

## TESIS DOCTORALES. INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA

Publicación científica de periodicidad no regular destinada a la edición de tesis doctorales realizadas por investigadores del Instituto Español de Oceanografía sobre Ciencias Marinas. Las tesis se publican tal como han sido presentadas en las universidades.

*An aperiodical scientific publication, whose purposes is to publish doctoral theses regarding the marine sciences by researchers from the Instituto Español de Oceanografía. These theses are published just as they were presented at university.*

Para información sobre publicación de originales, suscripciones, intercambios y solicitud de ejemplares, por favor, dirigirse a (*For information regarding publications of papers, subscriptions, exchange of issues and back issues please contact*):

### INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA

Avda. de Brasil, 31. 28020 Madrid, España. Tel.: 91-417 54 11. Fax: 91-597 47 70

E-mail: [publicaciones@md.ieo.es](mailto:publicaciones@md.ieo.es)

Dirección en Internet (*Website*): <http://www.ieo.es>

La responsabilidad por las opiniones emitidas en esta publicación corresponde exclusivamente al autor (*The opinions expressed herein are those of the author*).

Título abreviado de esta publicación (*Running title*): Tesis Dr. Inst. Esp. Oceanogr.

### COORDINACIÓN EDITORIAL (*EDITOR*)

**Concha Mosquera de Arancibia**

### CONSEJO ASESOR (*ADVISORY BOARD*)

**Javier Pereiro Muñoz.** Subdirector General de Investigación. Presidente del Consejo Asesor

**Juan Acosta Yepes.** Consejero Técnico de Investigación y Tecnología. Secretario del Consejo Asesor

**Argeo Rodríguez de León.** Jefe de Área de Medio Marino y Protección Ambiental

**Ignacio Arnal Atarés.** Jefe de Área de Acuicultura

**Pilar Pereda Pérez.** Jefa de Área de Pesquerías

### Derechos de autor (*Copyright*)

Mediante el envío del original, el autor o autores aceptan que los derechos (*copyright*) de su artículo sean transferidos al organismo editor de **TESIS DOCTORALES**, si el artículo es aceptado para su publicación, siendo esta transferencia de derechos efectiva desde el momento de dicha aceptación.

El copyright abarca los derechos exclusivos para reproducir y distribuir el artículo, incluyendo separatas, reimpresiones, reproducciones fotográficas o fotostáticas, microformatos, microfilmaciones o cualquier otra reproducción de naturaleza similar, así como traducciones.

La reproducción fotográfica, microfilmada o cualquier otra reproducción del texto, figuras, tablas, etc. de esta publicación está prohibida sin permiso expreso del organismo editor de **TESIS DOCTORALES**, dicho permiso, en cuanto a derechos, no será extensivo a la reproducción para distribución general, para su divulgación o para venta, salvo que así sea expresado por escrito en el permiso de autorización.

El uso de términos descriptivos en general, citando nombres comerciales o marcas registradas, no significa que se posean derechos sobre los mismos, los cuales están protegidos por las leyes vigentes. Tampoco significa que el editor respalde o promocione dichas firmas o marcas, sino que simplemente se citan por los autores a título meramente informativo.

*By submitting a paper, the author or authors accept transferral of the article's copyright to the publisher of TESIS DOCTORALES, if the article is accepted. This copyright transfer is effective from the moment of this acceptance.*

*The copyright comprises exclusive rights for the paper's reproduction and distribution, including: offprints, reprints, photographic or photostatic reproductions, microformats, microfilm or any other similar reproduction, as well as translations.*

*Reproduction by photocopying, microfilm, or any other method of the text, figures, tables, etc. of this publication is prohibited without the express permission of the publisher of TESIS DOCTORALES. This permission, as far as the copyright is concerned, will not extend to reproduction for general distribution or sale, unless so specified in the authorization permit.*

*The use of general descriptive terms citing brand names or trademarks does not indicate any ownership of rights regarding them, which is covered by the applicable laws. Use of such terms does not imply that the editor endorses or promotes these companies or brands; the authors cite them for merely informative purposes.*



Edita (*Published by*): INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA

© Instituto Español de Oceanografía 2007

Depósito Legal: M-5523-2008

ISSN: 1578-410X

NIPO: 656-07-012-7

Diseño de cubierta (*Cover design*): Omega. Ramón Azorín, 2. E-28047 Madrid, España

Imprime (*Printed by*): Microdata Micrografía e Informática, S.A. Nicolás Morales, 17. E-28019 Madrid, España

# TESIS DOCTORALES

INSTITUTO ESPAÑOL  
DE OCEANOGRAFÍA

Contribución a la gestión  
y conservación de gametos  
de rodaballo  
*Scophthalmus maximus*  
(Linnaeus, 1758)

María del Olvido Chereguini Fernández-Maqueira

Centro Oceanográfico de Santander  
INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA  
Planta de Cultivos Marinos El Bocal. Barrio Corbanera, s/n  
E-39012 Santander (Cantabria), España  
Correo electrónico: o.chereguini@st.ieo.es

*Recibido en octubre de 2006. Aceptado en enero de 2007*



Edita (Published by): INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA  
Avda. de Brasil, 31. E-28020 Madrid, España

ISSN: 1578-410X

Núm. 24

Págs. 117

Madrid, España 2007



**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**



**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE CAMINOS, CANALES Y  
PUERTOS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TÉCNICAS DEL AGUA Y MEDIO  
AMBIENTE**

**TESIS DOCTORAL**

**CONTRIBUCIÓN A LA GESTIÓN Y CONSERVACIÓN DE GAMETOS DE  
RODABALLO (*Scophthalmus maximus* Linneaus, 1758)**

**M<sup>a</sup> DEL OLVIDO CHEREGUINI FERNÁNDEZ- MAQUIEIRA**

**DIRECTORES:**

**JUAN CARLOS CANTERAS**

**JOSÉ BENITO PELETEIRO**

**SANTANDER, 2003**

---



Gran parte de los trabajos presentados en esta memoria, se han realizado dentro de los Proyectos de Investigación: Gestión y conservación de esperma y embriones de peces marinos cultivables (IEO 94-96, Ref: 619), Estudio sobre el crecimiento y supervivencia de larvas y alevines producidos con esperma crioconservado (IEO 96-97, Ref: 634), Caracterización de la idoneidad del esperma de peces para su crioconservación (Ministerio de Educación y Ciencia, Acciones integradas Hispano-Francésas 1994 y 1995, Ref: HF93-001 y HF94-312) y Aplicación y desarrollo de tecnologías para la conservación de gametos y embriones en piscicultura (Ministerio de Educación y Cultura, Fondos Feder 99-2001, Ref: 1FD 1997-0521-C02-01).

---



## AGRADECIMIENTOS

A Juan Carlos Canteras por su dirección y apoyo en la elaboración de esta memoria.

A José Benito Peleteiro por su dirección y su apoyo incondicional desde el comienzo de esta memoria cuando la crioconservación en la acuicultura marina era “algo novedoso” y por su firme creencia de la finalidad de esta memoria, pero sobre todo por su amistad.

Al equipo de la Planta de Cultivos del Bocal del Centro Oceanográfico de Santander por haberme ayudado, animado y soportado durante los años de mi tesis, en especial a Inés García de la Banda. Una mención especial a mi amiga, ayudante y actualmente colega Inma Rasines por su ayuda inestimable en el desarrollo de todos los trabajos, siempre colaborando y animándome en todo momento. A los becarios Angel Fernández, Susana Polo y al contratado del proyecto Feder Marcelino Herrera por su ayuda en los diferentes trabajos realizados. A Javier Revilla por su “talento artístico” en la elaboración de los dibujos. Por último, a todo el personal de apoyo técnico y mantenimiento de la Planta por su disponibilidad y ayuda en el manejo de los reproductores de rodaballo durante estos años, gracias por echarme esa mano.

Al Instituto Español de Oceanografía por el apoyo y los medios que ha puesto a mi disposición para poder realizar esta memoria.

A toda mi familia, amigos y compañeros que siempre me animaron y creyeron en mí.

---



A mis padres

A Carlos

A María y Carlos

---



## Contenidos

<b>Resumen y palabras clave</b>	10
<i>Abstract and keywords</i>	11
<b>1. Introducción</b>	12
<b>1.1 Especie objeto del estudio. El rodaballo</b>	13
<b>1.1.1 Sistemática y biología</b>	13
<b>1.1.2 Cultivo del rodaballo</b>	14
<b>1.2 Antecedentes sobre la gestión y la conservación de gametos</b>	16
<b>1.2.1 Gestión de reproductores de rodaballo</b>	16
<b>1.2.1.1 Fecundación artificial</b>	19
<b>1.2.2 Conservación de gametos</b>	19
<b>1.2.2.1 Conservación de esperma a corto plazo o preservación</b>	20
<b>1.2.2.2 Conservación de esperma a largo plazo o crioconservación</b>	21
<b>1.2.2.2.1 Calidad del esperma</b>	21
<b>1.2.2.2.2 Diluyente</b>	22
<b>1.2.2.2.3 Crioprotector</b>	23
<b>1.2.2.2.4 Dilución</b>	24
<b>1.2.2.2.5 Tiempo de equilibración</b>	24
<b>1.2.2.2.6 Velocidad de congelación y descongelación</b>	24
<b>1.2.2.2.7 Métodos de almacenaje</b>	25
<b>1.2.2.3 Conservación de huevos a corto plazo</b>	27
<b>1.3 Objetivos</b>	28
<b>1.4 Justificación</b>	29
<b>1.5 Artículos que han originado la memoria presentada</b>	29
<b>2. Metodología</b>	31
<b>2.1 Material biológico</b>	32
<b>2.1.1 Estabulación de reproductores</b>	34
<b>2.1.2 Control de la maduración</b>	35
<b>2.1.3 Obtención de huevos</b>	35
<b>2.1.4 Obtención de esperma</b>	35
<b>2.1.5 Valoración de la calidad de gametos</b>	36



<b>2.2 Diseños experimentales</b>	38
<b>2.2.1 Fecundación artificial</b>	38
<b>2.2.1.1 Métodos de fecundación artificial</b>	38
<b>2.2.1.2 Determinación de la relación óptima esperma-huevo según el método de fecundación</b>	39
<b>2.2.2 Conservación de esperma a corto plazo o preservación</b>	40
<b>2.2.2.1 Estudio de factores implicados en la conservación de esperma a corto plazo</b>	40
<b>2.2.2.2 Puesta a punto del método de conservación o preservación</b>	42
<b>2.2.2.3 Tasas de fecundación y eclosión utilizando el método de conservación o preservación</b>	43
<b>2.2.3 Conservación de esperma a largo plazo o crioconservación</b>	44
<b>2.2.3.1 Estudio de factores implicados en la conservación a largo plazo de esperma para puesta a punto de la técnica</b>	44
<b>2.2.3.1.1 Diluyente y crioprotector</b>	45
<b>2.2.3.1.2 Dilución</b>	46
<b>2.2.3.1.3 Tipo de contenedor</b>	47
<b>2.2.3.2 Tasas de fecundación y de eclosión de huevos utilizando el método de crioconservación</b>	48
<b>2.2.4 Evaluación del crecimiento de larvas obtenidas con esperma crioconservado</b>	49
<b>2.2.4.1 Fecundaciones artificiales con esperma fresco y crioconservado del mismo macho</b>	50
<b>2.2.4.2 Cultivo larvario de rodaballo producido con esperma fresco y crioconservado</b>	50
<b>2.2.5 Evaluación de la supervivencia y crecimiento de alevines producidos con esperma crioconservado</b>	51
<b>2.2.6 Conservación de huevos a corto plazo</b>	51
<b>2.2.6.1 Estudio de diferentes parámetros que afectan la conservación de los huevos y de la capacidad a ser fecundados</b>	51
<b>2.3 Análisis estadísticos</b>	53
<b>3. Resultados</b>	55
<b>3.1 Fecundación artificial</b>	56
<b>3.1.1 Métodos de fecundación artificial</b>	56
<b>3.1.2 Determinación de la relación óptima esperma-huevo según el método de fecundación</b>	56
<b>3.2 Conservación de esperma a corto plazo o preservación</b>	59



<b>3.2.1</b> Estudio de factores implicados en la conservación de esperma a corto plazo	59
<b>3.2.2</b> Puesta a punto del método de conservación o preservación	62
<b>3.2.3</b> Tasas de fecundación y eclosión obtenidas utilizando el método de conservación o preservación de esperma	63
<b>3.3</b> Conservación de esperma a largo plazo o crioconservación	64
<b>3.3.1</b> Estudio de los factores implicados en la conservación a largo plazo de esperma para la puesta a punto de la técnica	64
<b>3.3.2</b> Tasas de fecundación y de eclosión obtenidas utilizando el método de crioconservación de esperma	67
<b>3.4</b> Evaluación del crecimiento de larvas obtenidas con esperma crioconservado	68
<b>3.4.1</b> Fecundaciones artificiales realizadas con esperma fresco y crioconservado del mismo macho	68
<b>3.4.2</b> Cultivo larvario de rodaballo producidos con esperma fresco y crioconservado	70
<b>3.5</b> Evaluación de la supervivencia y crecimiento de alevines producidos con esperma crioconservado	75
<b>3.6</b> Conservación de huevos a corto plazo	78
<b>4.</b> Discusión	85
<b>4.1</b> Fecundación artificial	86
<b>4.2</b> Conservación de esperma a corto plazo	87
<b>4.3</b> Conservación de esperma a largo plazo	89
<b>4.4</b> Evaluación del crecimiento de larvas obtenidas con esperma crioconservado	91
<b>4.5</b> Evaluación de la supervivencia y crecimiento de alevines producidos con esperma crioconservado	92
<b>4.6</b> Conservación de huevos a corto plazo	92
<b>5.</b> Conclusiones	95
<b>6.</b> Bibliografía	98



## Resumen y palabras clave

El propósito de esta memoria es contribuir a la mejora en la gestión de la reproducción y el perfeccionamiento en la conservación de gametos de rodaballo *Scophthalmus maximus* (L, 1758).

La demanda por parte del sector productor de rodaballo de un control más riguroso de la reproducción y una gestión genética más conveniente de cara al incremento de la producción es manifiesta. En la gestión de reproductores se aprecia una variabilidad considerable en las tasas de fecundación, que puede ser atribuible a la calidad de los gametos o a la eficacia del método de fecundación. Por otro lado, la evolución del cultivo de esta especie requiere métodos que prolonguen la viabilidad de los gametos de alta calidad. Estas circunstancias han motivado que el Consejo Internacional para la Exploración del Mar (CIEM), en el ámbito de la acuicultura y siguiendo las líneas prioritarias del proyecto Programa Marco, recomiende el desarrollo de la investigación sobre la calidad de gametos, la optimización de métodos y el desarrollo de técnicas que permitan prolongar en el tiempo la viabilidad de gametos de alta calidad.

A tenor de estas prioridades, el objetivo de esta tesis ha sido orientar en la optimización de la gestión de los *stocks* de reproductores en el cultivo de rodaballo para facilitar la determinación del método idóneo de fecundación artificial y el logro de la conservación de los gametos a corto y largo plazo, todo ello con el propósito de ir aproximando al rendimiento máximo los resultados de las explotaciones industriales. Adicionalmente, se ha realizado la evaluación del crecimiento de larvas y alevines producidos con gametos conservados para así poder garantizar al sector la fiabilidad de las técnicas desarrolladas.

**Palabras clave:** Rodaballo, fecundación artificial, esperma, huevos, preservación, crioconservación, larva, alevín.



## Abstract and keywords

### Contribution to the management and conservation of gametes of the turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758)

The turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758) farming industry demands greater control over fish reproduction and genetic management in order to raise production levels. In reproductive management, there is a huge variation in fertility rates, which could be due to the quality of the gametes or the different fertilization methods currently in use. Moreover, the improvement of the species requires methods able to prolong the viability of high-quality gametes. Given this scenario, in the area of aquaculture, the International Council for the Exploration of the Sea (ICES), and the priority guidelines of the Framework Programme recommend studies on gamete quality, optimization of methods, and the development of techniques which would make it possible to prolong the viability of high-quality gametes over time.

Following these priorities, the aim of this thesis has been to optimise reproductive stock management in turbot farming, in order to determine the most appropriate method for artificial fertilization and short- and long-term conservation of gametes, with the aim of obtaining maximum productivity in industrial settings. Furthermore, an assessment was made of the growth of larvae and fry produced with conserved gametes, in order to confirm the feasibility of these techniques in the turbot farming industry.

**Keywords:** Turbot, artificial fertilization, sperm, eggs, preservation, cryoconservation, larvae, fry.



## 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 ESPECIE OBJETO DEL ESTUDIO. EL RODABALLO

### 1.1.1 Sistemática y Biología

El rodaballo es un pez Teleósteo que pertenece al Orden Pleuronectiformes y a la Familia Scophthalmidae. Se incluye dentro de la denominación común de peces planos debido a que su carácter bentónico les hace sufrir una metamorfosis peculiar durante las primeras fases pelágicas de su vida: la emigración del ojo derecho al otro lado del cuerpo y el aplanamiento del lado del cuerpo que está en contacto con el fondo. La cara que posee los dos ojos está pigmentada mientras que la cara oculta es blanca.

El área de distribución del rodaballo es en la zona Atlántica nordeste desde Noruega hasta Marruecos, incluyendo el Mar del Norte, el Mar Báltico y las aguas que rodean Gran Bretaña, así como el Mediterráneo. En el Cantábrico existen dos especies del género *Scophthalmus*: el *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758) también denominado *Psetta maxima* y el *Scophthalmus rhombus* (Linnaeus, 1758), muy parecidos en su aspecto pero que se diferencian principalmente por la presencia o no de tubérculos óseos en la piel.

El rodaballo *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758) se caracteriza por tener el cuerpo redondeado y la piel sin escamas, pero con tubérculos óseos distribuidos por la parte del cuerpo pigmentada principalmente por la cabeza. Los ojos están situados en el lado izquierdo de la cabeza al mismo nivel o el inferior un poco avanzado. La boca es grande y oblicua, la parte anterior de la mandíbula inferior se adelanta al de la mandíbula superior. Los radios de la aleta dorsal son poco ramificados, y están unidos por la membrana, comienzan por encima del ojo superior y van aumentando gradualmente hasta la parte media del cuerpo, y después disminuyen también gradualmente hasta los extremos. La aleta anal es semejante a la dorsal. Las aletas caudal y anal terminan en la base del pedúnculo caudal. La aleta caudal es redondeada. La aleta pectoral de la cara con ojos es más grande que la de la cara oculta o ciega.

El color del lado pigmentado del cuerpo es muy variable debido a su extraordinario mimetismo para adaptarse al fondo en donde vive. Frecuentemente es de color marrón grisáceo, más o menos oscuro, con pequeñas manchas distribuidas por todo el cuerpo. La parte del cuerpo oculta o ciega es de color blanquecino.

Es un pez bentónico adaptado a la vida del fondo, que frecuenta principalmente sustratos de arena, grava y piedra, y a veces se encuentra en fondos de fango. Los ejemplares jóvenes se encuentran cerca de la costa, alejándose progresivamente según crecen hasta situarse a unos 10 metros de profundidad. Los ejemplares maduros de 4-6 años se encuentran a 20-50 metros y los de 6-7 años a 100 metros o más de profundidad. Su longevidad es notable, se han registrado machos de 17 años y hembras de 27 años (Fischer *et al.*, 1987).

La alimentación consiste principalmente en otros peces tales como sardina, anchoa y gádidos comunes, raramente se han encontrado en su estómago invertebrados como moluscos bivalvos, crustáceos y poliquetos. En ejemplares cultivados y liberados al

---

mar en Galicia, se ha encontrado que el 80% de la dieta de ejemplares recapturados estaba constituida por la especie vulgarmente llamada bolo *Ammodites tobianus* (Iglesias & Rodríguez-Ojea, 1994).

La puesta tiene lugar entre abril y agosto en condiciones naturales, con variaciones según la latitud (Jones, 1974), y a profundidades que varían de 10-40 metros. El número de huevos es de 5 a 10 millones por hembra, en función del tamaño de la hembra. Los huevos son pelágicos y miden aproximadamente 1 mm de diámetro. La eclosión de los huevos, dependiendo de la temperatura se produce a los 5 –9 días, y dan lugar a larvas también pelágicas que miden 3 mm.

La dieta de las larvas, tras la reabsorción del saco vitelino, consiste en copépodos calanoides, euphasiáceos, larvas de balanus y de moluscos gasterópodos. A los 20-25 días de edad tiene lugar la metamorfosis, comienzan a reabsorber la vejiga natatoria e inician su vida bentónica, estableciéndose en las zonas arenosas del fondo donde comienza el preengorde. Durante los primeros meses de vida los alevines ingieren anfipodos y misidiáceos, y a medida que van creciendo consumen presas de mayor tamaño: peces y crustáceos. El crecimiento es rápido durante el verano, disminuye en el invierno y vuelve a aumentar en la primavera siguiente.

El crecimiento durante los 3 ó 4 primeros años es semejante en ambos sexos, posteriormente las hembras crecen más rápidamente que los machos.

### 1.1.2 Cultivo del rodaballo

A pesar de que a principios del siglo XX se consiguió la obtención de huevos fecundados y larvas de ejemplares de rodaballo en cautividad (Anthony, 1910), el interés por el cultivo de esta especie con fines industriales no comenzó hasta la década de los años sesenta, tras los resultados de engorde obtenidos con alevines salvajes de rodaballo que mostraron un rápido crecimiento y resistencia a la cautividad (Jones, 1970, 1972 b, 1973, 1974; Purdom *et al.*, 1972). A partir de los años setenta, en los laboratorios de Lowestoft (Jones, 1972 a, b, 1973) y Port Erin (Alderson & Bromley, 1973) en Gran Bretaña, y en el Centre Oceanologique de Bretagne (Girin, 1972, 1974) en Francia, aplicaron técnicas de cultivo larvario ya conocidas para otras especies que permitieron la obtención de larvas que habían superado la metamorfosis. La alimentación de las larvas consistió en suministrar en los primeros días el rotífero *Brachionus plicatilis* y posteriormente nauplios de Artemia. A partir de entonces las primeras investigaciones se dirigieron a aumentar la supervivencia larvaria, mejorando la calidad nutricional de las presas añadiendo fitoplancton en el medio de cultivo y estudiando diferentes factores que podían influir como temperatura, intensidad de luz, tipo de tanques, tamaño y densidad de presa ( Alderson & Bromley, 1973; Howell, 1973, 1979; Jones *et al.*, 1974; Kingwell *et al.*, 1977; Person Le Ruyet *et al.*, 1978, 1981; Scott & Middleton, 1979; Scott & Baynes, 1979).

