficiente de variación

**DA:** Dopamina

**DMSO:** Dimetil sulfóxido

**DDE:** Día después de eclosión

**E<sub>2</sub>:** Estrógeno

**FA:** Fecundación artificial.

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**FSH:** Hormona Folículo estimulante

**FRP:** Fecundidad relativa parcial

**FRG:** Fecundidad relativa global

**F1:** Ejemplares de cultivo de primera generación

**F2:** Ejemplares de cultivo de segunda generación

**GnRH<sub>a</sub>:** Análogos sintéticos de la hormona liberadora de gonadotropinas

**GtH:** Gonadotropina

**hCG:** Gonadotropina coriónica humana

**Hpo:** Horas post ovulación

**IEO:** Instituto Español de Oceanografía

**IFAPA:** Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera

**IG:** Índice gonadosomático

**K:** Factor de condición

**11-KT:** 11-Ketotestosterona

**LHRHa:** Análogos sintéticos de la hormona liberadora de la LH

**LH:** Hormona luteinizante

**PC:** Peso corporal

**ESM:** Error estándar de la media

**SGR:** Tasa de crecimiento específica.

**T:** Testosterona

## **DEFINICIONES**

**Fecundidad relativa por puesta:** Número de huevos por kg de hembra obtenidos después de realizar un masaje abdominal.

**Fecundidad relativa parcial:** Número de huevos por kg de hembra obtenidos después de una sola inyección de hormona. Pueden haberse realizado uno o más masajes abdominales.

**Fecundidad relativa global:** Número de huevos por kg de hembra obtenidos después de un tratamiento compuesto por varias inyecciones hormonales o un implante de liberación sostenida.

**Huevo:** Célula germinal femenina madura.

**Índice gonadosomático:** Relación en porcentaje del peso de las gónadas y el peso del cuerpo.

**Momento de la ovulación:** Momento en el que se detecta la ovulación al poder extraer huevos por masaje abdominal con facilidad.

**Ovocito:** Célula que se desarrolla en un huevo.

**Puesta:** En esta tesis el término puesta se refiere al lote de huevos que se pueden extraer por masaje abdominal de una hembra después de la inducción hormonal a la ovulación. Por el contrario el término “puesta en tanque” o “puesta espontánea” se refiere a los huevos que la hembra libera sin realizar masaje abdominal. En este caso, si no se ha realizado inducción hormonal hablaremos de “puesta natural”.

**Sobremaduración:** Deterioro de los huevos retenidos dentro del cuerpo de la hembra después de la ovulación (*in vivo*) o después del masaje abdominal (*in vitro*).

**Tiempo de ovulación:** Tiempo, medido en horas, transcurrido entre la administración del tratamiento hormonal y la ovulación.

## FÓRMULAS

**Coefficiente de variación:** desviación estándar x 100/ media

**Factor de condición:**  $\text{Peso} \times 100 / \text{Longitud}^3$

**Tasa de viabilidad aparente:** Número de huevos transparentes, esféricos, sin espacio perivitelino y con las gotas de grasa repartidas por todo el huevo x 100 / Número de huevos observados

**Tasa de crecimiento específica:**  $(\text{Ln } P_2 - \text{Ln } P_1) \times 100 / (t_2 - t_1)$

**Tasa de fecundación:** Número de huevos con blastómeros x 100 / Número total de huevos observados

**Tasa de eclosión:** Número de larvas x 100 / Número total de huevos incubados



**LISTADO DE ESPECIES**

Denominación científica de las especies que se citan en el texto y nombres comunes en castellano de cada especie según la denominación de la FAO ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre común</b>
<i>Acipenser sturio</i>	Esturión
<i>Acipenser transmontanus</i>	Esturión blanco
<i>Alosa sapidissima</i>	Sábalo americano
<i>Anguilla anguilla</i>	Anguila europea
<i>Anguilla japonica</i>	Anguila japonesa
<i>Argyrosomus regius</i>	Corvina
<i>Carassius auratus</i>	Pez rojo
<i>Clarias batrachus</i>	
<i>Clarias lazera=Clarias gariepinus</i>	Pez-gato
<i>Centropristis striata</i>	
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa común
<i>Dentex dentex</i>	Dentón
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Lubina
<i>Epinephelus marginatus</i>	Mero moreno
<i>Gadus morhua</i>	Bacalao
<i>Heterobranchus longifilis</i>	
<i>Heteropneustes fossilis</i>	
<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Platija canadiense
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Halibut
<i>Ictalurus punctatus</i>	Bagre de canal

Anexo II: Listado de especies

Nombre científico	Nombre común
<i>Inimicus japonicus</i>	Pez piedra japonés
<i>Lates calcarifer</i>	
<i>Latris lineata</i>	Trompetero australiano
<i>Limanda ferruginea</i>	Platija amarilla
<i>Limanda yokahamae</i>	
<i>Merluccius merluccius</i>	Merluza
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Misgurno de Asia
<i>Morone chrysops</i>	
<i>Morone saxatilis</i>	Lubina estriada
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Salmón plateado
<i>Oncorhynchus mykiss =Salmo gairdneri</i>	Trucha arco iris
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Salmón real
<i>Pagellus bogaraveo</i>	Besugo
<i>Pagrus major</i>	Dorada del Japón
<i>Pagrus auratus= Sparus aurata</i>	Dorada
<i>Paralichthys adspersus</i>	Lenguado fino
<i>Paralichthys californicus</i>	Lenguado de California
<i>Paralichthys lethostigma</i>	Lenguado de Florida
<i>Paralichthys dentatus</i>	Falso halibut de Canadá
<i>Paralichthys orbinyanus</i>	Lenguado brasileño
<i>Pangasius hypophthalmus</i>	Panga
<i>Platichthys stellatus</i>	
<i>Plecoglossus altivelis</i>	Ayu
<i>Pleuronectes ferrugineus</i>	Platija amarilla,
<i>Pleuronectes platesa</i>	Platija

Anexo II: Listado de especies

Nombre científico	Nombre común
<i>Prochilodus platensis</i>	Sábalo rayado
<i>Psetta maxima = Scophthalmus maximus</i>	Rodaballo
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Solla roja
<i>Rhombosolea tapirina</i>	
<i>Salvelinus alpinus</i>	Trucha alpina
<i>Salmo trutta lacustris</i>	
<i>Seriola spp.</i>	Pez limón
<i>Solea lascaris</i>	Lenguado de arena
<i>Solea solea</i>	Lenguado común
<i>Sparus aurata</i>	Dorada
<i>Thunnus thynnus</i>	Atún rojo
<i>Tilapia spp.</i>	Tilapias
<i>Tinca tinca</i>	Tenca
<i>Umbrina cirrosa</i>	Verrugato fusco