Sin embargo, la supervivencia larvaria y postlarvaria ha seguido siendo durante años un objetivo para afrontar la producción de rodaballo a escala industrial. En la búsqueda de las causas de la alta mortalidad se han realizado numerosas



investigaciones sobre el desarrollo de las larvas a nivel morfológico, histológico e histoenzimológicos (Al Maghazachi & Gibson, 1984; Cousin & Baudin-Laurencin, 1985; Cousin *et al.*, 1986), de diferentes aspectos del cultivo larvario (Person-Le Ruyet, 1989) y del cambio de alimentación viva a inerte conocida esta fase como destete. Así, en el cultivo larvario tienen gran influencia sobre la supervivencia, el momento de la primera ingesta o alimentación exógena de las larvas (Quantz, 1985, 1989; Iglesias *et al.*, 1993b), el tamaño y la densidad de presa (Quantz, 1985; Fernández –Pato *et al.*, 1990; Iglesias *et al.*, 1993a, Olmedo *et al.*, 1995), así como nuevos tipos de presa como los copépodos (Witt *et al.*, 1984; van der Meer, 1991), los requerimientos nutritivos en ácidos grasos de cadena larga (Kuhlmann *et al.*, 1982; Witt *et al.*, 1984; Stottrup & Attramadal, 1992), y de otros nutrientes esenciales como aminoácidos, minerales y vitaminas (Gatesoupe, 1986; Robin, 1989; Ronnestad *et al.*, 1992 y Garcia de la Banda *et al.*, 1992), y por último la calidad tanto de los huevos (Kjorsvic *et al.*, 1990) como del medio (Gatesoupe, 1989, 1990; Nicholas *et al.*, 1989; Perez Benavente & Gatesoupe, 1988). Respecto al destete también se ha realizado estudios sobre a qué edad de la larva debe iniciarse, duración del destete y diferentes dietas de arranque (Browley, 1978; Kuhlmann *et al.*, 1981; Gatesoupe, 1982; Browley & Howell, 1983; Person-Le Ruyet *et al.*, 1983, 1989).

Por otro lado, el crecimiento del rodaballo tras el destete no presenta problemas como ya demostró Jones (1970, 1972b). Esta especie presenta una elevada tasa de crecimiento que se incrementa con la temperatura (Brown *et al.*, 1984; Martínez-Tapia & Fernández- Pato, 1991a; Imsland *et al.* 1997a), baja mortalidad, fácil manejo y permite altas densidades de cultivo (Sánchez *et al.*, 1990; Fernández -Pato *et al.*, 1990; Martínez- Tapia & Fernández- Pato, 1991b). Además, presenta un dimorfismo sexual en el crecimiento y en la maduración, el crecimiento es mayor en las hembras desde los 8 meses de vida y hay diferencias en el crecimiento entre ejemplares maduros y no maduros, es decir, existe una correlación entre la maduración y la tasa de crecimiento (Imsland *et al.* 1997a).

Las investigaciones realizadas durante los 20 últimos años han repercutido en la aplicación industrial del cultivo de rodaballo que ha experimentado un gran desarrollo. Actualmente, las plantas de cultivo de rodaballo, a las que inicialmente se transfirieron los conocimientos científicos obtenidos a escala experimental, desarrollan su propia tecnología sobre su cultivo ya sea en sistemas intensivos o extensivos.

El cultivo intensivo se realiza en tanques relativamente pequeños y se utilizan altas densidades tanto de larvas como de presas, por lo que exige un mayor control del medio. Las presas se cultivan en el laboratorio, y debido al escaso valor nutricional de algunas de ellas se enriquecen para solventar esas carencias antes de ser suministradas a las larvas. En el medio de cultivo se puede introducir fitoplancton (técnica de aguas verdes) que mantiene la calidad del medio y además sirve de enriquecedor del rotífero. El fitoplancton puede ser sustituido por enriquecedores comerciales tanto para el rotífero como para la Artemia (técnica de aguas claras).

El sistema extensivo se utiliza más en el norte de Europa, y se realiza en grandes volúmenes de agua donde las presas utilizadas provienen del zooplancton natural,



---

principalmente copépodos, con un amplio rango de tamaños (Olmedo *et al.*, 1995). Los resultados de este sistema de cultivo tienen el inconveniente de ser variables ya que dependen del zooplancton presente en cada momento.

La producción de rodaballo se realiza principalmente en aguas templadas, por no ser rentable el engorde a bajas temperaturas, y en el área Sur Atlántica Europea, en particular España y Francia que se han situado a la cabeza de la explotación industrial del rodaballo. En Cantabria y Galicia la producción de rodaballo se inició en los años 80, con el apoyo técnico de los centros costeros de Santander y Vigo del Instituto Español de Oceanografía (I.E.O), donde se obtuvieron los primeros resultados sobre la gran capacidad de adaptación de ejemplares salvajes de esta especie a la cautividad y sobre su crecimiento. Actualmente, la mayor parte de las plantas de cultivo de rodaballo en España, que inicialmente engordaban alevines procedentes de “hatcheries” europeas, disponen de su propia tecnología para autoabastecerse de alevines.

La producción industrial de rodaballo en España en el año 2002 fue de 3.998 toneladas con una previsión de 5.020 toneladas para el 2003 según datos de APROMAR.

## **1.2 ANTECEDENTES SOBRE LA GESTIÓN Y LA CONSERVACIÓN DE GAMETOS**

### **1.2.1 Gestión de reproductores de rodaballo**

Aunque las primeras experiencias de Anthony (1910), manteniendo reproductores en cautividad dieron como resultado puestas naturales viables y larvas en sus primeras fases, el cultivo de esta especie se abandonó hasta la década de los 70, en que una serie de estudios ya mencionados en el apartado anterior, reavivaron el interés por el rodaballo.

La reproducción en el medio natural de esta especie fue descrita por Jones (1974), donde aportó datos sobre la época de puesta, que se aplicaron para la obtención de huevos en cautividad. Desde entonces, varios centros de investigación oficiales en Francia (Ifremer, Brest) y Gran Bretaña (Maff, Lowestoft) establecieron stocks de rodaballo en cautividad, bajo condiciones ambientales de temperatura y fotoperiodo, y de los cuales obtuvieron puestas naturales (Girin, 1979; Browley *et al.*, 1986; Devauchelle *et al.*, 1986, 1988; McEvoy, 1989). Aunque las condiciones de estabulación entre los centros de investigación fueron diferentes en cuanto al volumen de tanques (17-45 m<sup>3</sup>), la carga (0.7-2 kg/m<sup>3</sup>) y el tipo de fondo empleado (con y sin arena), coincidían en los resultados. Las puestas naturales obtenidas presentaban una serie de problemas, como tasas de fecundación aleatorias (Devauchelle *et al.*, 1986), incluso a veces ausencia de ésta (Barton, 1981) e inviabilidad de los huevos recogidos o un desarrollo anormal (Bromley *et al.*, 1986). Las posibles causas podrían ser las variaciones de temperatura, que afectan negativamente a la viabilidad cuando son superiores a 16° C (Devauchelle *et al.*, 1986), así como otros factores como el estrés, la salinidad, la dieta y/o el daño físico durante la recolección (Bromley *et al.*, 1986).



Las ventajas de la obtención de puestas naturales son obvias, ya que se requiere un mínimo trabajo al ser recogidas con facilidad en el rebosadero de los tanques y los reproductores están sometidos a un menor estrés, pero se hace difícil la selección genética y se subestima la producción total, ya que sólo se recogen los huevos flotantes y el resto se hunden en el tanque de reproductores.

A partir del trabajo de Bye & Htum-Han (1979) que sugirieron que la maduración gonadal del rodaballo está influenciada positivamente por el incremento de las horas de luz, mientras que la disminución de éstas produce regresión gonadal, la manipulación mediante el control del fotoperiodo de las puestas del rodaballo en cautividad se hace de manera rutinaria (Girin y Devauchelle, 1978; Fores *et al.*, 1988; Fauvel *et al.*, 1993a; Imsland *et al.*, 1997b). Las puestas pueden retrasarse prolongando el fotoperiodo invernal (8h L: 16 O), mientras que para adelantarlos se induce a los peces a un invierno temprano seguido de un fotoperiodo de verano (16 L: 8 O), y por lo general no más de dos meses por estación (Downing, 1980). La variación del fotoperiodo puede ser gradual, imitando el fotoperiodo natural (Devauchelle *et al.*, 1988) o brusca, pasando directamente de 8 L: 16 O a 16 L: 8 O (Downing, 1980; Forés *et al.*, 1991; Peleteiro *et al.*, 1995); en este caso se ha comprobado que a los 2 meses comienza de forma paralela el periodo de puesta de las hembras y los machos están fluyentes (Olmedo, 1995). Sin embargo, las hembras de rodaballo en cautividad ovulan, pero no desovan espontáneamente y los huevos deben ser extraídos por presión abdominal. Los machos son igualmente presionados para obtener el esperma y a continuación se realiza la fecundación artificial.

Este sistema es el más extendido por una serie de razones: se rentabiliza mejor una planta de cultivo ya que se someten varios stocks a fotoperiodos diferentes, se obtienen puestas a lo largo de todo el año mientras que en la naturaleza el rodaballo desova solo durante 2 meses y medio (Jones, 1972a, 1974), la producción total de huevos obtenidos por presión abdominal es más alta que la obtenida mediante las puestas naturales y las tasas de fecundación de los huevos son más regulares aunque bajas (Devauchelle *et al.*, 1986). Sin embargo, las tasas de fecundación varían de un año a otro, de una hembra a otra y entre diferentes puestas de una misma hembra, y esa variación se atribuía a una sobremaduración de los ovocitos por permanecer demasiado tiempo en el lumen ovárico después de la ovulación de la hembra.

Las investigaciones de Barton (1981) permitieron ver que la hembra de rodaballo realiza una puesta secuencial según unos ciclos de ovulación, que son característicos de cada hembra. Estos ciclos de ovulación no eran sincrónicos, presentaban variaciones entre individuos, estaciones reproductivas e incluso dobles ritmos (McEvoy, 1985; Howell & Scott, 1989; Suquet *et al.* 1992a; McEvoy & McEvoy, 1992). Más tarde los trabajos de McEvoy (1984) permitieron determinar los tiempos de ovulación y así observar la tasa de sobremaduración de los ovocitos retenidos en el lumen ovárico. Las tasas de fecundación y eclosión en ovocitos recién ovulados eran máximas (90% y 97%) respectivamente, mientras que esas tasas se reducían drásticamente en los ovocitos retenidos durante 20 horas a 13° C. Para asegurar la máxima viabilidad de los huevos a esa temperatura deben extraerse a las 10-12 horas



de la ovulación, ya que a partir de ese momento empieza la sobremaduración. Además, observó que el tiempo entre ovulaciones para cada hembra, bajo condiciones estables de temperatura (14-15° C), era constante entre 60 y 95 horas, lo que permitió predecir las ovulaciones futuras. Sin embargo, a temperaturas más elevadas el tiempo de ovulación se acorta y se acelera la sobremaduración (Bromley *et al.*, 1986; Devauchelle *et al.*, 1986; Fauvel *et al.*, 1992).

La sobremaduración ha sido estudiado por diversos autores. El estado de sobremaduración de los ovocitos puede valorarse mediante la medición del pH, ya que en huevos recién ovulados el pH es de 8 y cuando hay sobremaduración desciende a 7 (Fauvel *et al.*, 1993b) o por el intervalo de tiempo entre la fecundación y la primera división, que es más corto en los huevos recién ovulados (2 h 15 m a 15°C) que en los retenidos 24 horas en el ovario que tardan 4 horas (Barton, 1981). Este efecto puede reducirse realizando la presión abdominal a las hembras más frecuentemente (Fauvel *et al.*, 1992a).

Por tanto, es muy importante mantener una estabilidad térmica durante la época de puesta del rodaballo para reducir el estrés de los reproductores y poder predecir las ovulaciones con exactitud. En ambos tipos de puestas, naturales e inducidas por presión abdominal, la temperatura óptima es de 13-15° C y las temperaturas superiores tienen efectos adversos sobre la producción de huevos viables. La predicción de la ovulación juega además un papel muy importante en las investigaciones sobre la calidad de los gametos y la selección genética de reproductores.

Por otro lado, se han realizado estudios para inducir la puesta en el rodaballo mediante el uso de hormonas. Flüchter (1972) obtuvo éxitos parciales al inducir la ovulación mediante inyección de una suspensión de hipófisis de bacalao pero con hipófisis de carpa no obtuvo resultados. Barton (1981) trató de inducir la ovulación mediante inyecciones intraperitoneales de una gonadotropina de salmón, con la idea de sincronizar los ciclos ovulatorios de varias hembras que presentaban ritmos similares. Más tarde en la Unión Soviética se han utilizado extractos hipofisarios de hembras salvajes en estado III de maduración y machos en estado IV de rodaballo conservados en acetona, pero este método era costoso y poco homogéneo por la pérdida de la actividad gonadotropa en el tiempo (Zolotnitskii, 1980).

Más recientemente se han adecuado métodos eficaces de inducción de la puesta, utilizados en la mayoría de las especies cultivadas, mediante LHRHa (análogo sintético del factor hipotalámico liberador de la hormona luteizante), ya sea por inyección o implante. En el rodaballo la inducción de ovulación con dosis de 5, 3 ó 2 µg LHRHa /Kg de hembra, es rápida y sincronizada cuando el desarrollo gonadal es medio y avanzado (entre 2 y 10 días tras la inyección), pero con desarrollo incipiente hace falta repetir el tratamiento a los 14 días. Además, los ciclos ovulatorios de los ejemplares hormonados se regularizan y el tiempo de ovulación se acorta concentrándose las puestas en un periodo de un mes, a la vez que aumenta el volumen de la puesta (Peleteiro, 2001).



### 1.2.1.1 Fecundación artificial

La fecundación artificial ha sido usada hace mucho tiempo en especies de agua dulce, principalmente salmonídeos y cíprinídeos (Billard, 1988, 1990). En salmonídeos su uso se remonta a la Edad Media y es una técnica ampliamente utilizada que se conoce como método seco, que consiste en mezclar una cantidad determinada de huevos con esperma y posteriormente añadir agua para activar la movilidad del esperma. No obstante, no se obtenían buenos resultados en la fecundación debido a un exceso de espermatozoides, por lo que Nursall & Hasler (1952) sugirieron reducir la cantidad de esperma, ya que un macho podía fecundar los huevos de 20 a 100 hembras (Morley & Withler, 1969). Sin embargo, Nomura (1964) propuso la técnica del diluyente, que posteriormente fue perfeccionada por Billard *et al.* (1974) y Billard (1975) donde determinó las cantidades óptimas de esperma, huevos y diluyente.

Esta técnica del diluyente ha sido escasamente utilizada en especies marinas como la dorada *Sparus aurata* (Alessio & Bronzi, 1975), el mero *Epinephelus tauvina* (Chen *et al.*, 1977), la lubina *Dicentrarchus labrax* (Billard, 1984), bacalao *Gadus morhua* (Trippel & Neilson, 1992), la caballa *Rastrilliger neglectus* (Broonprakov & Dhebtaranon, 1974), el corvinón brasileño *Micropogonias undulatus* (Gwo *et al.*, 1991), el mugil *Mugil cephalus* (Lee *et al.*, 1992), y el rodaballo *Scophthalmus maximus* (Fauvel *et al.*, 1993a).

Los estudios sobre la fecundación artificial son particularmente importantes en especies como el rodaballo, que no desova espontáneamente en cautividad, y que para obtener huevos fecundados hay que extraer los gametos por presión abdominal y realizar una fecundación. Además, las condiciones de fecundación en estas especies tienen un mayor impacto sobre la producción; así en una planta piloto de rodaballo la producción media de huevos viables obtenidos tras la fecundación artificial fue del 70%, pero con grandes variaciones (Omnes *et al.*, 1991).

No obstante, en la literatura sobre la gestión de reproductores, se describen grandes variaciones en tasas de fecundación, que pueden ser causadas por la calidad de los gametos o por los diferentes métodos de fecundación utilizados. Se han realizado estudios sobre las características generales de los gametos (Chereguini *et al.*, 1992a; Chauvaud 1993; Fauvel *et al.*, 1993a; Suquet *et al.*, 1994), sin embargo a fin de relacionar la calidad de gametos con la capacidad de fecundación, debe determinarse antes el método de fecundación artificial más adecuado y la relación óptima de esperma-huevo que debe ser usada (Chereguini *et al.*, 1995; Suquet *et al.*, 1995).

Actualmente, los protocolos sobre fecundación artificial y sobre la viabilidad de gametos son de gran importancia en la investigación y en la gestión de piscifactorías comerciales.

### 1.2.2 Conservación de gametos

El desarrollo del cultivo de peces marinos, con alto valor comercial, demanda un mayor control de la reproducción de peces y gestión genética para la optimización de

la producción. Dentro de este marco se requieren no solo gametos de alta calidad, sino prolongar e incrementar la utilidad de los gametos para su gestión. La conservación de los gametos puede ser de varias horas, días o de años, dependiendo de la finalidad o propósito de la conservación. La duración de la conservación de gametos dependerá de la temperatura final del almacenamiento y de la elección del método a utilizar. Así, la conservación puede realizarse a corto plazo o “preservación” a temperaturas próximas a 0° C y a largo plazo o “crioconservación” a temperaturas muy bajas, normalmente a -196° C, que es la temperatura a que se encuentra el nitrógeno líquido. A esta temperatura la viabilidad celular puede ser almacenada en una forma genéticamente estable.

#### 1.2.2.1 Conservación de esperma a corto plazo o preservación

La conservación a corto plazo del esperma es un método sencillo y práctico que permite prolongar la disponibilidad del esperma en la gestión de los reproductores, y reducir la manipulación y el estrés originado en los machos para obtener el esperma; además puede ser una herramienta útil para incrementar la diversidad genética en los stocks de reproductores y complementaria a la crioconservación.

Se han realizado numerosos estudios sobre la conservación a corto plazo del esperma en especies de agua dulce, principalmente salmonídeos (Carpentier & Billard, 1978; Stoss *et al.*, 1978; Scott & Baynes, 1980; Jensen & Alderdice, 1984; Erdahl, 1986; Erdahl & Graham, 1987), y en especies como la anguila japonesa *Anguilla japonica* (Ohta & Izawa, 1996), el lucio de los leucomas *Stizostedion vitreum* (Satterfield & Flickinger, 1995), el pez gato Europeo *Silurus glanis* (Babiak *et al.*, 1996), el esturión Atlántico *Acipenser oxyrinchus* (DiLauro *et al.*, 1994). Sin embargo estos estudios son más escasos en especies marinas, tales como la solla *Pleuronectes platessa* (Pullin, 1972), la lubina *Dicentrarchus labrax* (Saad, 1992), el sargo picnic *Acanthopagrus berda* (Palmer *et al.*, 1994), la brema negra *Acanthopagrus schlegeli* (Lim *et al.*, 1997), el bacalao negro *Anoplopoma fimbria* (Alberdice *et al.*, 1988a, b), el halibut Pacífico *Hippoglossus stenolepis* (Bowden *et al.*, 1990) y el corvinón ocelado *Sciaenops ocellatus* (Wayman *et al.*, 1998).

Los principales factores que influyen en la conservación a corto plazo del esperma son la temperatura, el intercambio gaseoso, los antibióticos y el uso o no de diluyentes inmovilizantes (Stoss, 1983; Leung & Jamieson, 1991; Rana, 1995a). Así, hay estudios sobre la adición de antibióticos (Saad *et al.*, 1988; Linhart *et al.*, 1991); sobre la conservación con oxígeno (Stoss *et al.*, 1978; Billard, 1981; Sunitha & Jayaprakas, 1997) y con diluyentes (Lim *et al.*, 1997).

Se han realizado algunos estudios sobre el esperma de rodaballo, la mayoría sobre las características generales, como la concentración de espermatozoides que varia entre 2 y  $5,46 \times 10^9$  espermatozoides.  $\text{mL}^{-1}$  (Suquet *et al.*, 1992b; Suquet *et al.*, 1994), la composición del líquido seminal con valores medios de osmolaridad, pH y contenido total de proteína de 306 mOsm.  $\text{L}^{-1}$ , de 7,31 y de 8,8  $\text{mg.L}^{-1}$  respectivamente (Suquet *et al.*, 1993), la concentración media del adenosin trifosfato (ATP) que es de 9,2 nmol ATP/ $10^8$  espermatozoides (Geffen & Frayer, 1993) y la movilidad del esperma, que



depende de la presión osmótica del medio, siendo ésta máxima entre 300 y 1100 mOsm. L<sup>-1</sup> (Chauvaud 1993; Chauvaud *et al.*, 1995). Además, al comparar con especies de agua dulce, la duración de la movilidad del esperma en rodaballo es mayor, alrededor de 17 minutos (Chereguini *et al.* 1992a, b; Suquet *et al.* 1994). Estas dos últimas características son de gran importancia en esta especie a la hora de la conservación y la fecundación artificial.

Sin embargo, no hay estudios sobre la conservación a corto plazo del esperma de rodaballo bajo diferentes condiciones, ni de cómo evitar el efecto nocivo de la orina durante la obtención de esperma (Dreanno *et al.*, 1998).

### 1.2.2.2 Conservación de esperma a largo plazo o crioconservación

Desde hace tiempo se han desarrollado métodos para conservar en frío gametos viables, pero éstos dependían de las investigaciones en Criobiología que se iban realizando sobre los crioprotectores; estos crioprotectores o crioconservantes son agentes que actúan protegiendo con efectividad al esperma del posible daño originado durante la congelación y descongelación. El glicerol fue el primer crioconservante encontrado por Rostand (1946) y Polge *et al.* (1949).

Los primeros intentos de crioconservación de esperma de peces se iniciaron, después de los éxitos obtenidos con semen de bóvidos y aves de corral, con Blaxter (1953) y Sneed & Clemens (1956). Lovelock & Bishop (1959) encontraron en el dimetil sulfóxido (DMSO) un crioprotector más potente que el glicerol y el etilen glicol, con una tasa de penetración más rápida y que eliminaba el tiempo de equilibración, es decir el tiempo que debe transcurrir para que el crioprotector penetre en el esperma, y que es necesario con los otros crioprotectores conocidos. Posteriormente, Hodgins & Ridgeway (1964) usaron el DMSO como agente protector de esperma en salmones.

Los primeros éxitos de fecundación de huevos con esperma congelado se realizaron con especies de agua dulce, principalmente en salmones (Horton *et al.*, 1967; Hoyle & Idler, 1968; Graybill & Horton, 1969; Ott & Horton, 1971). Las primeras tasas de fecundación realizadas en especies marinas, tras almacenar esperma en frío, fueron obtenidas por Blaxter (1953, 1955) y Mounib *et al.* (1968) con arenque *Clupea harengus* y bacalao *Gadus morhua*.

Para el desarrollo de una técnica de crioconservación de esperma en peces, hay que tener en cuenta una serie de factores para que la técnica sea válida: características y calidad del esperma, diluyente, crioprotector, dilución, tiempo de equilibración, velocidad de congelación y descongelación, y métodos de almacenaje.

#### 1.2.2.2.1 Calidad del esperma

El esperma está formado por los espermatozoides y el plasma seminal, que proporciona al espermatozoide un medio adecuado para su almacenamiento en la gónada; normalmente la totalidad de los espermatozoides ya están formados al inicio del periodo de espermización, pero están inmóviles en los órganos reproductivos y en



---

el esperma. Cuando el esperma es liberado por el macho al medio natural es cuando comienzan los vigorosos movimientos flagelares y la tasa metabólica aumenta sustancialmente; esta iniciación del movimiento o activación del esperma se produce por las diferencias con el medio exterior.

Los factores involucrados en la activación del esperma son fundamentalmente la presión osmótica, la composición iónica y el pH del plasma seminal. El conocimiento de estos factores es de gran importancia a la hora de crioconservar, ya que previamente hay que seleccionar espermas de buena calidad, es decir, que presenten mejor movilidad. La movilidad del esperma es usada como parámetro para evaluar su viabilidad ya que existe generalmente una correlación entre la presencia de movilidad del esperma y su capacidad fecundante (Stoss, 1983).

Además, hay enormes diferencias en la calidad del esperma a nivel intra e interespecífico (Rana, 1995a). Estas diferencias son debidas fundamentalmente a la variabilidad genética, a la época del periodo reproductivo, a la biogeografía, la alimentación y el medio ambiente. Así, en salmones la densidad y volumen de esperma decrecen al avanzar el periodo reproductivo (Billard *et al.*, 1971; Horton & Ott, 1976), y en lubina *Dicentrachus labrax* y rodaballo *Scophthalmus maximus* además se ha observado que la duración de la movilidad del esperma también decrece (Billard *et al.*, 1977; Suquet *et al.*, 1998a). En trucha arcoiris *Salmo gairdneri* la viabilidad del esperma descongelado mejoraba si se alimentaban con dietas ricas en ácidos grasos w3 (Baynes & Scott 1987). Por otro lado, el método de obtención de esperma (Linhart *et al.*, 1987; Saad *et al.*, 1988; Legendre *et al.*, 1996; Dreanno *et al.*, 1998) y el tiempo que transcurre entre la obtención del esperma y la criocongelación también influyen en la calidad (Scott & Baynes, 1980; Stoss, 1983; Harvey, 1983).

#### **1.2.2.2.2 Diluyente**

La eficacia de la crioconservación mejora enormemente si el esperma se diluye en un diluyente o “extender” adecuado para la especie (Scott & Baynes, 1980). Graybill & Horton (1969) definen al “extender” como “una solución de sales, que incluye a veces compuestos orgánicos que ayudan a mantener la viabilidad celular durante la congelación y descongelación”. Un buen diluyente debe permitir la dilución de los espermatozoides sin activarlos, mantener el equilibrio electrolítico y la presión osmótica para minimizar los efectos de las diferencias de concentración de sales, tener capacidad tampón entre 6 y 8 para minimizar los cambios de pH, ser estable, resistiendo la capacidad de degradación enzimática y no enzimática, y proveer de un ambiente adecuado a las actividades metabólicas normales del espermatozoide.

Aunque hay muchos diluyentes distintos en la literatura científica y la composición del diluyente varía ampliamente, desde los más simples a los más complejos con hasta 27 componentes (Graybill, 1968), no se ha encontrado que esa complejidad esté relacionada con la criosupervivencia de los espermatozoides, y sencillas formulaciones de cloruro sódico o de algún azúcar son incluso más efectivos (Billard, 1980; Stoss & Holtz, 1981; Stoss & Refstie, 1983). En general, la mayoría de los diluyentes utilizados en la crioconservación son soluciones de compuestos inorgánicos y



orgánicos que imitan la composición química del líquido seminal o suero sanguíneo de la especie. Revisiones sobre la composición de los diluyentes usados en crioconservación han sido realizadas por Scott & Baynes (1980), Leung & Jamieson (1991) y McAndrew *et al.* (1993) y en especies marinas por Gwo (2000) y Suquet *et al.* (2000). Los más empleados son la solución salina de Cortland, el medio de Ménézo's y el medio Mounib; este último fué modificado por Legendre & Billard (1980) con resultados superiores al medio de Ménézo's.

#### 1.2.2.2.3 Crioprotector

Los crioprotectores se añaden a los diluyentes para minimizar el estrés celular y los daños criogénicos que se producen durante la congelación-descongelación del esperma, y deben poseer las propiedades de baja toxicidad y alta solubilidad en agua, ya que deben alterar las propiedades fisicoquímicas del agua durante la congelación. El mecanismo de acción de los crioprotectores no está claro, aunque sabemos que se unen a las moléculas de agua y reducen la formación de cristales intracelulares, bajando el punto de congelación. Se clasifican en permeables y no permeables según su capacidad de atravesar la membrana celular. Los permeables son moléculas de bajo peso molecular como el glicerol, el dimetil sulfóxido (DMSO), propilen glicol y etilen glicol. Las moléculas de mayor peso molecular, como azúcares y proteínas, son crioprotectores extracelulares que no entran en la célula pero actúan sobre los lípidos de la membrana celular, haciéndoles más flexibles y por lo tanto reduciendo los daños durante la congelación, es decir, protegen la membrana del espermatozoide. Como estabilizadores de membrana se han usado lipoproteínas, como la leche descremada en polvo o la yema de huevo al 10-20% que han dado los mejores resultados, y últimamente la albúmina suero bovino (BSA 4mg/ml). La albúmina de suero está sustituyendo a la yema de huevo, por tener una caducidad más alta, y se están obteniendo muy buenos resultados en test de fecundación (Suquet pers. comm.). Esta proteína es también usada frecuentemente en crioconservación, cuando se observan variaciones en la composición del esperma durante el periodo de espermatización (Billard, 1978; Legendre *et al.*, 1980).

Los crioprotectores no permeables se suelen usar conjuntamente con los permeables, e incluso se ha encontrado un sinergismo al combinar la glucosa con el DMSO, al congelar esperma de sargo aleta amarilla *Acanthopagrus latus* (Gwo, 1994). En general los no permeables dan mejores resultados con velocidades de congelación lentas y los permeables con rápidas.

Actualmente hay una gran cantidad de crioprotectores, aunque los más usados en la crioconservación de esperma de peces teleósteos son el glicerol, DMSO y metanol (McAndrew *et al.*, 1993); y además son probados continuamente nuevos crioprotectores como el 1,2 propanodiol. La elección del crioprotector depende de la calidad y de la eficacia con el esperma así como del coste. La concentración final u óptima del crioprotector depende de los crioprotectores y especies, variando las concentraciones entre el 7 y 15%.



#### 1.2.2.2.4 Dilución

Por otro lado, hay que determinar la dilución esperma-diluyente que se empleará en la crioconservación. Aunque se han realizado investigaciones utilizando diferentes diluciones, los resultados son confusos. Así, en salmones no se han encontrado diferencias en la viabilidad del esperma descongelado utilizando diluciones (volumen de esperma : diluyente) que van desde 1:1 a 1: 9 (Truscott & Idler, 1969; Ott & Horton 1971; Horton & Ott 1976). Sin embargo, en trucha arco iris *Salmo gairdneri* la dilución mejor era 1:3 (Legendre & Billard 1980) y para el lucio *Esox lucius*, lubina *Dicentrarchus labrax* y dorada *Sparus aurata* es desaconsejable por encima de 1:2 (Billard, 1978). Las diluciones esperma : diluyente más comúnmente usadas van desde 1:3 a 1:6 según McAndrew *et al.* (1993).

#### 1.2.2.2.5 Tiempo de equilibración

Para que el crioprotector penetre en la célula antes del proceso de congelación es preciso dejar un tiempo que llamamos de equilibración. La tasa de incorporación de éste dependerá del tamaño de la célula y del peso molecular del crioprotector; así el metanol con un peso molecular más bajo penetra más rápidamente que el glicerol (Harvey & Ashwood- Smith, 1982). Sobre este punto también hay resultados contradictorios, mientras Harvey (1983) recomendó eliminar el tiempo de equilibración, es decir, congelar inmediatamente tras diluir el esperma en el diluyente que contiene el crioprotector, Rana *et al.* (1990) sugieren tiempos de equilibración entre 30-90 minutos y encuentran que hay una interrelación entre el diluyente y el tiempo de equilibración, es decir, que el tiempo de equilibración dependerá del diluyente. Sin embargo, en los trabajos de crioconservación más recientes se elimina o reduce este tiempo para evitar el efecto tóxico del crioprotector y la posible activación del esperma por el diluyente o por el crioprotector.

#### 1.2.2.2.6 Velocidad de congelación y descongelación

Este punto es el más critico en la crioconservación y el menos estandarizado en esperma de peces a la hora de evaluar protocolos de crioconservación. Las tasas o velocidades de congelación varían en la práctica según el método de congelación empleado (Leung & Jamieson, 1991; McAndrew *et al.*, 1993). Los datos limitados que se tienen, sugieren que la velocidad óptima de congelación puede ser específica para cada especie (Stoss, 1983; McAndrew *et al.*, 1993; Suquet *et al.*, 2000). En salmones se encuentran los mejores resultados con velocidades de congelación de 30-35° C/min (McAndrew *et al.*, 1993). En especies tropicales y subtropicales las tasas de congelación son más bajas. Billard (1978) con lubina *Dicentrarchus labrax* y dorada *Sparus aurata* obtuvo los mejores resultados con tasas de 10° C/min; en halibut Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* se obtuvieron con tasas de 20 –30° C/min ( Bolla *et al.*, 1987) y en corvina brasileña *Micropogonias undulatus* el rango de congelación óptimo era de 10-150° C/min (Gwo *et al.*, 1991).

Las tasas de descongelación que se utilizan normalmente son rápidas para evitar la recristalización. También en este punto los resultados son difíciles de interpretar ya



que en la mayoría de los casos se dan las temperaturas del baño de agua utilizadas para descongelar, pero no el tiempo de inmersión empleado para descongelar el contenedor de esperma congelado. Las tasas de descongelación empleadas están entre 100 y 1500° C/min, pero para salmones las mejores están entre 1000 y 1500° C/min (Stoss, 1983); y en tilapia *Sarotherodon mossambicus* se encontraron pequeñas diferencias utilizando 90° C, 390° C o 1200° C/min (Harvey, 1983). No se han encontrado diferencias en fecundación descongelando el esperma de corvinón brasileño *Micropogonias undulatus* a 25° C y 50° C (Gwo *et al.*, 1991); ni tampoco en halibut Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* a 10° C y 40° C (Bolla *et al.*, 1987). En la práctica las muestras se descongelan en baños de agua a temperaturas entre 30-80° C, antes de su uso en la fecundación artificial.

#### 1.2.2.2.7 Métodos de almacenaje

El esperma diluido se almacena de diferentes maneras, en “pellets” o bolitas (40-100 µL), en pajuelas de plástico (0.25-0.5 µL) como las utilizadas en ganadería y en criotubos de polipropileno (2-5 mL).

Los “pellets” o bolitas del esperma diluido se suelen congelar utilizando bloques de hielo seco a -79° C (Legendre & Billard, 1980; Stoss & Holtz, 1981; Stoss & Reftsie, 1983). Este método consiste en hacer agujeros en el hielo y rellenarlos con el esperma, posteriormente las bolitas se sacan y guardan en un vial hasta su uso; este método es práctico para el trabajo de campo, genera una tasa de congelación de 30-35° C y es usado en trucha (Scott & Baynes, 1980). Sin embargo, con este método puede ocurrir una recristalización al descongelar los “pellets” (Erdahl *et al.*, 1984), por lo que el uso de pajuelas y criotubos es más seguro.

Las pajuelas y criotubos con el esperma diluido se congelan sobre los vapores de nitrógeno líquido en una caja de poliestireno espandido o en la boca de un contenedor de nitrógeno líquido. Estos métodos son los más usados, y en la mayoría de los casos no se registran o determinan las tasas de congelación. En el caso de congelar en la boca o cuello del contenedor las tasas de congelación son impredecibles y la congelación además tiene el inconveniente de realizarse en vertical, es decir, el esperma más próximo a los vapores se congelará antes que el esperma del final; sin embargo cuando se utiliza la caja la congelación se realiza en horizontal y todo el esperma se congela a la vez.

Las pajuelas comerciales presentan en un extremo un tapón de algodón, y una vez llenadas con el esperma, mediante aspiración, se cierran con calor o utilizando productos en polvo como el alcohol polivinílico, que en contacto con el líquido forman un tapón o sello. Las pajuelas se encuentran en el mercado con diferentes colores e incluso con un código para poder identificarlas, y se guardan, una vez congeladas, en los cestillos que llevan los contenedores de almacenaje de nitrógeno líquido hasta su uso.

Los criotubos también vienen con tapones de diferente color para su identificación y se guardan, una vez congelados, en criocáñulas de acero inoxidable con un sistema de



presión que sujeta al criotubo y permite guardar a la vez varios criotubos en una criocánula. Posteriormente las criocánulas se guardan en los cestillos de los contenedores de almacenaje de nitrógeno líquido.

En la actualidad también existen en el mercado equipos de congelación programables que permiten controlar las tasas de congelación y descongelación y por tanto evaluar el protocolo, pero son menos manejables para el trabajo de campo y muy costosos. Además, hay que tener en cuenta que las muestras guardadas en contenedores de nitrógeno líquido, pueden sufrir fluctuaciones de temperatura entre -60° C y -150° C que dependerán del nivel de nitrógeno en el contenedor, temperatura ambiental y frecuencia de apertura para sacar material.

Actualmente, la crioconservación de esperma ha sido realizada en más de 200 especies de agua dulce, principalmente salmonídeos (Lahnsteiner, 2000), y en 40 especies de peces marinos (Rana, 1995a, b; Gwo, 2000). Los resultados sobre crioconservación de esperma han sido muy variables por los diferentes métodos utilizados e incluso con el mismo método y las mismas especies (Billard *et al.* 1995; Rana 1995a). Mas aún, por las diferencias entre individuos y entre eyaculados de un mismo macho (Maisse, 1996). El esperma de peces marinos es más resistente al proceso de congelación y descongelación que el de los peces de agua dulce, es decir, parece resistir mejor la crioconservación (Scott & Baynes, 1980; Maisse, 1996), probablemente debido a la alta proporción de colesterol/fosfolípidos en la membrana del espermatozoide (Drokin, 1993), del contenido de ATP y otros factores desconocidos (Ogier de Baulny, 1997).

Entre las especies marinas se encuentran los lenguados, *Pleuronectes platessa* (Pullin, 1972); *Pleuronectes schrenki* y *Pleuronectes herzenteini* (Saitoh, 1996), *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson *et al.*, 1999); el rodaballo *Scophthalmus maximus* (Chereguini *et al.*, 1992a, b; Peleteiro *et al.*, 1996; Dreanno *et al.*, 1997); otros peces planos tales como *Paralichthys olivaceus*, *Limanda yokohamae*, *Verasper moseri* y *Microstomus achne* (Saitoh, 1996, Tabata & Mizuta, 1997); la lubina *Dicentrarchus labrax* (Billard, 1984; Fauvel *et al.*, 1998a, b; Saad, 1992); la dorada *Sparus aurata* (Billard, 1984; Chambeyron & Zohar, 1990); el besugo *Pagellus bogaraveus* (Chereguini *et al.*, 1992 a, b); el halibut Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* (Bolla *et al.*, 1987); el corvinón brasileño *Micropogonias undulatus* (Gwo *et al.*, 1991) y el corvinón ocelado *Sciaenops ocellatus* (Wayman *et al.*, 1998).

En los primeros estudios sobre criocongelación de esperma de rodaballo realizados por Chereguini *et al.* (1992a, b), donde se adaptó la técnica empleada para otros peces marinos (Billard & Dupont, 1975; Billard 1978), se observó una buena supervivencia del esperma tras 10 meses de la congelación. Los diluyentes usados fueron el DCSB4, que es una modificación del medio Mounib, y el medio de Ringer modificado por Rana & McAndrew (1989), y como crioprotector permeable el dimetil sulfóxido (DMSO). Posteriormente, la viabilidad del esperma descongelado con esta técnica de crioconservación adaptada al rodaballo se confirmó mediante fecundaciones artificiales. Estos primeros experimentos de fecundación con esperma crioconservado, usando como diluyentes el medio Ringer y el Mounib modificado, así como diferentes relaciones esperma: diluyente (1:2 y 1:3), mostraron tasas de fecundación de 85-92% y



---

de eclosión de 23-35% , similares a las obtenidas con esperma fresco para esta especie (Fauvel *et al.*, 1992, 1993a; Peleteiro *et al.*, 1995), pero no había diferencias entre los dos diluyentes y las diluciones usadas. Sin embargo, los resultados sobre que diluyente era mejor no fueron concluyentes.

Por otro lado, la mayoría de los estudios de crioconservación de esperma citados en la literatura se refieren a especies de agua dulce, generalmente los estudios eran a pequeña escala para determinar las tasas de fecundación tras la descongelación (Conget *et al.*, 1996; Zheltonozhko *et al.*, 1997; Babiak *et al.*, 1998), y solamente algunos dan tasas de eclosión y datos sobre el crecimiento de las poblaciones de alevines resultantes (Moczarski, 1977; Kerby, 1983; Kerby *et al.*, 1985; Van der Bank & Steyn, 1992; Palmer *et al.*, 1993; Van der Walt *et al.*, 1993; Tiersch *et al.*, 1994; Lubzens *et al.* 1997). En el caso del rodaballo, los trabajos sobre crioconservación de esperma (Peleteiro *et al.*, 1996; Dreanno *et al.*, 1997) presentan datos comparativos de tasas de fecundación y eclosión entre esperma fresco y crioconservado. Sin embargo, ningún trabajo ha obtenido datos del desarrollo de las larvas, excepto hasta el día 10 de cultivo (Suquet *et al.*, 1998b), y del crecimiento de los alevines obtenidos con esperma congelado, datos necesarios para la transferencia de estas técnicas de crioconservación a “hatcheries” comerciales.

### 1.2.2.3 Conservación de huevos a corto plazo

La conservación de huevos de peces, después de su obtención por presión abdominal, puede ser utilizada cuando los gametos deben transportarse, para sincronizar la disponibilidad de gametos de ambos sexos, y en la gestión de gametos que incluye fecundaciones artificiales y manipulaciones cromosómicas. Los intentos de crioconservar huevos de peces sin fecundar no han sido posibles hasta ahora debido a la inadecuada deshidratación y toxicidad de los crioprotectores (Rana, 1995a, b). Por ello, han sido desarrollados protocolos de conservación a corto plazo utilizando temperaturas bajas pero positivas, para salmones (Billard, 1992), siluros (Legendre *et al.*, 1996) y carpa *Cyprinus carpio* (Linhart *et al.*, 1995a). La mayoría de estos trabajos son en salmones, muestran el efecto de la temperatura (Billard & Gillet, 1981; Hsu & Goetz, 1993) y la composición del diluyente ( Billard, 1980; Billard & Jalabert, 1974) sobre la capacidad de conservación o almacenamiento de los huevos. El efecto de ambos factores también ha sido estudiado en el pez gato Europeo *Silurus glanis* (Linhart & Billard, 1995b) y en carpa *Cyprinus carpio* (Rothbard *et al.*, 1996). El efecto de la adición de oxígeno en los contenedores con huevos también ha sido estudiado en tilapia *Sarotherodon mossambicus*, e incrementa la tasa de fecundación tras el almacenamiento de los huevos (Harvey & Kelley, 1984). Además, la activación espontánea de los huevos del carpín *Carassius auratus*, que origina el cierre del micropilo, ha sido bloqueada incorporando un inhibidor de tripsina de soja, y proporciona una manera de mantener in vitro la viabilidad de los huevos durante un periodo largo (Hsu & Goetz, 1993).

En peces marinos, Blaxter (1963) obtuvo altas tasas de eclosión con huevos de arenque Pacífico *Clupea pallasii* conservados durante un periodo no superior a 36 horas, y la mayor supervivencia fue cuando los huevos se guardaron a salinidades entre 10 y 17.



Sin embargo, en el halibut Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* los huevos almacenados más de 6 horas presentaban un pobre desarrollo tras la fecundación (Basavaraja, 1991).

En la gestión del esperma de rodaballo han sido establecidos métodos que incluyen técnicas de conservación (Chereguini *et al.* 1992a, b,; Dreanno *et al.*, 1997). Sin embargo, la gestión de huevos de rodaballo ha sido limitada a la descripción del efecto de sobremaduración sobre la calidad de los huevos (McEvoy, 1984) y a la reducción de este proceso (Fauvel *et al.*, 1992).

### 1.3 OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral forma parte de las investigaciones realizadas en La Planta de Cultivos Marinos El Bocal del Centro Oceanográfico de Santander, dirigidas fundamentalmente al estudio de la conservación de gametos de alta calidad del rodaballo.

El objetivo general de esta Tesis ha sido la optimización de la gestión de los stocks de reproductores en el cultivo del rodaballo, para la determinación del método más adecuado de fecundación artificial y de la conservación de los gametos a corto y largo plazo, con el fin de obtener un rendimiento máximo en las explotaciones industriales. Adicionalmente, se ha realizado la evaluación del crecimiento de larvas y alevines producidos con gametos conservados, para garantizar la fiabilidad de dichas técnicas al sector productor de rodaballo.

Los objetivos específicos de esta Tesis son los siguientes:

- Optimización de la técnica de la fecundación artificial de gametos mediante el estudio de diferentes métodos ampliamente usados, y determinar la relación óptima de esperma-huevo que debe usarse en la fecundación.
- Conservación del esperma a corto plazo o “preservación”, definiendo los factores que están implicados, y la puesta a punto de un método que garantice la capacidad de fecundación del esperma preservado, para su transferencia a empresas comerciales.
- Conservación del esperma a largo plazo o “crioconservación”, estudiando algunos de los factores que están involucrados, y la puesta a punto de una técnica que garantice la capacidad fecundante del esperma crioconservado, para su transferencia a empresas comerciales.
- Evaluación del crecimiento de larvas y alevines obtenidos aplicando la técnica de crioconservación de esperma.
- Investigación sobre la conservación de huevos a corto plazo o “preservación”: estudio de parámetros o factores implicados y de la capacidad de ser fecundados los huevos tras la conservación.



## 1.4 JUSTIFICACIÓN

El sector productor de rodaballo para poder incrementar la producción de esta especie, con alto valor comercial, demanda un mayor control de la reproducción y de la gestión genética de los reproductores. En la gestión de reproductores hay grandes variaciones en las tasas de fecundación, que pueden ser debidas a la calidad de los gametos o a los diferentes métodos de fecundación que se emplean actualmente y por otro lado para la mejora genética de esta especie se requieren métodos o técnicas que prolonguen la viabilidad de los gametos de alta calidad. Esta situación, ha motivado que en el área de Acuicultura del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (CIEM) y en una de las líneas prioritarias del Programa Marco, se recomiendan estudios sobre la calidad de gametos, y la optimización de métodos, que permitan prolongar la viabilidad de gametos de alta calidad en el tiempo.

Actualmente, la conservación de gametos, en especial del esperma, juega un papel muy importante en la mejora de la gestión de reproductores de especies de peces cultivados. Es una herramienta esencial que permite en parte controlar la reproducción de los peces, al poder utilizarse dicho esperma en cualquier época del año. El éxito de la crioconservación en la gestión de reproductores presenta muchas ventajas, entre ellas controlar la reproducción en peces al poder utilizar esperma en cualquier época del año, conservar la variabilidad genética de especies con la creación de bancos genéticos de ejemplares con caracteres ventajosos, en extinción u obtenidos por manipulación genética, para realizar hibridación entre especies separadas geográficamente, como solución a los desfases madurativos entre machos y hembras que se presentan en especies en cautividad, la reducción de costes de transporte, de riesgos de transmisión de enfermedades y del stock reproductor.

## 1.5 ARTÍCULOS QUE HAN ORIGINADO LA MEMORIA PRESENTADA

El desarrollo de los trabajos de esta memoria ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Chereguini O., Cal R.M., Dreanno C., Ogier de Baulny B., Suquet M., Maisse G., 1997. Short-term storage and cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm. *Aquatic Living Resources*. 10, 251-255.

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, 319-324.

Suquet M., Chereguini O., Omnes M.H., Rasines I., Normant Y., Pan Souto I. & Quemener L. (1999) Effect of temperature, ova volume and addition of a diluent, of antibiotic, of oxygen and of a protein inhibitor on short-term storage capacities of turbot (*Psetta maxima*) ova. *Aquatic Living Resources* 12( 4), 239- 246.



Chereguini O., García de la Banda I., Rasines I. & Fernandez A. (2001) Larval growth of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) produced with fresh and cryopreserved sperm. Aquaculture Research 32, 133-143.

Chereguini O., García de la Banda I., Rasines I. & Fernandez A. (2002) Growth and survival of young turbot (*Scophthalmus maximus* L.) produced with cryopreserved sperm. Aquaculture Research 33, 637-641.

Chereguini O., García de la Banda I., Herrera M. & Martinez I., 2003. Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. Aquaculture Research 34, 9.

Chereguini O., García de la Banda I., Rasines I., Polo S. & Herrera M. Short-term preservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. Manuscrito para su publicación.



## **2. METODOLOGÍA**



## 2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

### 2.1.1 Estabulación de reproductores

Los trabajos experimentales de esta tesis se han realizado con el stock reproductor de la Planta de Cultivos “El Bocal” del Centro Oceanográfico de Santander, adaptado a la cautividad desde 1982, que está estabulado en dos tanques de 60 m<sup>3</sup> (R3 y R4) con control de fotoperiodo (8 h Luz:16 h Oscuridad). El número de total de ejemplares es de 156, de los cuales 78 son machos y los otros 78 son hembras. La densidad de estabulación es de 4 Kg/m<sup>3</sup> y la relación de machos/hembras es de 1:1. Este stock ha sido renovado a lo largo de los años con ejemplares producidos en la planta de cultivos.

Los tanques son de hormigón armado, recubierto con poliéster para que la superficie sea lisa y evitar agresiones. Los tanques son rectangulares, y para favorecer la circulación del agua, en la parte central de uno de los lados está la entrada del agua y en la parte opuesta a ésta hay un rebosadero por donde sale el agua del tanque. El agua del rebosadero cae a un colector de huevos provisto de una malla de 500 micras, donde se recogen los huevos en el caso de que hubiese una puesta natural, poco frecuente en el caso del rodaballo.

Los ejemplares del stock están sexados y marcados de dos formas: con nitrógeno líquido y con un sistema de identificación electrónico (Trovan de EiD ibérica, S.A) para facilitar una gestión individualizada de cada ejemplar. El control del sexo de los reproductores se realiza mediante un muestreo al comienzo de la maduración gonadal, a pesar de que los machos se pueden reconocer fácilmente al ser fluyentes a lo largo del año. Sin embargo, se puede cometer el error de marcar como hembra a algún macho no fluyente.

Para el marcaje con nitrógeno líquido se emplean unas varillas de acero que en su extremo inferior llevan un número del 0 al 9. El marcaje se realiza sumergiendo las varillas numeradas en el nitrógeno líquido durante 3 minutos y a continuación se aplica sobre la piel del reproductor presionando durante 20 segundos. Este tipo de marcaje permite distinguir individualmente a los ejemplares y facilita su localización dentro del tanque. Las hembras se marcan en la parte anterior de la zona dorsal, detrás de la cabeza, y los machos en la parte posterior de la misma zona pero encima de la línea lateral (Fig.1). Sin embargo, estas marcas con el tiempo se difuminan y es necesario remarcar los ejemplares al menos una vez al año.

Actualmente, se les marca también con “microchips” que llevan un código alfanumérico único, y que permite la identificación del ejemplar en caso de duda. El “microchip” se coloca también en la parte media de la zona dorsal mediante un inyector especial que lleva en el interior de la aguja el “microchip”. La identificación del ejemplar se realiza pasando un lector LID-500 por encima del ejemplar.



**Figura 1.** Marcaje de un macho con nitrógeno líquido

Los reproductores son alimentados con un pienso semihúmedo en forma de “pellets”, elaborado en nuestro laboratorio mezclando Fish Breed M (INVE Aquaculture NV) con un 7% de agua, con excepción de un día que se les suministra solamente pescado troceado, utilizando generalmente lirio *Micromesistius poutassou* y chicharro *Trachurus trachurus*. La composición del pienso se refleja en la Tabla I. El nivel de alimentación es aproximadamente del 2,5% de la carga del tanque por día.

**Tabla I.** Composición del pienso de reproductores de rodaballo

<b>Fish Breed Marine</b>	
Proteína bruta	62 %
Grasa bruta	17 %
Fibra	0,5 %
Cenizas	11 %
Vitamina A	25.000 IU
Vitamina D3	5.000 IU
Vitamina E	800 mg
Sulfato de cobre	6,7 mg
Antioxidantes:	Etoxiquina, BHT

El alimento se suministra diariamente, dos veces al día, y en las ocasiones que la ingesta se reduce, se rebaja la cantidad de alimento o se elimina una toma al día. Las variaciones en la ingestión están relacionadas con los diferentes estados fisiológicos de los reproductores. La más marcada es en la época de reproducción, donde la mayoría de los ejemplares reducen la ingestión del alimento y utilizan todas sus reservas nutritivas en la formación y maduración de gametos, a excepción de los machos y de las hembras que aun no han madurado. Por tanto, la dieta en los reproductores debe



---

cuidarse especialmente para asegurar las reservas nutritivas durante el periodo de interpuestas o de descanso.

### **2.1.2 Control de la maduración**

La maduración gonadal del stock se induce mediante un cambio brusco del fotoperiodo (de 8 a 16 horas luz /diarias). Al mes y medio del cambio de fotoperiodo se realiza un muestreo para determinar los estados de maduración gonadal y a los dos meses aproximadamente comienza la puesta. El periodo de maduración de ambos stocks esta separado en el tiempo, así el periodo de puesta del stock R3 empieza a finales de Enero y finaliza en Junio, mientras que el R4 empieza a finales de Octubre y termina en Enero. Esta programación se debe al hecho de no tener la instalación control de temperatura del agua de mar, se evitan los riesgos de tener puestas en verano, con sobremaduración o poca viabilidad (Fauvel *et al.*, 1992; 1993a), mortalidad postpuesta, enfermedades etc..

En la hembras de rodaballo, el inicio de la maduración es asincrónico, dependiendo de su estado fisiológico, y es facil de observar al ir aumentando el tamaño del ovario. Pueden distinguirse los siguientes estados de maduración:

**Estado 1:** cuando se observa un pequeño abultamiento en la parte posterior del ovario o en el comienzo del lóbulo posterior.

**Estado 2:** la dilatación se observa en toda la longitud del lóbulo posterior.

**Estado 3:** o de prepuesta, el lóbulo anterior está también dilatado, y se observa toda la parte abdominal hinchada.

**Estado 4:** se inicia la puesta

**Estado 5:** o de postpuesta, se inicia la regresión gonadal.

La duración de estos estados varían de unos ejemplares a otros, por lo que se realiza un seguimiento semanal de cada hembra desde el inicio de la maduración hasta que empieza la puesta. A continuación, cada hembra se controla diariamente para determinar su ritmo de ovulación que suele ser normalmente de 2, 3 ó 4 días. A partir del momento en que se conoce su ciclo de ovulación, la hembra sólo se saca del tanque el día del ciclo previsto para obtener los huevos por presión abdominal, de esta forma se aumenta el rendimiento y se evita la sobremaduración.

En el caso de los machos, los testículos son pequeños y están en la parte anterior del abdomen, situados a cada lado de la cavidad visceral, y de ellos parten los conductos eferentes que terminan en el poro genital muy próximo al ano. Aunque a lo largo del año es posible obtener pequeñas cantidades de esperma, es en la maduración gonadal de las hembras cuando los machos están fluyentes y emiten mayores cantidades de esperma al presionar suavemente ambos testículos en dirección al poro genital.

Finalizado el periodo de puesta, se realiza un muestreo postpuesta para determinar la necesidad de algún tratamiento, ajuste de la alimentación y se vuelve a modificar el fotoperiodo para el periodo de reposo (8 h Luz:16 h Oscuridad). Se recomienda un

---

periodo de reposo entre seis y siete meses antes de la siguiente maduración, ya que períodos más cortos reducen la viabilidad de las puestas.

### 2.1.3 Obtención de huevos

Diariamente se obtienen los huevos por presión abdominal de las hembras, según el ritmo de ovulación de cada ejemplar, y que varía entre generalmente 48 ó 96 horas (Fig.2). La hembra una vez sacada del tanque, se sitúa en una mesa donde al taparle los ojos, se reduce el estrés y se facilita la manipulación de la hembra al mantenerse tranquila. A continuación, se realiza manualmente la presión abdominal mediante un masaje desde la parte posterior a la anterior de la gónada, con la precaución de no provocar daños en los ejemplares. Sin embargo, es conveniente extraer el máximo de huevos recién ovulados para evitar la sobremaduración que se produciría al permanecer en el ovario hasta la siguiente extracción.

Los huevos se recogen en un recipiente de plástico que debe estar limpio y seco, ya que los huevos del rodaballo, como los de otros peces, se activan en contacto con el agua de mar y se produce una reacción cortical que les hace impenetrables al esperma. A continuación, se valora la calidad de las puestas para decidir si van a ser o no utilizadas.



Figura 2. Obtención de huevos por presión abdominal de hembras maduras.

### 2.1.4 Obtención de esperma

La manipulación del macho se realiza de la misma forma que con las hembras. El esperma se obtiene por presión abdominal de los machos fluyentes, ejerciendo una suave presión desde el interior de la cavidad abdominal hacia el poro genital. Sin embargo, antes de recoger el esperma, es fundamental eliminar la orina para evitar contaminaciones que alteren los resultados de la valoración de la calidad del esperma y su posterior conservación en el caso de que sea de buena calidad. Una vez eliminada la

orina, se seca el poro genital con papel absorbente y se recoge con cuidado el esperma mediante una jeringuilla de 1-mL desprovista de aguja y se guarda en hielo picado a 0° C hasta su valoración y posterior uso (Fig. 3).



**Figura 3.** Obtención de esperma por presión abdominal de machos fluyentes.

#### 2.1.5 Valoración de la calidad de gametos

El criterio de calidad de los huevos se basa principalmente en la viabilidad del huevo para producir larvas (Kjorsvik *et al.*, 1990), y consiste en observar que los huevos de la puesta son perfectamente esféricos (mayor o igual a 1 mm de diámetro), translúcidos, con una gota de grasa y sin espacio perivitelino. La viabilidad de los huevos se realiza mediante observación microscópica estereoscópica sobre una muestra de 0,5 mL de la puesta, tomada con una micropipeta Gibson, en placa de contaje Boronov, y se determina la tasa de viabilidad ( $n^o$  de huevos viables/  $n^o$  total de huevos x 100).

Además, se realizan otras valoraciones de la puesta como el número de total de huevos y la medición del pH. El número total de huevos se determina por volumetría, introduciendo los huevos en una probeta graduada, y se calcula multiplicando el número de total de huevos/ mL, obtenidos anteriormente, por el volumen. La medición del pH indica si los huevos son recién ovulados, con valor de 8, o si hay sobremaduración al descender a 7 (Fauvel *et al.*, 1993b). Generalmente, se utilizaron puestas superiores a 50 cc y con viabilidades superiores al 70%.

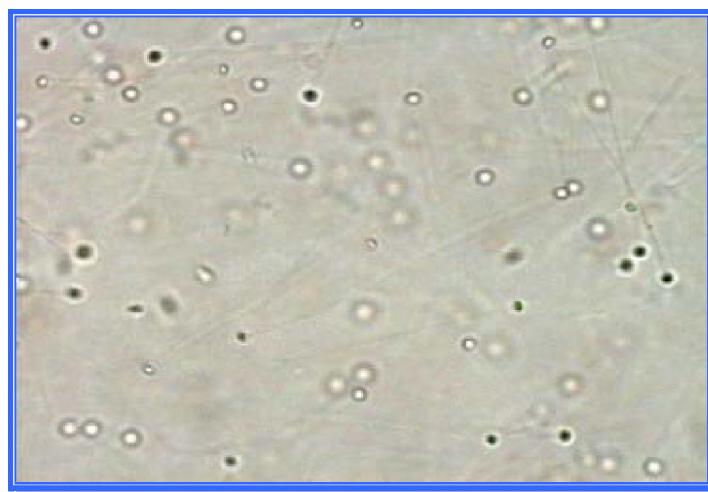
La calidad del esperma se valora en función de la densidad y movilidad por observación microscópica a 400X según los siguientes protocolos estandarizados (Chereguini *et al.* 1992a, b; 1995):

La densidad se valoró mediante el recuento de espermatozoides por mL., con cámara de Thoma o Neubauer, tras una dilución 1:20 del esperma en una solución de formólico al 1% con bicarbonato sódico (5 g L<sup>-1</sup> de solución de formólico). La solución resultante es diluida otra vez a 1:20 y posteriormente se realiza el conteo.

La movilidad se determina a partir de una dilución 1:5 del esperma en la solución inactivante Ringer 200 mOsmol L<sup>-1</sup>, y su posterior activación, que se induce al añadir agua de mar a 4° C mediante otra dilución 1:20 del esperma inmovilizado con el agua. Inmediatamente la movilidad se cuantifica según la tabla de Sánchez- Rodriguez (1975), que va desde 0 a 5 dependiendo del porcentaje de espermatozoides que presenten movimientos rápidos:

- 0** - Todos los espermatozoides son inmóviles.
- 1** - Los espermatozoides presentan una ligera agitación y alguno se desplaza.
- 2** - 20-40% de espermatozoides se desplazan rápidamente, otros lentamente y la mayoría inmóviles.
- 3** - 40-60 % de espermatozoides se desplazan rápidamente, otros lentamente y algunos inmóviles.
- 4** - 60-80% de espermatozoides se desplazan rápidamente, mientras que otros lo hacen con desplazamientos lentos.
- 5** - 80-100% de espermatozoides se desplazan rápidamente

Esta operación ha de realizarse rápidamente ya que con el tiempo la movilidad del espermatozoide va decreciendo. Los espermas con movilidades inferiores a 3 fueron descartados (Fig. 4).



**Figura 4.** Movilidad de espermatozoides de rodaballo

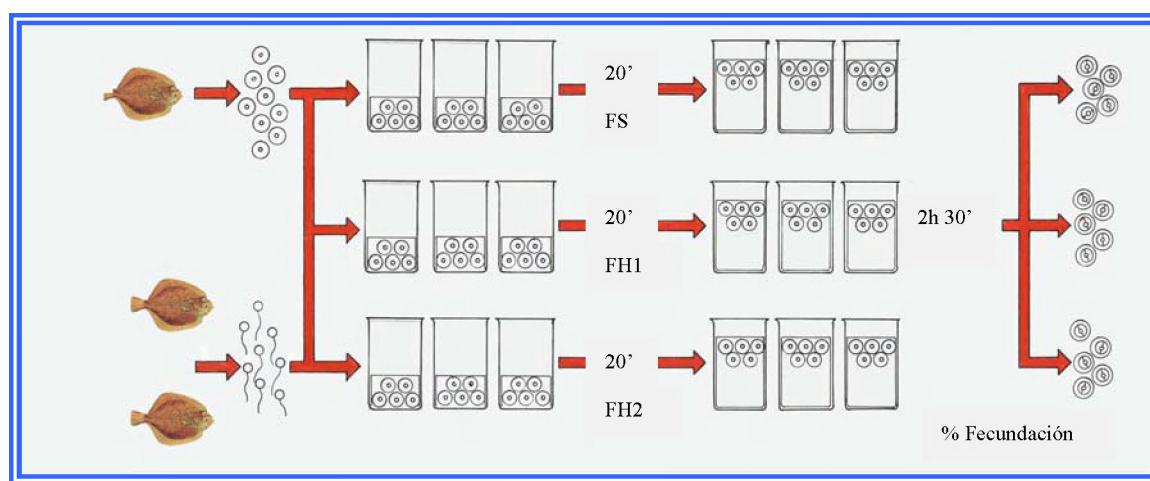
## 2.2 DISEÑOS EXPERIMENTALES

### 2.2.1 Fecundación artificial

#### 2.2.1.1 Métodos de fecundación artificial

A partir de los diferentes resultados obtenidos en la fecundación artificial del rodaballo, se realizó un diseño experimental para comparar tres métodos de fecundación comúnmente utilizados en “hatcheries” comerciales con el fin de determinar cual era el más adecuado, usándose como criterio de evaluación la tasa de fecundación obtenida.

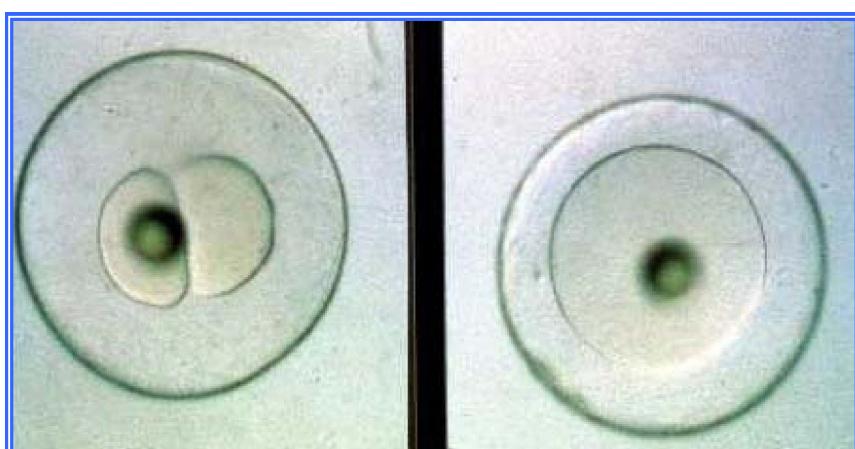
Este estudio se realizó con 13 puestas obtenidas a partir de diferentes hembras. La puesta de cada hembra, una vez valorada, fue dividida mediante una micropipeta Gibson en nueve lotes de 5 mL de huevos ( $900 \text{ mL}^{-1}$ ) y se situaron en vasos de precipitado de 100 mL. De estos, tres lotes fueron fecundados mediante el método de fecundación en seco (FS) y los otros seis lotes se fecundaron mediante el método de fecundación húmeda (FH), añadiendo agua de mar en diferentes proporciones huevos/agua de mar. Debido al pequeño volumen de esperma que se obtiene al presionar los machos y a su variabilidad (Suquet *et al.*, 1994), el esperma utilizado fué una mezcla o “pool” del esperma de dos machos diferentes, para asegurar una buena fecundación. La cantidad del pool de esperma utilizada en la fecundación artificial (FA) fue de 25  $\mu\text{L}$ , ya que la relación esperma / huevo generalmente utilizada en nuestro centro es de 1mL por cada 200 mL de huevos extraídos. En todas las fecundaciones realizadas en este estudio con cada puesta se utilizó un pool de esperma diferente (Fig.5).



**Figura 5.** Esquema de los tres métodos de fecundación artificial (FS; FH1 y FH2) que se compararon en este trabajo.

El método FS consistió en añadir el esperma a los huevos, y después de unos 20 minutos de contacto de ambos, previamente homogeneizada la mezcla, se añadió 100 mL de agua de mar, y a continuación se incubó a temperatura ambiente. El método FH se realizó poniendo el esperma en contacto con los huevos e inmediatamente se añade agua de mar para activar el esperma, en dos proporciones huevos/agua de mar diferentes: 2V/V (FH1; 2,5 mL) y V/V (FH2; 5 mL). Después de 20 minutos de contacto del esperma - agua de mar- huevos, se añadió 100 mL de agua de mar y se incubó a temperatura ambiente.

Después de 2 horas y media de incubación, se tomaron dos aliquotas de cada lote que se situaron en una placa de contaje Boronov y se determinó mediante observación microscópica la tasa de fecundación. La tasa de fecundación fue calculada como el número de huevos con 2 ó 4 blastómeros por número total de huevos (Fig. 6), contando un mínimo de 100 huevos en cada aliquota de cada lote.



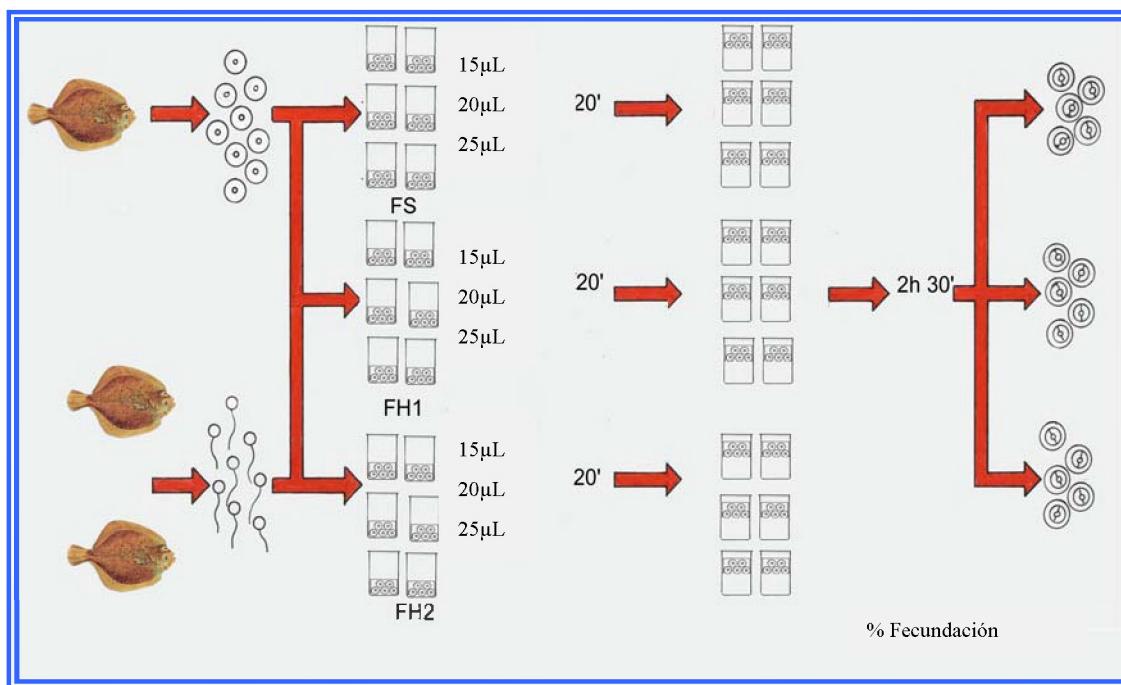
**Figura 6.** Huevo fecundado con dos blastómeros (izquierda) y huevo sin fecundar de rodaballo.

#### **2.2.1.2 Determinación de la relación óptima esperma-huevo según el método de fecundación.**

Durante el periodo de puesta del rodaballo, en que se realizó el estudio de FA usando los tres métodos descritos anteriormente (FS, FH1 y FH2), se utilizaron también diferentes volúmenes del pool de esperma (15 a 25  $\mu$ L). Esta experiencia se diseñó para determinar la cantidad óptima de espermatozoides que debe emplearse para fecundar un huevo según el método de fecundación que se utilice. En esta experiencia se emplearon 21 puestas, y en 15 de ellas los tres métodos de fecundación fueron usados simultáneamente.

Para cada método de fecundación, se realizaron seis lotes de 5 mL de huevos ( $900 \text{ huevos mL}^{-1}$ ) por puesta valorada, que se situaron en vasos de precipitado de 100 mL con una micropipeta Gibson, y fueron fecundados por duplicado con distintos volúmenes del pool de esperma (15  $\mu$ L a 25  $\mu$ L) para obtener diferentes relaciones de

esperma- huevo. Después de 20 minutos de contacto del esperma con los huevos, se añadieron 100 mL de agua de mar, y se incubó a temperatura ambiente (Fig. 7)



**Figura 7.** Esquema de las fecundaciones artificiales con diferentes cantidades de esperma (15, 20 y 25 µL)

En total en este estudio se realizaron 306 fecundaciones artificiales, de las cuales 126 fueron empleando el método FS y 90 utilizando los métodos FH1 y FH2 respectivamente.

Las tasas de fecundación se determinaron como se ha descrito ya anteriormente. Para calcular la relación esperma-huevo, se dividió el número de espermatozoides utilizado en la fecundación por el número total de huevos. El número de espermatozoides utilizado para fecundar un huevo se calculó a partir del volumen y la densidad del pool de esperma utilizado.

## 2.2.2 Conservación de esperma a corto plazo o preservación

### 2.2.2.1 Estudio de factores implicados en la conservación de esperma a corto plazo

En este estudio se comparó el efecto de diferentes diluyentes sobre la supervivencia de los espermatozoides de rodaballo, después de su conservación a corto plazo (varios días) bajo diferentes condiciones de temperatura y atmósfera. Las condiciones óptimas



---

de conservación a corto plazo de esperma se confirmaron con fecundaciones artificiales. Este estudio se realizó mediante tres experimentos:

El primero se diseñó para comparar la supervivencia de los espermatozoides al guardar el esperma durante varios días bajo una atmósfera de aire, oxígeno ó nitrógeno, ya que en muchos casos se recomienda no poner oxígeno en la muestra de esperma para evitar la activación espontánea de éste y el consumo del ATP, que está relacionado con la movilidad.

Se obtuvo esperma de seis machos diferentes, evitándose la contaminación por orina ya que fue imposible canular el ureter de los peces. Previamente, se chequeó la movilidad del esperma para lo cual se realizó una predilución de 20  $\mu$ L de esperma en 80  $\mu$ L de la solución inactivante Ringer 200 mOsm  $L^{-1}$ , posteriormente se tomó 1  $\mu$ L de dicha dilución y se activó con 19  $\mu$ L de agua de mar con albúmina de suero bovino BSA (5 mg/mL). Esta proteína se añadió para evitar la aglutinación del esperma en la solución inactivante y facilitar la valoración de la movilidad (Chauvaud *et al.*, 1995). A continuación, se repartieron 500  $\mu$ L de esperma de cada macho en tres tubos de plástico: uno control sin gas y a los otros dos se les inyectó O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>. Los tubos se incubaron ó conservaron horizontalmente a 6°C, y se chequeó la movilidad del esperma a las 3, 20, 28, 46 y 60 horas del comienzo de la incubación mediante una cámara de video. La movilidad de cada muestra fue valorada por 5 personas y la movilidad media fue la media de las cinco observaciones independientes. Cada vez que se chequeaba el esperma, se inyectaba más O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> a los tubos con dicha atmósfera.

En el segundo experimento, se comparó la supervivencia del esperma de rodaballo diluido en tres diferentes medios (Ringer 200, ASL y ASL2) y guardado a 6°C durante 48 horas desde su obtención. Las composiciones de los diluyentes se muestran en la Tabla II. El pH de los diferentes medios se estabilizó aproximadamente a 8, ya que las medidas de pH registradas del líquido seminal eran de 7,9 frente a los valores obtenidos de 7,31 por Suquet *et al.* (1993). Para ello, se obtuvo esperma de seis machos diferentes, y se diluyeron 100  $\mu$ L de esperma de cada macho en 900  $\mu$ L de cada diluyente, excepto el control que no llevaba ningun diluyente. Se realizaron tests de movilidad antes de comenzar la conservación (T = 0), y a diferentes tiempos de su conservación, del mismo modo que en la experiencia anterior.

En el tercer experimento, se estudió el efecto de la temperatura a 0, 6, 15 y 20°C durante la conservación del esperma diluido en los mejores medios seleccionados en el segundo experimento. Se realizaron tests de movilidad a diferentes periodos de tiempo de su conservación.

**Tabla II.** Composición de los diferentes medios utilizados en la conservación a corto plazo: Ringer 200 es una modificación de la solución salina Ringer de peces (Rana & McAndrew, 1989), ASL es la composición artificial del líquido seminal formulado por Dreanno & Billard (datos no publicados) y el ASL2 es una modificación del ASL. Tris: Tris (hidroximetil) aminometano; BSA: albúmina de suero bovino

	RINGER 200	ASL	ASL2
Cl Na (mM)	74,0	85,0	70,0
Cl K (mM)	27,0	1,5	1,5
CO <sub>3</sub> HNa (mM)	1,6		25,0
Cl <sub>2</sub> Ca (mM)	1,8	2,7	2,7
Cl <sub>2</sub> Mg (mM)		6,1	6,1
Glucosa (mM)		0,4	0,4
Tris (mM)		20,0	
BSA (mg.mL <sup>-1</sup> )		10,0	10,0
pH	8,1	8,2	7,9
Osmolaridad (mOsm. L <sup>-1</sup> )	204,0	200,0	205,0

Las condiciones óptimas para la conservación a corto plazo del esperma de rodaballo obtenidas en este estudio, se confirmaron mediante fecundaciones artificiales que se realizaron en la Planta experimental de peces del IFREMER en Brest (Francia), según el método del centro (Suquet *et al.*, 1995). El esperma obtenido de 6 ejemplares se guardó durante 6 días, y las fecundaciones con cada esperma se realizaron por triplicado al día 3 y 6 desde su obtención, utilizando 6000 espermatozoides por huevo. A las 2 horas y media de incubación, se determinaron las tasas de fecundación obtenidas con el esperma conservado, que se expresaron como un porcentaje de una muestra control (tasa de fecundación de los mismos huevos con un pool de esperma fresco de tres machos cuya movilidad se chequeó previamente).

### 2.2.2.2 Puesta a punto del método de conservación o preservación

Una vez confirmadas las condiciones óptimas de conservación a corto plazo del esperma, era necesario poner a punto el método para la transferencia a “hatcheries” comerciales, por lo que debe determinarse cual de las diluciones esperma- diluyente era la más adecuada para la conservación. Para ello se realizaron dos experimentos.

En el primero se compararon las tasas de fecundación obtenidas utilizando cinco diluciones diferentes de esperma-diluyente. Se realizó con esperma de 9 ejemplares y 4 puestas de hembras diferentes. Se tomó 5 µl de cada muestra de esperma y mezcló, por triplicado, con 95, 195, 295, 395 y 495 µL del diluyente Ringer 200 mOsm.L<sup>-1</sup> a fin de obtener cinco diferentes relaciones de 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 y 1:100, volumen de esperma: volumen diluyente.



---

La puesta de cada hembra se dividió en 15 lotes de 1 mL de huevos, que se introdujeron en frascos cilíndricos de 35 mL. A continuación fueron fecundados con las cinco diluciones de esperma, de acuerdo al protocolo estandarizado para la FA, añadiendo diferentes volúmenes de agua de mar en función de los volúmenes de esperma- diluyente, para obtener el mismo volumen final de fecundación. Después de 3 minutos de contacto del esperma con los huevos, se incubó a temperatura ambiente. A las 2 horas y media de incubación, una alícuota de cada frasco se pasó a una placa de conteo Bororov, y se determinaron las tasas de fecundación tal como se ha descrito anteriormente, contando un mínimo de 200 huevos en cada alícuota.

El objetivo del segundo experimento, tras los resultados obtenidos en el primero, fué determinar si el esperma diluido y almacenado tenía algún efecto sobre la tasa de fecundación, por lo que se compararon las tasas de fecundación obtenidas utilizando la dilución de esperma menor (1:20) y la mayor (1:100) almacenadas o conservadas desde 0 a 144 horas. Este segundo experimento se realizó con el esperma de 5 ejemplares.

El primer día (0 horas) se prepararon una serie de tubos Eppendorf con 5  $\mu$ l de esperma cada uno, y se mezcló con diferente cantidad de diluyente para obtener las dos relaciones 1:20 y 1:100, para todas las horas que se iban a utilizar y se guardaron a 6°C. Por otro lado, se prepararon una serie de triplicados de 1 mL de huevos de dos hembras diferentes, en frascos cilíndricos de 35 mL, que a su vez fueron fecundados, con 5  $\mu$ L de esperma fresco no diluido y con las dos diluciones de esperma preparadas. Después de 3 minutos de contacto del esperma- huevo, se añadieron 30 mL de agua de mar, y se incubaron a temperatura ambiente. A las 2 horas y media de incubación, las tasas de fecundación de los huevos de cada hembra se determinaron como ya se ha descrito anteriormente.

Estas fecundaciones artificiales fueron repetidas durante seis días, utilizando huevos de dos hembras diferentes, con las diluciones de esperma guardadas. Sin embargo, para confirmar la viabilidad de los huevos, que previamente ya se había valorado por observación microscópica, se fecundaron con 5  $\mu$ L de esperma fresco de otro macho diferente como control diario de las hembras, y cuando las tasas de fecundación obtenidas eran inferiores al 60%, los huevos se descartaban.

### **2.2.2.3 Tasas de fecundación y eclosión utilizando el método de conservación o preservación**

El objetivo de este estudio era confirmar las tasas de fecundación y eclosión utilizando el método de conservación de esperma puesto a punto desde 0 a 144 horas, usando la dilución óptima esperma-diluyente obtenida en los anteriores experimentos (1:20), con el mayor número de machos para su transferencia a “hatcheries” comerciales. Este estudio se realizó con 26 muestras de esperma y se realizaron un total de 1212 fecundaciones artificiales con puestas procedentes de 56 hembras diferentes.

Previamente se valoró la calidad del esperma, e inmediatamente el esperma de cada macho fué distribuido, mediante una micropipeta Gibson, en 42 tubos Eppendorf con

el diluyente en una relación de 1:20 (5  $\mu$ L de esperma : 95  $\mu$ L de diluyente Ringer 200), guardándose a 6° C. El primer día (0 horas), se prepararon una serie de triplicados de 1 mL de huevos de dos hembras en frascos cilíndricos de 35 mL, que fueron fecundados con 5  $\mu$ L de esperma fresco no diluido y con la dilución de esperma del mismo macho. Después de los 3 minutos de contacto esperma-huevo, se añadieron 30 mL de agua de mar y se incubó a temperatura ambiente. A las 2 horas y media de incubación, se determinó la tasa de fecundación. Los huevos fecundados de cada hembra con el esperma no diluido y diluido se introdujeron en tanques de poliéster cilíndrocónicos de 1L, con renovación continua de agua filtrada por 1 $\mu$  (Cuno) a 15° C, para su incubación. A los 5-6 días se determinó la tasa de eclosión como el número total de larvas por el número total de huevos fecundados (Fig. 8).



**Figura 8.** Larva de rodaballo recién eclosionada.

Las siguientes fecundaciones se realizaron a lo largo de seis días con el esperma diluido conservado y con 5  $\mu$ L de esperma fresco de otro macho diferente como control diario de viabilidad de los huevos.

### 2.2.3 Conservación de esperma a largo plazo o crioconservación

#### 2.2.3.1 Estudio de factores implicados en la conservación a largo plazo de esperma para puesta a punto de la técnica

En este estudio se comparó la supervivencia de los espermatozoides de rodaballo después de la congelación- descongelación, utilizando diluyentes, crioprotectores no permeables, diluciones esperma-diluyente y tipos de contenedor diferentes en el proceso de la criocongelación. Los resultados obtenidos se confirmaron con fecundaciones artificiales. Este estudio se realizó mediante una serie de experimentos que se describen en los siguientes apartados:



### 2.2.3.1.1 Diluyente y crioprotector

El primer experimento se diseñó para comparar la supervivencia de los espermatozoides tras su crioconservación en los dos diluyentes anteriormente empleados, el medio Mounib y el medio Ringer 200; utilizando como crioprotector el dimetilsulfoxido al 10% del volumen final. Como crioprotectores no permeables se compararon la yema de huevo o leche descremada al 10% y 20% del volumen final, para estabilizar la membrana del espermatozoide durante la congelación.

El medio Mounib, que fue formulado para el esperma del salmón atlántico *Salmo salar* (Mounib 1978), utilizado con éxito con el bacalao *Gadus morhua* (Mounib *et al.*, 1968) y modificado por Legendre y Billard (1980), incluye como agentes crioprotectores un 10 % de la yema de huevo al telurito potásico (I.Pasteur), y un 10% de dimetil sulfóxido. La composición del medio Mounib se muestra en la Tabla III. El medio Ringer 200 es una nueva modificación del anterior medio de Ringer, para inmovilizar el esperma de rodaballo. A la composición del medio Ringer 200, que ya se mostró en la Tabla II, se añadió un 10 % de yema de huevo al telurito potásico (I.Pasteur), y un 10% de dimetil sulfóxido, como agentes crioprotectores.

**Tabla III.** Composición del medio Mounib, modificado por Legendre y Billard (1980).

Mounib	
Sacarosa	125 mM
Glutatio reducido	6,5 mM
CO <sub>3</sub> HK	100 mM
10% DMSO	
10% yema de huevo	
PH= 7,57	

Este experimento se realizó con esperma de 3 machos diferentes, se mezcló un volumen de cada esperma con 3 volúmenes de cada diluyente, manteniendo tanto el diluyente como el esperma sobre hielo picado a 0° C, durante el tiempo de la operación. Inmediatamente, sin dejar tiempo de equilibración, se llenaron pajuelas de 0,5 mL (IMV, L'Aigle, Francia), y se cerraron ambos extremos de la pajuela con pinzas de calor. Una vez selladas las pajuelas se congelaron y descongelaron según el siguiente protocolo (Chereguini *et al.* 1992a, b):

#### Congelación

La congelación se realiza sobre los vapores de nitrógeno líquido en una caja de poliestireno expandido que se ha llenado previamente con el nitrógeno, y que en su interior tiene un flotador del mismo material, en forma de catamaran, situado a 5 cm de la superficie del nitrógeno, en el que se colocan horizontalmente las pajuelas (Fig. 9). Una vez cerrada la caja se dejan las pajuelas durante 7 minutos, consiguiéndose una

tasa de congelación de  $-10^{\circ}$  C/min, registrada mediante un termopar LT Lutron TM-902C. A continuación se sumergen directamente en el nitrógeno hasta su uso. En este estudio se dejaron sumergidas solo 5 minutos ya que había que descongelar a continuación para realizar las fecundaciones artificiales. Sin embargo, en otros casos se guardan directamente en los contenedores de almacenamiento de nitrógeno líquido hasta su utilización.



**Figura 9.** Crioconservación de esperma de rodaballo *Scophthalmus maximus*

### Descongelación

La descongelación se realiza sumergiendo las pajuelas en un baño María Selecta programado a  $40^{\circ}$  C durante 7 segundos. Una vez descongelada la pajuela, se abrió cortando los extremos y se vació en un Eppendorf para valorar la movilidad. La movilidad de cada muestra fue valorada por 5 personas y la movilidad media fue la media de las cinco observaciones independientes.

Posteriormente, se crioconservó el esperma de 8 machos diferentes utilizando el mejor diluyente y crioprotector no permeable obtenidos en el estudio, y esos resultados se confirmaron con fecundaciones artificiales con esperma crioconservado y fresco del mismo macho, como control.

#### **2.2.3.1.2 Dilución**

El segundo experimento se diseñó para comparar las tasas de fecundación obtenidas en las fecundaciones artificiales realizadas con esperma crioconservado, utilizando en la crioconservación dos diluciones esperma-diluyente diferentes: la dilución habitualmente empleada (1:2) y una dilución menor del esperma en el diluyente (1:1),



---

con el fin de aumentar el volumen de esperma a la hora de crioconservar. Este estudio se realizó con 28 machos diferentes.

El método de crioconservación fue idéntico al utilizado en el apartado anterior, pero se prepararon dos tipos de pajuelas con diferente dilución esperma-diluyente. Se tomaron 200  $\mu$ L de esperma de cada macho, de los cuales 100  $\mu$ L se diluyeron en la proporción 1:1 con el diluyente con crioprotector y los otros 100  $\mu$ L en una dilución esperma-diluyente 1:2.

Los huevos utilizados en la fecundación artificial procedían de la puestas de 26 hembras diferentes. Lotes de 1 mL de huevos de cada puesta fueron introducidos en frascos de plástico de 30 mL, y fecundados por triplicado, de acuerdo al protocolo estandarizado de la FA, con 10  $\mu$ L del esperma crioconservado en el caso de la pajuela con dilución esperma-diluyente 1:1 y con 15  $\mu$ L en el caso de la pajuela con dilución 1:2. Despues de los 3 minutos de contacto esperma -huevo, se añadió agua de mar y se incubó a temperatura ambiente. A las 2 horas y media, se determinaron las tasas de fecundación. El número total de fecundaciones realizadas fue de 110.

#### **2.2.3.1.3 Tipo de contenedor**

El tercer experimento se diseñó para comparar las tasas de fecundación obtenidas en las FA con esperma crioconservado en dos tipos de contenedores de diferente capacidad, ya que la congelación de un mayor volumen de esperma es muy interesante desde un punto de vista práctico para las empresas productoras de rodaballo. Sin embargo, para el uso de recipientes de mayor diámetro a la hora de congelar debe realizarse una adaptación de la técnica de crioconservación que utiliza volumenes menores, ya que las tasas de congelación utilizadas serían menores, aumentaría el daño celular y se reduciría la capacidad fecundante del esperma crioconservado. Por lo que en este estudio, se ha congelado esperma de 27 machos diferentes utilizando las pajuelas tradicionales de 0,5 mL y criotubos de 2 mL (Delta-Lab), tras una modificación de la técnica habitual, y determinado la viabilidad del esperma descongelado mediante fecundaciones realizadas con huevos procedentes de 14 hembras diferentes, contrastándose además con la calidad de los huevos fecundados con esperma fresco.

El método de crioconservación, en el caso de las pajuelas, fue el descrito anteriormente, pero utilizando una dilución esperma-diluyente de 1:1 debido a los resultados obtenidos en el apartado anterior. En el caso de los criotubos, una vez llenos con el esperma y el diluyente con crioprotector en una dilución 1:1, la congelación se realizó situando los criotubos horizontalmente sobre un flotador con red (Fig. 10) a 1 cm de los vapores de nitrógeno líquido durante 20 minutos, consigiéndose una tasa de congelación de - 15° C/min, registrada mediante un termopar LT Lutron TM-902C. A continuación se sumergieron en nitrógeno líquido durante 5 minutos. La descongelación se realizó sumergiendo el criotubo en el baño María, pero a una temperatura de 70° C durante 1 minuto y 30 segundos. A continuación se realizaron las fecundaciones artificiales.



**Figura 10.** Congelación de esperma en criotubos

Los lotes de 1 mL de huevos de cada puesta se introdujeron en frascos de plástico de 30 mL, y fueron fecundados por triplicado con 5  $\mu$ L de esperma fresco, y con 10  $\mu$ L del esperma crioconservado de la pajuela y del criotubo, siguiendo el protocolo de FA estandarizado. Posteriormente, tras 3 minutos de contacto esperma -huevo, se añadió agua de mar y transcurridas 2 horas y media de incubación a temperatura ambiente, se determinaron las tasas de fecundación. Posteriormente se procedió a la incubación en los incubadores de 1L y al cabo de cuatro o cinco días, se determinaron las tasas de eclosión. El número total de fecundaciones realizadas en este estudio ha sido de 386.

#### **2.2.3.2 Tasas de fecundación y de eclosión de huevos utilizando el método de crioconservación**

Este estudio se realizó congelando el esperma de 49 machos diferentes para confirmar o validar la viabilidad del esperma descongelado mediante fecundaciones artificiales realizadas con huevos procedentes de 29 hembras diferentes, contrastándose además la calidad con la de los huevos fecundados con esperma fresco. Esta confirmación era necesaria para la transferencia a “hatcheries” comerciales.

Se tomaron 100  $\mu$ L del esperma de cada macho y se mezclaron con el diluyente, en proporción 1:2 (V:V), manteniéndolo tanto el diluyente como el esperma sobre hielo picado a 0° C. A continuación se llenaron pajuelas de 0,5 mL, se cerraron y se crioconservaron según la técnica puesta a punto anteriormente, pero en el diluyente (medio de Mounib) se sustituyó yema de huevo al telurito potásico (I.Pasteur), por su menor caducidad, por albúmina de suero bovino (Sigma) ya usada por Suquet *et al.* (1999).

Los lotes de 1 mL de huevos de cada puesta se introdujeron en frascos de plástico de 30 mL, y fueron fecundados por triplicado con 5  $\mu$ l de esperma fresco y con 15  $\mu$ l de esperma crioconservado, debido a la dilución 1:2, según el protocolo estandarizado. Tras 3 minutos de contacto esperma -huevo, se añadió agua de mar y se incubó a temperatura ambiente. A las 2 horas y media, se tomó una alicuota de cada frasco o replicado y se determinaron las tasas de fecundación para cada fecundación y macho.

Posteriormente se procedió a la incubación en incubadores cilindrocónicos de poliéster de 1L con flujo continuo de agua de mar filtrada por filtros Cuno de 1 $\mu$  (Fig. 11). A los cuatro o cinco días de incubación, se determinaron las tasas de eclosión (nº de larvas / nº huevos fecundados). El número total de fecundaciones realizadas en este estudio ha sido de 1153.



**Figura 11.** Sistema de incubadores de poliéster con capacidad de 1L con renovación continua de agua de mar filtrada por 1 $\mu$ .

#### **2.2.4 Evaluación del crecimiento de larvas obtenidas con esperma crioconservado**

Este estudio se diseñó para comparar el crecimiento, en longitud y peso, de las larvas obtenidas por fecundaciones artificiales con esperma fresco y crioconservado, con el fin de asegurar el crecimiento y desarrollo de las larvas antes de la transferencia de la técnica de crioconservación a “hatcheries” comerciales.



#### **2.2.4.1 Fecundaciones artificiales con esperma fresco y crioconservado del mismo macho**

Se realizaron con esperma de 4 machos diferentes y 4 puestas de tres hembras. Para ello, se tomaron 250  $\mu$ L de esperma de cada macho, que fueron mezclados con el diluyente en una dilución 1:2 y se prepararon pajuelas que se crioconservaron según la técnica puesta a punto anteriormente. Por otro lado, la puesta de cada hembra se dividió en dos lotes de 40 mL en vasos de precipitado de 2 L, y fueron fecundados con 250  $\mu$ L de esperma fresco o crioconservado del mismo macho según el protocolo de fecundación estandarizado. Cada puesta fue fecundada con un macho diferente.

A las dos horas y media se determinaron las tasas de fecundación en cada vaso y los huevos fecundados con esperma fresco o crioconservado se introdujeron en tanques circulares de poliéster de 200 L con fondo cónico, provistos de sistemas de airación y recirculación de agua filtrada por 1  $\mu$  con flujo de 75 L  $h^{-1}$ . A los cuatro o cinco días se determinaron las tasas de eclosión.

#### **2.2.4.2 Cultivo larvario de rodaballo producido con esperma fresco y crioconservado**

Una vez que las larvas reabsorvieron el saco vitelino y abrieron la boca, comenzó la fase de alimentación viva del cultivo. Antes de esta alimentación, se cerró el circuito de agua y se introdujo en los tanques el alga *Isocrysis galbana* a una densidad de  $150 \times 10^3$  células por mL. Durante esta fase, los tanques se iluminaron con 2.000 lux en superficie. Este método de cultivo intensivo utilizado, es conocido como técnica de aguas verdes (Olmedo, 1995). La primera fase de alimentación viva (día 0) se realizó con rotífero *Brachionus plicatilis*, y a partir del día 7 de vida se alimentaron con nauplios de Artemia hasta el día 14 en que la alimentación se cambió a metanauplios de Artemia hasta el día 31 de vida, en donde las larvas estaban ya prácticamente destetadas siendo pasadas a la fase de alimentación inerte a base de pienso seco. Este último día las larvas fueron muestreadas en longitud y peso húmedo. Previamente, los rotíferos y Artemia de 24 horas fueron enriquecidas con productos comerciales ricos en ácidos grasos w3 de cadena larga (Protein y Superselco de INVE), respectivamente.

Para comparar el crecimiento de las larvas obtenidas en la fecundación con esperma fresco o crioconservado, antes del inicio de cada nueva etapa de alimentación descrita, se tomaron muestras de cada par de tanques, uno con larvas procedentes de fecundaciones realizadas con esperma fresco y otro con esperma crioconservado, para determinar la longitud total y el peso seco de la larva. La longitud se midió mediante un proyector de perfiles y el peso seco se midió con una microbalanza Mettler MT5 (Mettler Toledo SAE), después de lavarlas con agua destilada, y desecarlas 24 horas en estufa a 55° C. Estos datos se registraron a día 0, 7, 14 y 31 de cultivo larvario.



## **2.2.5 Evaluación de la supervivencia y crecimiento de alevines producidos con esperma crioconservado**

El propósito de este estudio era comparar la supervivencia y el crecimiento de alevines de rodaballo, obtenidos con esperma fresco o crioconservado, durante el primer año de vida, con el fin de garantizar el uso de las técnicas de crioconservación a “hatcheries” comerciales.

Se seleccionaron dos grupos de alevines de 4 meses de edad, resultantes de las fecundaciones realizadas con esperma fresco y crioconservado del estudio anterior. El grupo de esperma fresco (GF) fue distribuido al azar en tres tanques rectangulares de 1 m<sup>3</sup> con 30 ejemplares en cada uno, con circuito abierto (0.9 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>) donde crecieron durante 12 meses. El grupo crioconservado (GC) tambien se distribuyó de la misma manera. Los pesos medios iniciales de los grupos GF y GC fueron 22,87 ± 0,94 g y 24,48 ± 1,21 g, respectivamente.

Los alevines se alimentaron diariamente, normalmente dos veces al día, con una dieta compuesta por un 50% de harina comercial con vitaminas y minerales (Trouw S.A) y 50% de pescado triturado: lirio *Micromesistius potassou* y chicharro *Trachurus trachurus*. La dieta se preparaba semanalmente en el laboratorio, mezclando el pescado triturado con la harina, se hacían “pellets” y almacenaba a 8° C. La ración diaria fue calculada como un porcentaje de la biomasa total del tanque (6%).

Para comparar el crecimiento, en longitud y peso, todos los ejemplares fueron muestreados mensualmente. La mortalidad durante el engorde fue también registrada.

## **2.2.6 Conservación de huevos a corto plazo**

### **2.2.6.1 Estudio de diferentes parámetros que afectan la conservación de los huevos y de la capacidad a ser fecundados**

Este estudio se ha realizado conjuntamente en el IEO de Santander (España) y en IFREMER de Brest (Francia), con el fin de determinar el efecto de diferentes parámetros sobre la conservación a corto plazo de huevos de rodaballo recién obtenidos, es decir, sin fecundar. Los parámetros estudiados que podían afectar la conservación fueron: el volumen de huevos a conservar, la temperatura, el oxígeno, el diluyente, la adición de antibióticos y de un inhibidor de tripsina de soja, para evitar la activación del huevo. En este estudio se realizaron seis experimentos sucesivos, y cada uno de estos experimentos fue repetido utilizando cuatro puestas diferentes: dos puestas fueron trabajadas en el IEO (España) y otras dos en IFREMER (Francia).

Después de la obtención de la puesta y valorada la viabilidad de los huevos, según ya se ha descrito, lotes de 0,5 mL de huevos de cada puesta se distribuyeron en frascos cilíndricos de 30 mL y se guardaron a 13° C. El esperma utilizado en este estudio fue previamente congelado en pajuelas, según la técnica anterior, para que la calidad inicial del esperma se mantuviera durante un periodo de 45 horas. Durante este periodo, los lotes de huevos conservados a 13° C fueron fecundados, por triplicado,

con el esperma descongelado a las 0, 3, 9, 21, 27 y 45 horas desde su obtención por presión abdominal. En este estudio el método de fecundación artificial fue el utilizado por IFREMER (Suquet *et al.*, 1995) añadiendo 0,25 mL de agua de mar a 13° C, y el número de espermatozoides utilizado fue superior al usual, de 30.000 espermatozoides por huevo para asegurar la fecundación artificial. Además, en el IEO lotes de 0,5 mL de huevos una vez fecundados por duplicado, fueron transferidos a vasos de 1 L para su incubación, donde diariamente fué renovado el 50% del volumen de agua de mar; mientras que en IFREMER, los duplicados de huevos se transfirieron a incubadores cilindrocónicos de 1 L con una renovación de agua de 0,05 L min<sup>-1</sup> (Suquet *et al.*, 1996). A las 3 horas y media de la fecundación, se determinaron las tasas de fecundación de los triplicados sobre 200 huevos. A los 6 días a 13° C, se contaron las larvas y la tasa de eclosión se determinó como el número total de larvas dividido por el número de huevos transferidos a los incubadores y a vasos.

En el primer experimento, se estudió el efecto del volumen de huevos en la conservación usando dos volúmenes de 0,5 y 2,5 mL, donde la altura de la capa de huevos era de 2 y 5 mm, respectivamente.

El objetivo del segundo experimento fue determinar que temperatura se requería durante la conservación, por lo que los lotes de huevos se guardaron a 3° C (sobre hielo), 8° C (en un criostato) o 13° C (baño María).

En el tercer experimento se comparó la supervivencia de los huevos guardados bajo una atmósfera de aire u oxígeno. El oxígeno se inyectó durante 10 segundos a través de un tubo capilar insertado en la tapa del frasco, mientras que el aire del frasco salía a través de un segundo tubo, e inmediatamente se sellaron ambos tubos.

En el cuarto experimento, se estudió la composición del fluido ovárico con el fin de determinar la composición del diluyente a utilizar en la conservación de huevos. Primero, se determinó el ovatocrito (volumen celular x 100/ volumen total de la puesta) sobre seis puestas mediante la medición del diámetro de 30 huevos de cada puesta y entonces, se calculó el volumen medio del huevo considerando la célula como una esfera. El diámetro del huevo fue la media de dos diámetros observados sobre cada huevo, usando un proyector de perfiles Nikon V12. Segundo, se determinó la composición del fluido ovárico de varias puestas (n=57, obtenidas de 37 hembras), tras filtración y centrifugación de los fluidos ováricos a 3.500 g durante 5 minutos. La osmolaridad y el pH se midieron inmediatamente, y el sobrenadante se congeló a -28° C hasta la realización de los análisis químicos. La cantidad total de proteína, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup> y contenido de glucosa fueron determinados según los métodos ya descritos por Dreanno *et al.* (1998).

El efecto de un diluyente en la conservación de huevos se comparó mediante la adición o no de 0,5 mL de un fluido ovárico artificial (ClNa 97,4 mM, ClK 7,5 mM, Cl<sub>2</sub> Ca 2,1 mM, Cl<sub>2</sub> Mg 2,6 mM, albúmina de suero bovino 6,5 g L<sup>-1</sup>, CO<sub>3</sub> HNa 25 mM a pH 8,0, presión osmótica 250 mOsm.L<sup>-1</sup>). Para tener el mismo volumen final en la fecundación artificial, justo en el momento antes de fecundar se añadió 0,25 mL de agua de mar a los lotes de huevos que llevaban el fluido ovárico artificial y 0,75 mL a



los lotes sin fluido ovárico artificial. Por otro lado, al incrementarse el volumen total respecto al procedimiento general de este estudio, se utilizaron 48.000 espermatozoides por huevo en la fecundación.

En el quinto experimento, se estudió el efecto de los antibióticos durante la conservación de los huevos. La solución antibiótica-antimicótica utilizada (5  $\mu$ L, Sigma A 5955), contenía 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina y 25  $\mu$ g de anfotericina B por mL, y se añadió a la mitad de los lotes de huevos.

En el sexto y último experimento, se comparó la capacidad de conservación de los huevos utilizando tres condiciones diferentes en la conservación: lotes de huevos sin añadir el fluido ovárico artificial, lotes con fluido ovárico artificial, y lotes con fluido ovárico artificial con un 2% del inhibidor de tripsina de soja (Sigma T 9003). Para tener el mismo volumen final en la fecundación artificial, justo en el momento antes de fecundar se añadió el fluido ovárico a los lotes control, y el número de espermatozoides utilizados fue de 50.000 por huevo.

### 2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las tasas de fecundación obtenidas en la comparación de los métodos de fecundación seca y húmedas bajo dos condiciones diferentes, fueron previamente analizadas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de los datos. Al no haber normalidad en los datos, se aplicó el análisis no paramétrico de una vía de Kruskal-Wallis (6.1.3 SPSS programa, SPSS Inc., Madrid, España). Este análisis también se usó para comparar las tasas de fecundación de cada método con diferentes proporciones de esperma-huevo.

En el estudio de los factores implicados en la conservación de esperma a corto plazo, los datos obtenidos en todos los experimentos fueron analizados mediante el T-test de Wilcoxon para datos apareados no paramétricos. En la puesta a punto de la técnica de conservación de esperma a corto plazo y en el estudio realizado con dicha técnica, se compararon las tasas de fecundación y eclosión obtenidas, tras una transformación angular arco-seno, mediante un análisis de varianza de una vía. Cuando las diferencias fueron significativas, se compararon *a posteriori* mediante el test de Scheffe; y cuando el test de Kolmogorov-Smirnov indicó que los datos no eran normales, se analizaron mediante el análisis no paramétrico de una vía de Kruskal-Wallis.

Los datos obtenidos en el estudio de factores involucrados en la conservación de esperma a largo plazo fueron analizados en el caso del diluyente y crioprotector mediante el T-test de Wilcoxon para datos apareados no paramétricos; en el tipo de dilución esperma- diluyente, se compararon las tasas medias de fecundación obtenidas con esperma crioconservado mediante el test de T-Student y en el tipo de contenedor se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía. En el estudio realizado con esperma fresco y crioconservado utilizando la técnica puesta a punto, las tasas de fecundación y eclosión fueron sometidas a una transformación angular arco-seno para su normalización; y debido al amplio rango de tasas de fecundación obtenidas, las



---

tasas se analizaron mediante un chi-cuadrado, para lo cual se establecieron cuatro clases de porcentajes de fecundación, de acuerdo a los percentiles de la frecuencia de la fecundación. Las tasas de eclosión se compararon mediante el test de T-Student.

En la evaluación del crecimiento de las larvas obtenidas con esperma crioconservado de cuatro machos, las tasas de fecundación y eclosión, tras transformación angular, se compararon mediante el test de T-Student. La longitud y peso de las larvas obtenidas con esperma fresco y crioconservado a diferentes días de cultivo (0, 7, 14 y 31) de cada fecundación, se compararon mediante un análisis de varianza, y en aquellos casos que el test de Kolmogorov-Smirnov indicaba que los datos no se distribuían normalmente, se aplicó el análisis no paramétrico de una vía de Kruskal-Wallis. Todos los datos de crecimiento de las larvas obtenidas, con los dos tipos de esperma, en las cuatro fecundaciones fueron también comparadas a los diferentes días de cultivo (0, 7, 14 y 31).

Para determinar si había diferencias en las tasas de crecimiento larvario entre los dos grupos, los obtenidos con esperma fresco y los de crioconservado, el crecimiento en longitud y peso de cada par de tanques se ajustó a los siguientes ecuaciones exponenciales:

$$L_t = L_0 e^{gt}$$

$$W_t = W_0 e^{gt}$$

donde  $g$  es la tasa de crecimiento.

Estas ecuaciones se convirtieron en regresiones lineales transformando los datos en logaritmos neperianos, y fueron analizados mediante el test de T-Student para comparación de pendientes y elevaciones (Zar, 1984).

En el estudio sobre la supervivencia y crecimiento durante el primer año de vida de alevines, obtenidos por fecundaciones realizadas con los dos tipos de esperma, los datos de longitud y peso obtenidos mensualmente fueron comparados mediante el test de T-Student. Todos los datos sobre el crecimiento durante un año fueron también comparados mediante un análisis de varianza. Para determinar si había diferencias en las tasas de crecimiento de ambos grupos de alevines, el crecimiento en longitud y peso se ajustó a ecuaciones exponenciales y fueron comparadas mediante el test de T-Student para comparación de pendientes y elevaciones.

Las tasas de fecundación y eclosión obtenidas en el estudio de factores en la conservación de huevos, tras transformación angular, fueron comparadas mediante ANOVA de tres vías. Cuando las diferencias fueron significativas se compararon *a posteriori* mediante el test de Newman-Keuls. Además, la correlación entre las tasas de fecundación y eclosión fue probada mediante regresión lineal.



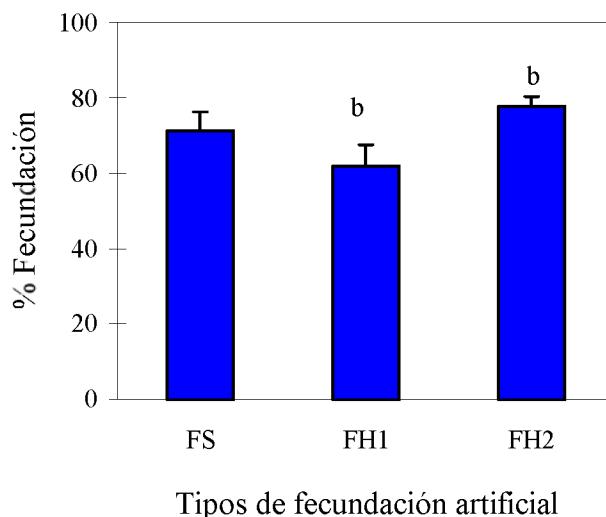
### **3. RESULTADOS**

### 3.1 FECUNDACIÓN ARTIFICIAL

#### 3.1.1 Métodos de fecundación artificial

Los resultados obtenidos en el estudio sobre diferentes métodos de FA del rodaballo se presentan en la Figura 12, que muestra las tasas de fecundación medias  $\pm$  SE. La tasa de fecundación media obtenida con el método FS fue del 71,3%; del 61,9% para el método FH1 y del 77,8% para el FH2.

Las mayores tasas de fecundación aparecen cuando la relación huevo/agua de mar era V/V (FH2), mientras que las tasas más bajas registradas fueron cuando la relación huevo/ agua de mar era 2V/V (FH1). Fueron encontradas diferencias significativas ( $p= 0,02$ ) entre los dos tipos de fecundación húmeda, FH1 y FH2. Sin embargo, no se encontraron diferencias ( $p= 0,72$ ) cuando se compararon las tasas de fecundación obtenidas con el método FS y el FH2.



**Figura 12.** Media y error estandar de las tasas de fecundación obtenidas con el método de fecundacion artificial seca (FS, n =126) y dos tipos de húmeda: 2V:V (FH1, n = 90) y V:V (FH2, n= 90). Las medias con la misma letra presentan diferencias significativas.

#### 3.1.2 Determinación de la relación óptima esperma- huevo según el método de fecundación.

La densidad de los diferentes “pools” de esperma varió entre 0,4 y  $5,18 \times 10^9$  espermatozoides  $\text{mL}^{-1}$ . Las movilidades variaron desde 1 a 5, según la escala de Sánchez-Rodríguez, es decir, entre el 20% y 100% de espermatozoides presentaron movilidades rápidas y progresivas, mientras que los “pools” con movilidad de 0 ( $< 20\%$ ) fueron descartados. Estos resultados se exponen en la Tabla III.

Para cada método de fecundación, se determinó la relación óptima esperma- huevo en función de las tasas de fecundación obtenidas, y para ello se establecieron cinco clases de relaciones de acuerdo a los percentiles de frecuencia de las relaciones esperma-

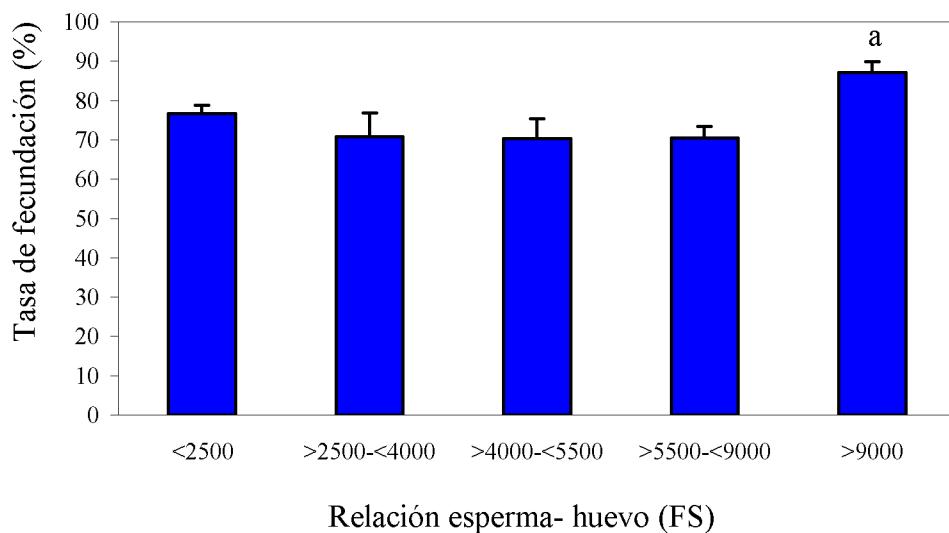
huevo usando el programa SPSS (Figs. 13 y 14). En el caso de los dos métodos FH, FH1 y FH2, las clases de relaciones espema- huevo coinciden ya que se realizaron el mismo número de fecundaciones artificiales. Sin embargo, en el caso de la FS las clases, según los percentiles, fueron diferentes al realizarse un mayor número de fecundaciones.

**Table III.** Densidades y movilidades de “pools” de esperma de rodaballo *Scophthalmus maximus* usados en el estudio sobre la determinación de la relación óptima esperma- huevo. (el “pool” es el esperma obtenido de dos machos).

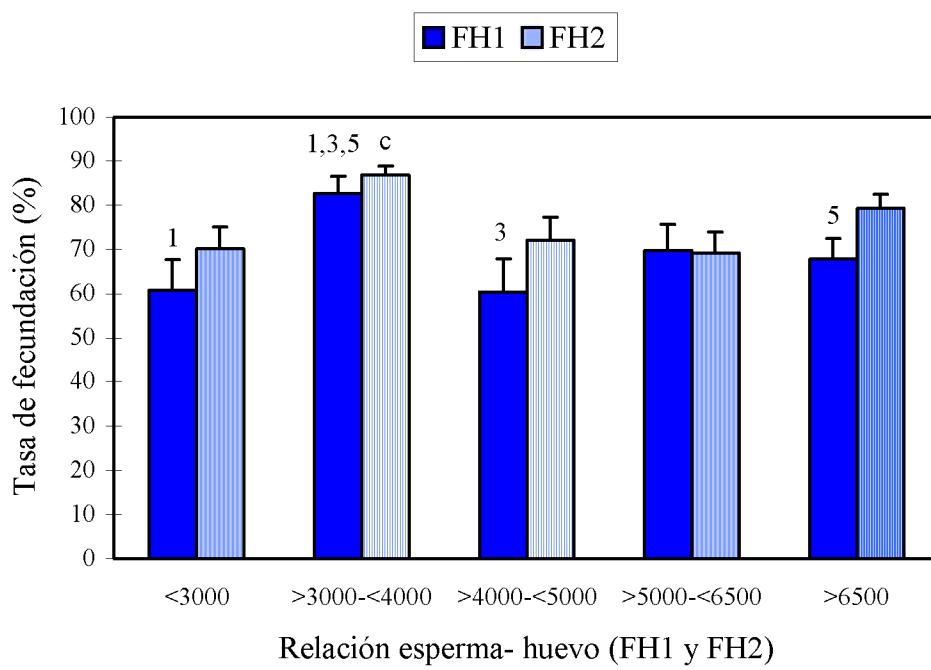
Pools	Densidad (nº espermatozoides x 10 <sup>9</sup> mL <sup>-1</sup> )	Movilidad escala 0-5
1	1,66	3-4
2	0,59	3
3	0,77	4
4	0,78	4
5	0,87	4-5
6	0,88	4-5
7	0,842	1-2
8	1,211	1
9	1,67	1
10	1,12	3-4
11	1,12	3-4
12	1,29	1-2
13	0,60	1-2
14	1,61	3
15	0,914	3
16	1,77	3
17	5,183	3
18	2,2	3
19	0,4	4-5
20	1,8	2-3
21	2,9	2-3

En la FS se encontró una tasa de fecundación del 87,2 %, significativamente mayor ( $p=0,0023$ ), cuando la relación esperma-huevo era superior a 9.000, como se muestra en la Figura 13.

La mayor tasa de fecundación fué de 86,8 % ( $p= 0,010$ ) en el caso de la FH2 cuando la relación esperma-huevo era entre 3.000-4.000. En el caso de la FH1, no se encontraron diferencias en las tasas de fecundación obtenidas ( $p= 0,053$ ) con las diferentes relaciones esperma-huevo usadas, aunque se encontraron algunas diferencias de significativas en las tasas de fecundación entre las diferentes clases de las relaciones esperma- huevo, como se muestra en la Figura 14 (1  $p= 0,009$ ; 3  $p= 0,021$ ; 5  $p= 0,026$ ).



**Figura 13.** Media y error estándar de las tasas de fecundación obtenidas con la fecundación artificial seca (FS) y las diferentes relaciones esperma- huevo. La media con la letra (a) es significativamente diferente de las otras.



**Figura 14.** Media y error estándar de las tasas de fecundación obtenidas con las fecundaciones artificiales húmedas (FH1 y FH2) con diferentes relaciones esperma-huevo. La media FH2 con la letra (c) es significativamente diferente de las otras, y las medias FH1 con el mismo número son tambien significativamente diferentes.

Independientemente del tipo de FH realizada, al comparar la totalidad de las tasas de fecundación obtenidas con las cinco clases de esperma- huevo, las mayores tasas de fecundación, 84,8 %, se encontraron cuando la relación esperma- huevo era entre >3.000-<4.000 (p=0,0004).

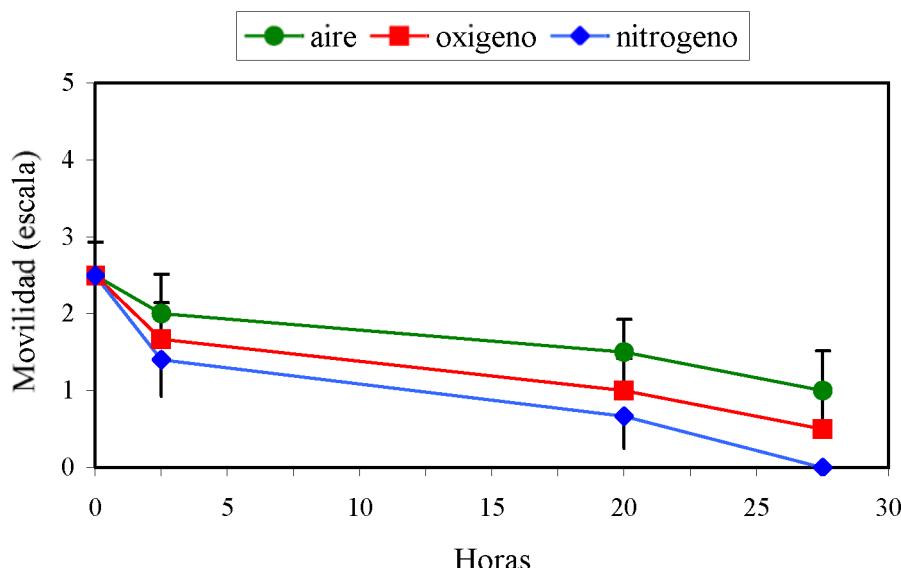
Dentro de las diferentes clases de relaciones esperma- huevo, al comparar las tasas de fecundación obtenidas con los métodos FH1 y FH2, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los casos (< 3.000 p= 0,15; >3.000-<4.000 p= 0,61; >4.000-<5.000 p= 0,15; >5.000-<6.500 p= 0,78; >6.500 p=0,05).

Las mayores tasas de fecundación con el método FS se obtuvieron (87,2%), cuando la relación esperma- huevo era >9.000, y con el método FH2 (86,8 %), cuando la relación era 3.000-4.000; y cuando se compararon no se encontraron diferencias significativas (p=0,06).

### 3.2 CONSERVACIÓN DE ESPERMA A CORTO PLAZO O PRESERVACIÓN

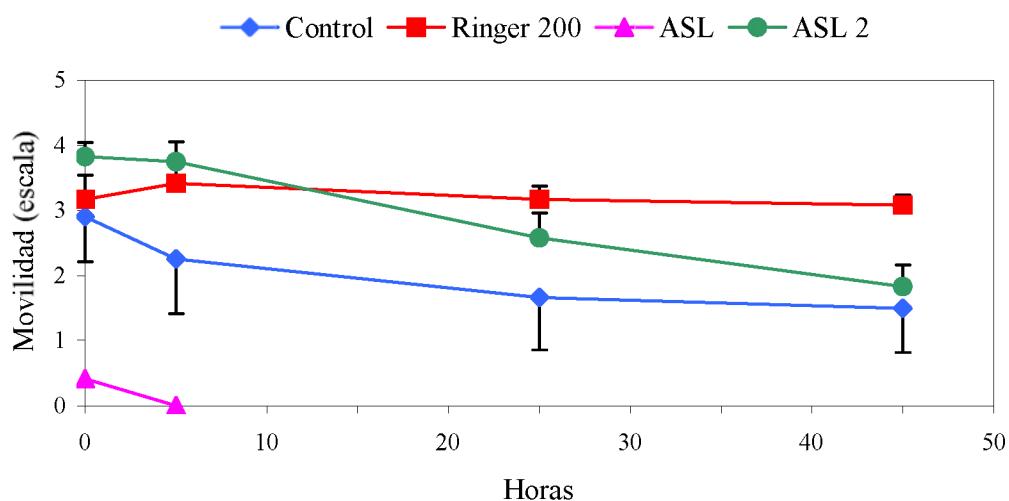
#### 3.2.1 Estudio de factores implicados en la conservación de esperma a corto plazo

La supervivencia de los espermatozoides durante varios días bajo diferentes atmósferas (aire, oxígeno o nitrógeno) decrece rápidamente con cualquiera de los gases utilizados en la conservación, como se muestra en la Figura 15. La tasa de supervivencia después de 20 horas de conservación fue significativamente mayor con aire que con oxígeno o nitrógeno (p= 0,009; p=0,002, respectivamente).



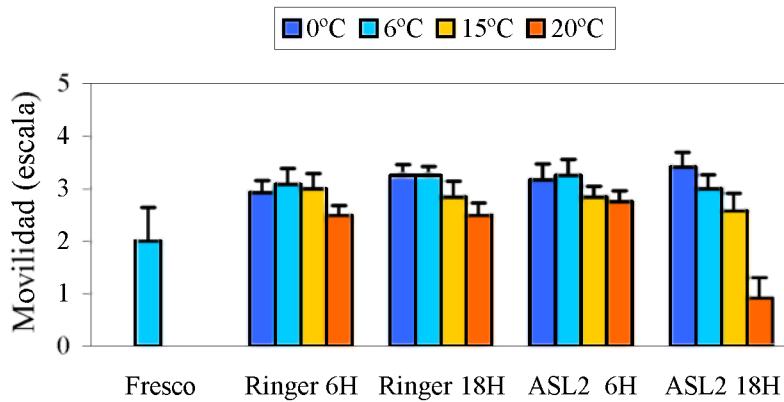
**Figura 15.** Movilidad media de esperma de 6 machos de rodaballo conservados a 6° C bajo atmósferas diferentes de aire, oxígeno o nitrógeno en relación con el tiempo desde su obtención.

En la Figura 16, se muestra la supervivencia del esperma de rodaballo sin diluir (Control) y diluido en tres diferentes medios (Ringer 200, ASL y ASL2), conservado a 6°C durante 48 horas desde su obtención. Los datos confirman el rápido decrecimiento de la movilidad del esperma, después de pocas horas de almacenaje, ya observado en la Figura 15; los medios Ringer 200 y ASL2 mejoran significativamente la movilidad del esperma después de 4 horas de almacenaje ( $p= 0,0000$ ;  $p= 0,0033$ , respectivamente), y además el medio Ringer 200 la mantiene durante al menos 45 horas. La comparación entre las composiciones de los medios ASL y ASL2 tienden a sugerir el efecto nocivo del Tris.



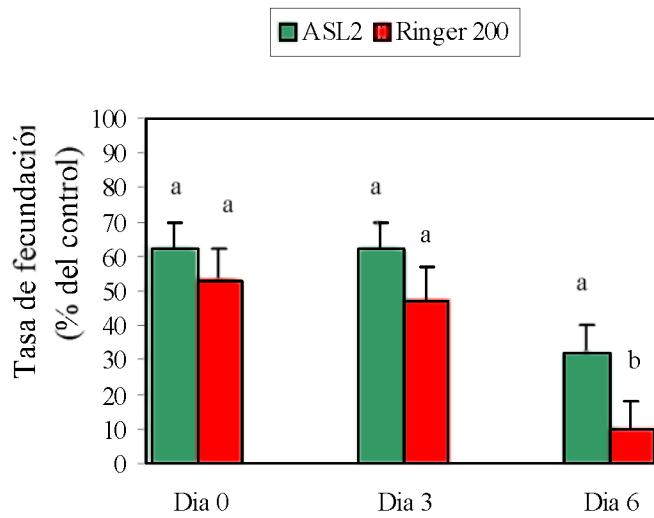
**Figura 16.** Movilidad media de esperma de 6 machos de rodaballo diluido en diferentes medios y guardado a 6°C durante 48 horas desde su obtención. El control es esperma sin diluir.

La influencia de la temperatura en la conservación del esperma se muestra en la Figura 17. La movilidad inicial del esperma sin diluir se mejora significativamente después de 6 horas de almacenaje en Ringer 200 o en ASL2 a cualquier temperatura ( $p= 0,0032$  a 0°C;  $p= 0,0019$  a 6°C;  $p= 0,0017$  a 15°C y  $p= 0,0018$  a 20°C). Después de 18 horas de conservación, la tasa de supervivencia no fue significativamente diferente a 0, 6 y 15°C ( $p= 0,3173$ ;  $p= 0,1797$  y  $p= 0,0833$ , respectivamente). A 20°C, la movilidad fue significativamente mayor cuando el esperma se guardaba en Ringer 200 que en el ASL2 ( $p=0,0029$ ), pero para las otras temperaturas no había diferencia entre los dos medios.



**Figura 17.** Movilidad media de esperma de 6 machos de rodaballo guardado en Ringer 200 o ASL2 (líquido seminal artificial) a diferentes temperaturas durante 18 horas desde su obtención. La movilidad inicial del esperma fresco se valoró justo en el momento de su obtención, antes de añadir los medios de conservación.

Los resultados de fecundación con esperma conservado a corto plazo se muestran en la Figura 18, y confirman que el esperma de rodaballo es posible conservarlo en los medios de Ringer 200 o ASL2 a 6° C, manteniendo una buena capacidad de fecundación después de tres días de conservación ( $p= 0,1088$ , respectivamente). Los datos muestran un decrecimiento de la calidad del esperma a partir del 6 día.



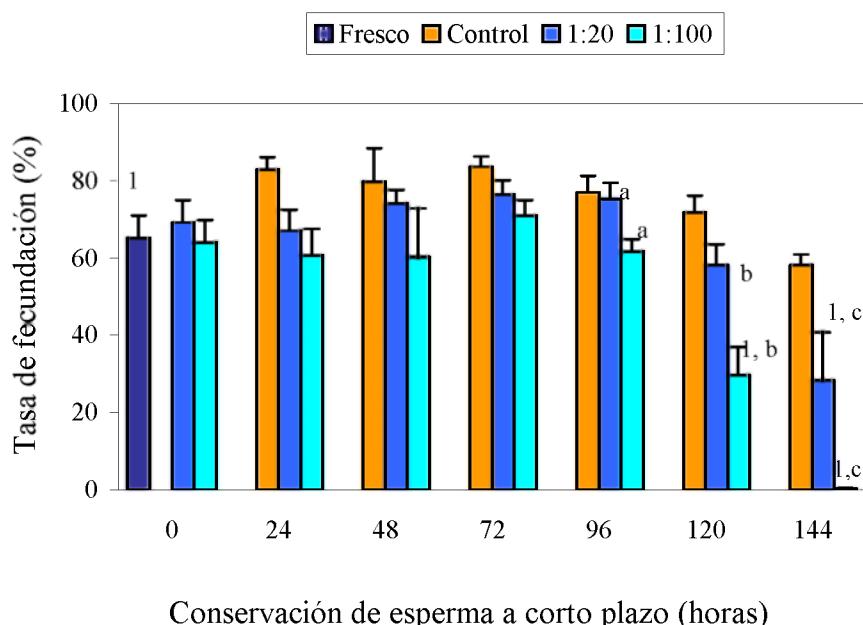
**Figura 18.** Tasas de fecundación media de esperma de 6 machos conservado a 6° C en Ringer 200 o ASL2 ( líquido seminal artificial) durante 6 días desde su obtención (barras con distinta letra son significativamente diferentes)

### 3.2.2 Puesta a punto del método de conservación o preservación

Las movilidades del esperma de rodaballo en este estudio variaron entre 3 y 5 de la escala de Sánchez- Rodríguez (1975). La densidad varió entre 0,5 y  $3,3 \times 10^9$  espermatozoides  $\text{mL}^{-1}$ .

Las tasas de fecundación obtenidas con las cinco diluciones diferentes de esperma-diluyente a 0 horas fueron del  $72,9 \pm 4,9$ ,  $76,2 \pm 4,1$ ,  $79,9 \pm 2,8$ ,  $82,0 \pm 2,9$  y  $77,8 \pm 3,9$ , respectivamente; no encontrándose diferencias significativas al comparar las tasas de fecundación ( $p= 0,521$ ).

Cuando usamos las diluciones menor y mayor del esperma-diluyente conservadas durante 0-144 horas, no se encontraron diferencias en las tasas de fecundación a 0, 24, 48, y 72 horas ( $p= 0,5453$ ,  $p= 0,5662$ ,  $p= 0,3820$ ,  $p= 0,3335$ , respectivamente); sin embargo, se encontraron tasas de fecundación significativamente mayores a 96, 120 y 144 horas ( $p= 0,0161$ ,  $p= 0,0041$  and  $p= 0,0439$ , respectivamente) con la dilución esperma-diluyente menor. Al comparar las tasas de fecundación obtenidas con las dos diluciones esperma-diluyente conservadas con las del esperma fresco no diluido (0 hora), no se encontraron diferencias a 0, 24, 48, 72 y 96 horas ( $p= 0,7950$ ,  $p= 0,8258$ ,  $p= 0,7938$ ,  $p= 0,2539$  and  $p= 0,0598$ , respectivamente); pero si se encontraron tasas de fecundación significativamente bajas a las 120 horas ( $p= 0,0008$ ) con la dilución esperma-diluyente mayor, y a las 144 horas ( $p= 0,0021$ ) con ambas diluciones, como se muestra en la Figura 19.



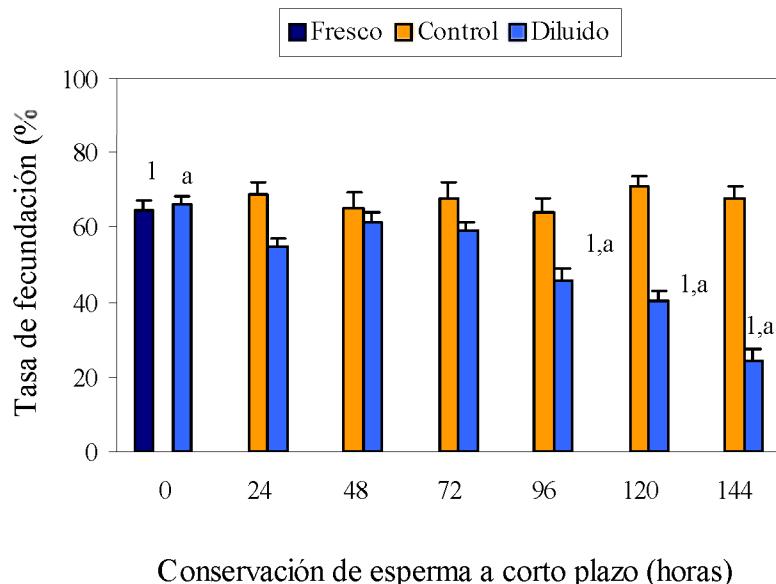
**Figura 19.** Media y error estándar de las tasas de fecundación obtenidas usando esperma fresco no diluido y los dos diluciones esperma-diluyente Ringer 200 (1:20 y 1:100) conservadas a  $6^\circ\text{C}$  durante 0-144 horas, de 5 machos. Las medias con la misma letra son significativamente diferentes, y las medias con el mismo número son también significativamente diferentes al esperma fresco no diluido.

### 3.2.3 Tasas de fecundación y eclosión obtenidas utilizando el método de conservación o preservación de esperma

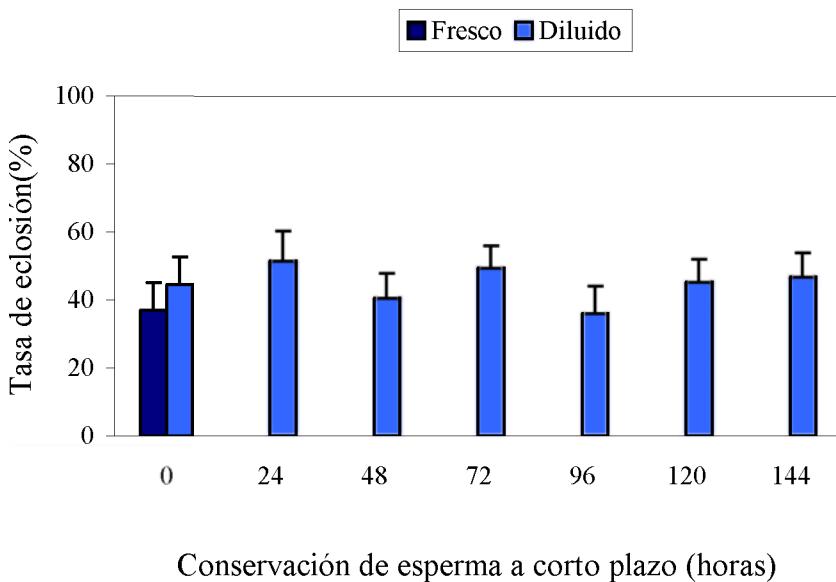
Al analizar las tasas de fecundación obtenidas a diferentes horas de conservación del esperma, utilizando la dilución menor (1:20), se encontraron diferencias significativas ( $p= 0,000$ ); sin embargo, cuando se realizó una comparación *a posteriori* se encontraron tasas de fecundación similares a 0, 24, 48 y 72 horas, pero se encontraron diferencias significativas a 96 y 120 horas y también a 144 horas. No obstante no se encontraron diferencias entre las tasas de fecundación a 96 y 120 horas. Se obtuvieron similares resultados cuando se comparó con el esperma fresco no diluido a 0 horas, como se puede observar en la Figura 20.

Por otro lado, al comparar las tasas de fecundación del esperma fresco no diluido utilizados en la conservación a corto plazo frente a los espermas frescos usados, como control diario de la viabilidad de los huevos, no se encontraron diferencias significativas ( $p= 0,9189$ ).

En cuanto a las tasas de eclosión obtenidas, no se encontraron diferencias significativas usando este método de conservación de esperma a corto plazo desde 0 a 144 horas ( $p= 0,8168$ ), ni cuando se compararon con las del esperma fresco no diluido a 0 horas ( $p= 0,7232$ ), como se observa en la Figura 21.



**Figura 20.** Evolución de las tasas de fecundación utilizando un método de conservación de esperma a corto plazo desde 0-144 horas, usando la dilución esperma- diluyente Ringer 200 (1:20), de 26 machos. Las medias con la misma letra son significativamente diferentes, y las medias con el mismo número son también significativamente diferentes al esperma fresco no diluido. Las medias control son las obtenidas con espermas frescos utilizados como control diario de viabilidad de los huevos.



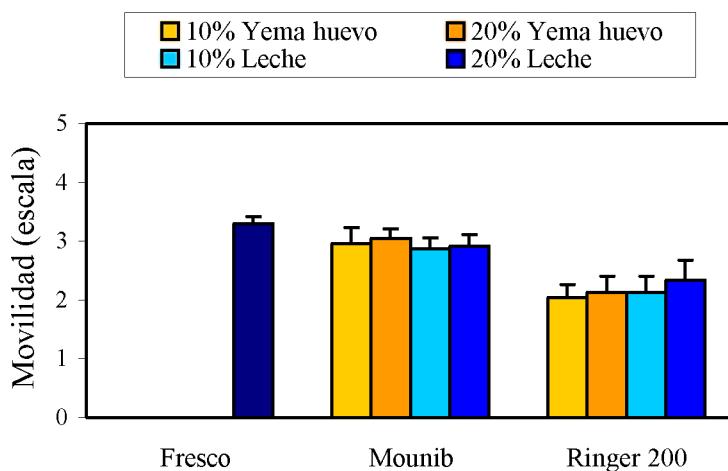
**Figura 21.** Media y error estándar de las tasas de eclosión obtenidas utilizando un método de conservación del esperma a corto plazo desde 0-144 horas, usando la dilución esperma- diluyente Ringer 200 (1:20), de 26 machos.

### 3.3 CONSERVACIÓN DE ESPERMA A LARGO PLAZO O CRIOCONSERVACIÓN

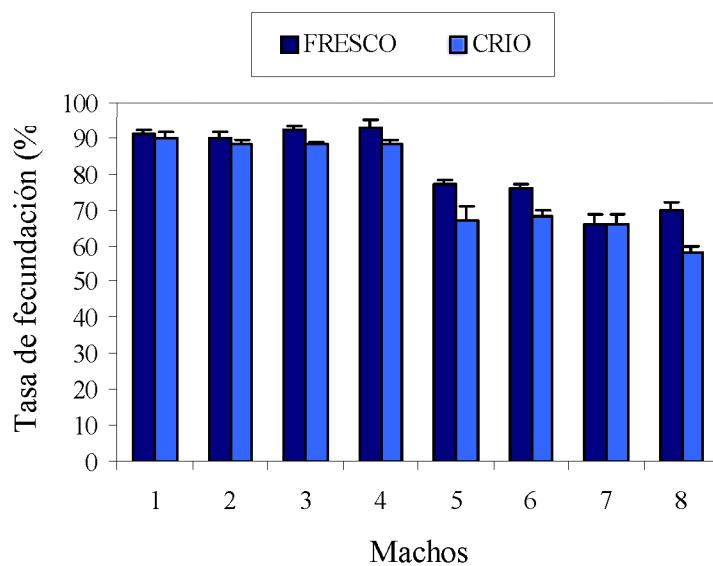
#### 3.3.1 Estudio de los factores implicados en la conservación a largo plazo de esperma para la puesta a punto de la técnica

Después de la descongelación, la movilidad del esperma crioconservado era buena, pero significativamente mejor con el medio de Mounib que con el Ringer 200 ( $p=0,0002$ ). Además, en cuanto a los crioprotectores no permeables utilizados en la crioconservación, el incremento de la concentración de yema de huevo o la sustitución de la yema de huevo por leche descremada en el medio Mounib no tenían ningún efecto ( $p=0,5271$ ;  $p=0,7389$ , respectivamente), ni tampoco en el medio Ringer ( $p=0,495$ ;  $p=0,1317$ , respectivamente), como se observa en la Figura 22.

Estos resultados obtenidos se confirmaron crioconservando el esperma de 8 machos en el medio Mounib con 10% de DMSO y 10% de yema de huevo. Las tasas de fecundación obtenidas con el esperma crioconservado fueron ligeramente menores, pero significativas, que las del esperma fresco ( $p=0,0217$ ), como se observa en la Figura 23.

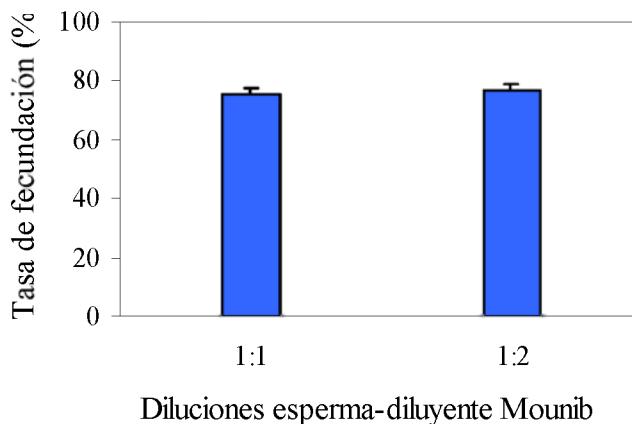


**Figura 22.** Movilidad media del esperma crioconservado de 6 machos en medio Mounib o Ringer 200 con 10% de DMSO y 10% o 20% de yema de huevo o leche descremada.



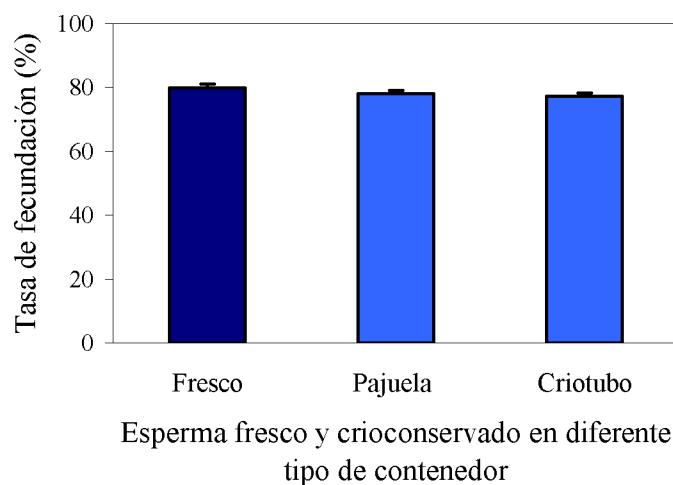
**Figura 23.** Tasas de fecundación de esperma de rodaballo fresco o crioconservado de 8 machos

En cuanto al tipo de dilución, en la Figura 24 se representan las tasas medias de fecundación obtenidas tras FA con esperma crioconservado usando dos tipos de dilución esperma-diluyente Mounib en la crioconservación (1:1 y 1:2). Al comparar las medias de la tasas de fecundación obtenidas, no se encontraron diferencias significativas ( $p= 0,7181$ ) entre los dos tipos de diluciones utilizadas en la crioconservación de esperma de rodaballo.



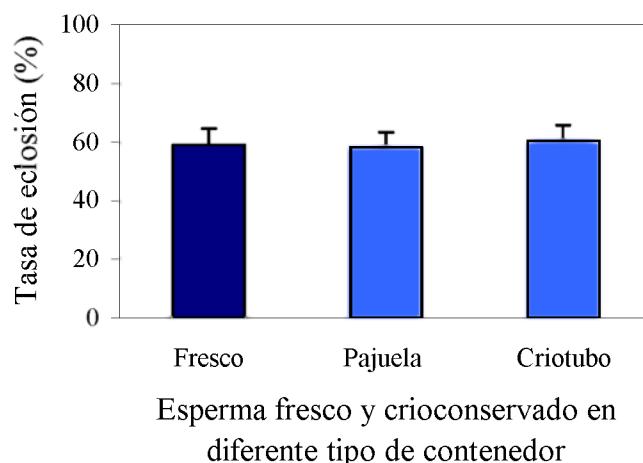
**Figura 24.** Media y error estandard de tasas de fecundación obtenidas en fecundaciones artificiales con esperma crioconservado de 28 machos, empleando dos tipos de dilución esperma-diluyente Mounib (V:V) en la crioconservación del esperma.

En la Figura 25 se representan las tasas de fecundación obtenidas mediante fecundación artificial con esperma fresco y crioconservado utilizando dos tipos de contenedores con diferente capacidad. No se encontraron diferencias significativas ( $p=0,1640$ ) al comparar las tasas de fecundación del esperma fresco y crioconservado, en pajuela y criotubo.



**Figura 25.** Media y error estandard de tasas de fecundación obtenidas en fecundaciones artificiales utilizando esperma fresco y crioconservado de 27 machos, empleando dos tipos de contenedores de diferente capacidad en la crioconservación de esperma.

Las tasas medias de eclosión obtenidas tras la incubación se representan en la Figura 26. En la eclosión no se encontraron diferencias significativas ( $p=0,9568$ ) entre el esperma fresco y crioconservado utilizando diferente tipo de contenedor, pajuela y criotubo, en la crioconservación.

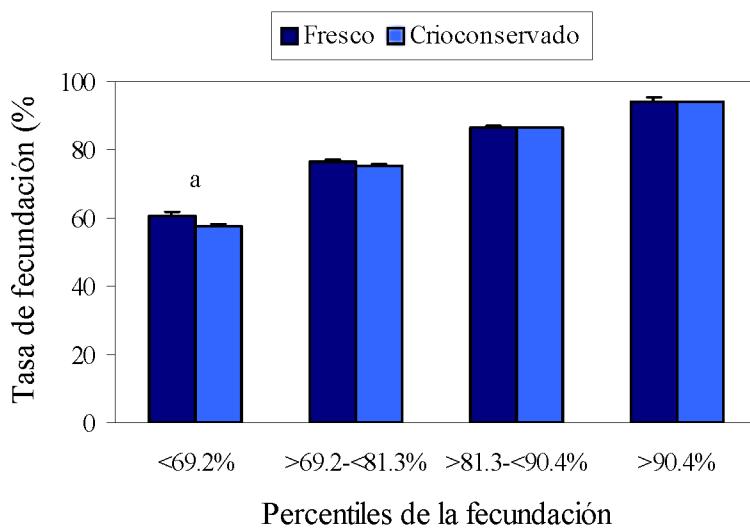


**Figura 26.** Media y error estandar de tasas de eclosión obtenidas en fecundaciones artificiales utilizando esperma fresco y crioconservado de 27 machos, empleando dos tipos de contenedores de diferente capacidad en la crioconservación de esperma.

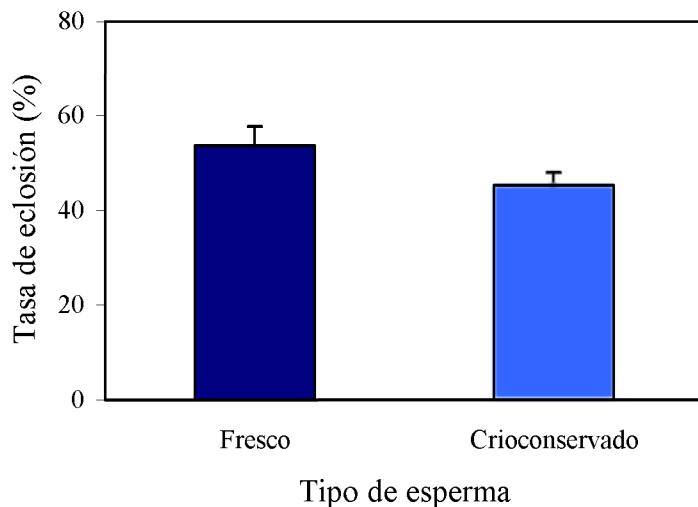
### 3.3.2 Tasas de fecundación y de eclosión obtenidas utilizando el método de crioconservación de esperma.

La densidad del esperma utilizado en este estudio varió entre  $0,4$  y  $4,4 \times 10^9$  espermatozoides  $\text{mL}^{-1}$ , valores similares a los referidos por Suquet *et al.* (1994) para esta especie. Las tasas medias de fecundación obtenidas, con esperma fresco y crioconservado de 49 machos diferentes, se representan en la Figura 27. Al comparar las cuatro clases de porcentajes de fecundación establecidas con los dos tipos de esperma fresco y crioconservado utilizados en las fecundaciones artificiales, se encontraron diferencias significativas. ( $p= 0,000$ ). Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas ( $p= 0,297$ ) cuando los porcentajes de fecundación eran superiores a 69,2%.

Las tasas medias de eclosión obtenidas tras la incubación se muestran en la Figura 28. En la eclosión no se encontraron diferencias significativas ( $p= 0,091$ ) con ambos tipos de esperma.



**Figura 27.** Media y error estandard de tasas de fecundación obtenidas en fecundaciones artificiales utilizando esperma fresco y crioconservado de 49 machos. Las medias más bajas con la letra (a) son significativamente diferentes.



**Figura 28.** Media y error estandard de tasas de eclosión obtenidas en fecundaciones artificiales utilizando esperma fresco y crioconservado de 49 machos.

### 3.4 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LARVAS OBTENIDAS CON ESPERMA CRIOCONSERVADO

#### 3.4.1 Fecundaciones artificiales realizadas con esperma fresco y crioconservado del mismo macho

Las densidades y movilidades del esperma de rodaballo utilizado en las diferentes fecundaciones artificiales se dan en la Tabla IV. La densidad varió de  $0,9$  a  $2,35 \times 10^9$  espermatozoides  $\text{mL}^{-1}$  y las movilidades variaron de 3 a 5 según la escala de Sánchez-



Rodríguez. Las densidades de esperma usadas en este estudio fueron similares a los valores reportados por Suquet *et al.* (1994).

**Tabla IV.** Densidades y movilidades del esperma de rodaballo *Scophthalmus maximus* L. utilizado en las diferentes fecundaciones artificiales.

Machos	Movilidad (escala 0-5)	Densidad (nº de espermatozoides x 10 <sup>9</sup> mL <sup>-1</sup> )
♂105	3-4	0,9
♂117	3-4	2,35
♂24	3-4	1,3
♂0	4-5	2,1

Las viabilidades de las cuatro puestas fueron superiores al 60%. El número de huevos por mL obtenidos por presión abdominal de las hembras de rodaballo utilizadas en las diferentes fecundaciones artificiales se muestran en la Tabla V.

**Tabla V.** Tasas de viabilidad y número de huevos por mL de las diferentes puestas obtenidas por presión abdominal de hembras de rodaballo *Scophthalmus maximus* L. utilizadas en las diferentes fecundaciones artificiales.

Puestas de las hembras	Tasa de viabilidad (%)	Número de huevos (x mL <sup>-1</sup> )
♀53	86,40	728
♀8	63,50	1.090
♀32	93,79	1.046
♀32	89,50	978

Las tasas de fecundación y eclosión obtenidas en cada fecundación se muestran en la Tabla VI. No se observaron diferencias significativas en las tasas de fecundación ( $p = 0,373$ ) y eclosión ( $p = 0,521$ ) entre los dos grupos de larvas obtenidas a partir de esperma fresco y crioconservado.

**Tabla VI.** Tasas de fecundación y eclosión obtenidas de cada fecundación artificial ( FA) realizada con esperma fresco y crioconservado de machos diferentes.

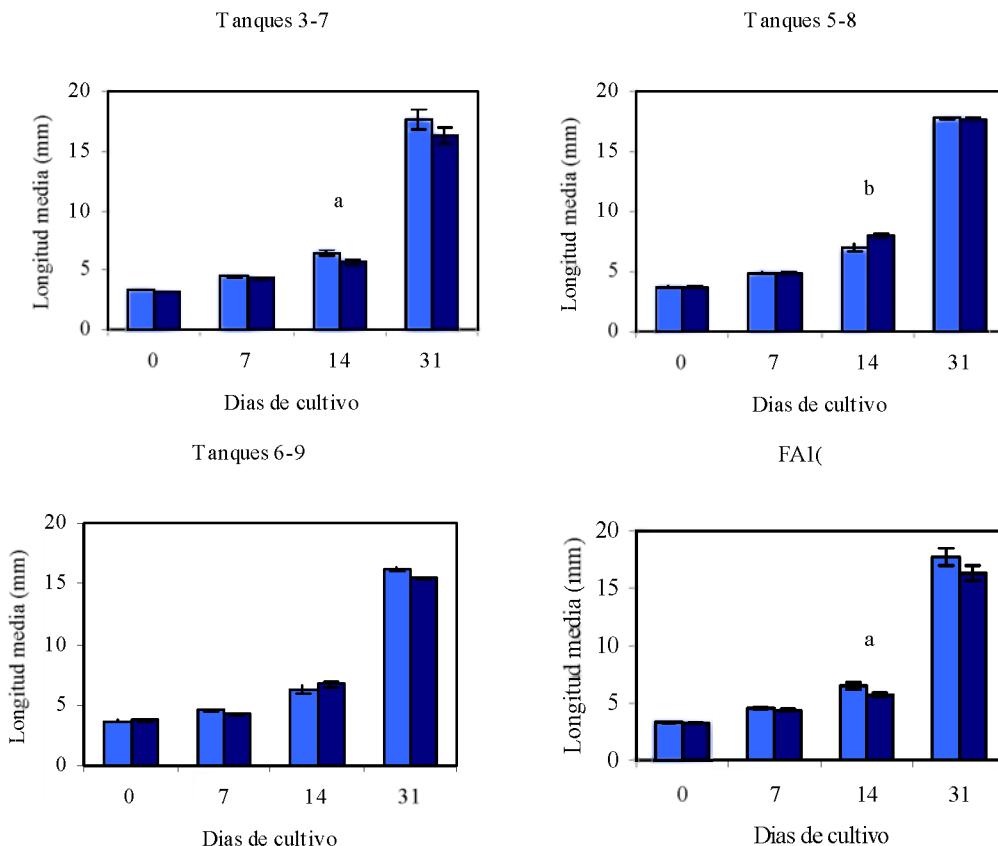
FA	Reproductores	Tipo de esperma	Tanque	Tasa de fecundación (%)	Tasa de eclosión (%)
1	♂105	Fresco Crio	L7	86,09	87,70
			L3	86,86	65,05
2	♂117	Fresco Crio	L5	95,20	75,37
			L8	92,90	59,10
3	♂24	Fresco Crio	L6	82,60	62,95
			L9	58,97	50,02
4	♂0	Fresco Crio	L2	95,80	42,80
			L1	88,60	66,59

### 3.4.2 Cultivo larvario de rodaballo producidos con esperma fresco y crioconservado

En la FA 1 (Tanques 3 y 7), se encontró que las larvas obtenidas con esperma crioconservado eran significativamente más grandes a día 14 ( $p = 0,0315$ ); no se encontraron diferencias a día 0, 7, y 31 de cultivo ( $p = 0,1015$ ,  $p = 0,2523$ , y  $p = 0,1729$ , respectivamente), como se muestra en la Figura 29.

Al contrario, en la FA 2 (Tanques 5 y 8), las larvas obtenidas con esperma fresco eran significativamente mayores a día 14 ( $p = 0,0145$ ); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas a día 0, 7, y 31 de cultivo ( $p = 0,8409$ ,  $p = 0,8391$ , y  $p = 0,5831$ , respectivamente).

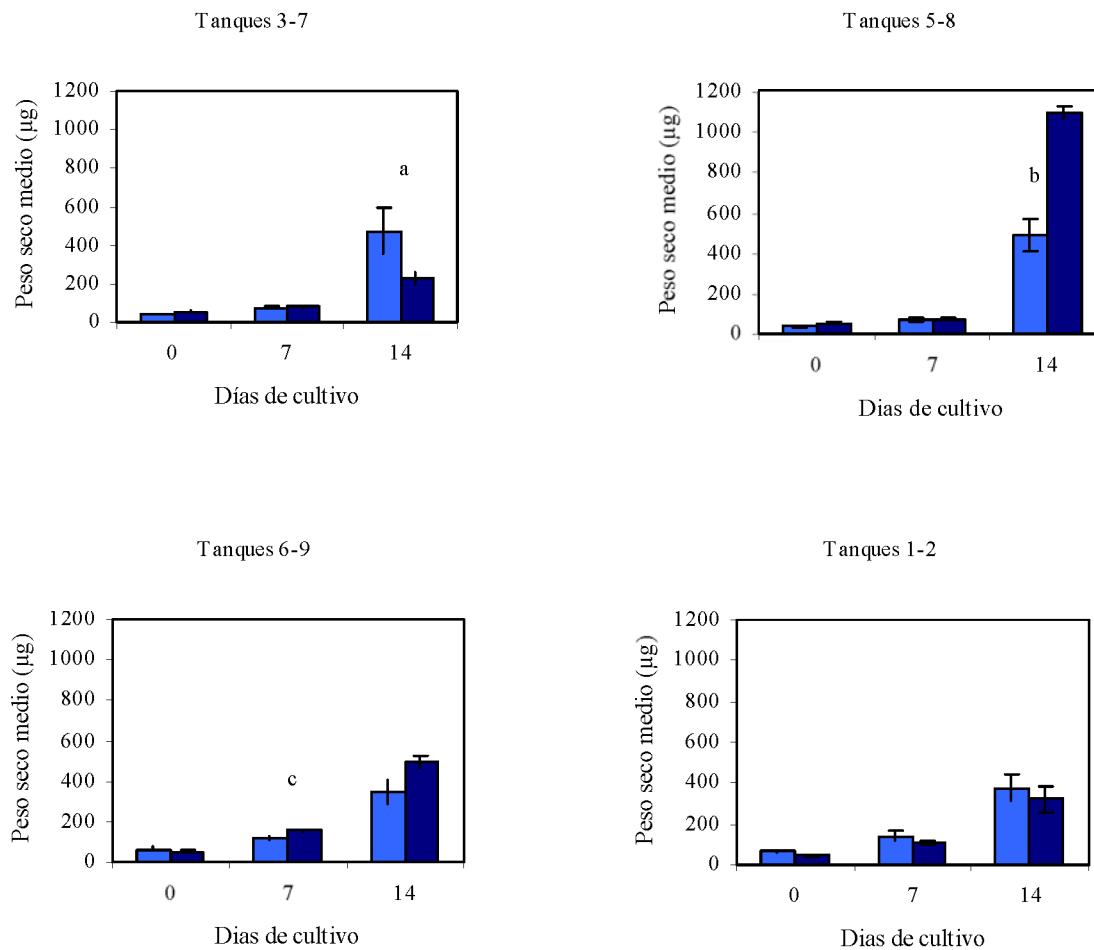
En la FA 3 (Tanques 6 y 9), las larvas obtenidas con esperma crioconservado eran más grandes a día 31 ( $p = 0,000$ ), aunque no se encontraron diferencias a día 0, 7, y 14 ( $p = 0,4621$ ,  $p = 0,0531$ ,  $p = 0,2710$ , respectivamente). En la FA 4 (Tanques 1 y 2), a día 31 las larvas obtenidas con esperma fresco eran significativamente más grandes ( $p = 0,000$ ), pero no se encontraron diferencias a día 0, 7, y 14 ( $p = 0,2065$ ,  $p = 0,3249$ ,  $p = 0,4184$ , respectivamente).



**Figura 29.** Media y error estandar de la longitud de larvas (mm) obtenidas con esperma fresco y crioconservado, a diferentes días de cultivo. Cada gráfico es una fecundación artificial diferente. Las medias de color azulón representan el esperma crioconservado y el oscuro el fresco. Las medias con letras son significativamente diferentes.

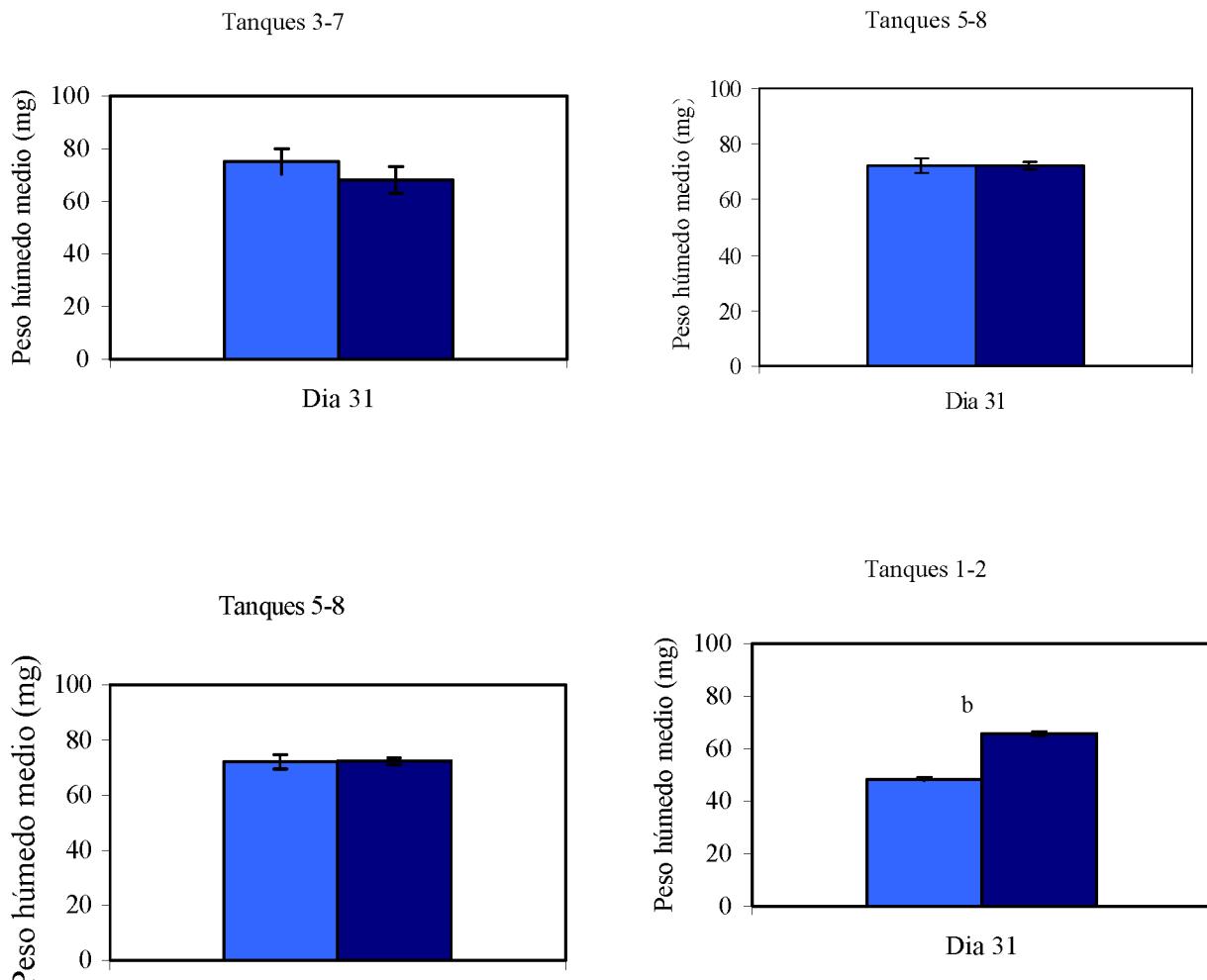
La media de los pesos secos de la larvas obtenidas en las diferentes FA, se muestran en la Figura 30. En la FA 1 (Tanques 3 y 7), las larvas obtenidas con esperma crioconservado pesaban más a día 14 ( $p = 0,0185$ ), pero no se encontraron diferencias a día 0 y 7 ( $p = 0,1810$ ,  $p = 0,7973$ ). Al contrario, en la FA 2 (Tanques 5 y 8), las larvas obtenidas con esperma fresco pesaban más a día 14 ( $p = 0,000$ ); sin embargo, no había diferencias a día 0 y 7 ( $p = 0,1414$ ,  $p = 0,8965$ ).

En la FA 3 (Tanques 6 y 9), las larvas obtenidas con esperma fresco pesaban más a día 7 ( $p = 0,0249$ ), pero no se encontraron diferencias a día 0 y 14 ( $p = 0,4516$ ,  $p = 0,1293$ ). Entre las larvas obtenidas en la FA 4 (Tanques 1 y 2), no se encontraron diferencias significativas en el peso a día 0, 7, y 14 ( $p = 0,1126$ ,  $p = 0,2990$ ,  $p = 0,5372$ , respectivamente).



**Figura 30.** Media y error estandar del peso seco de larvas ( $\mu\text{g}$ ) obtenidas con esperma fresco y crioconservado, a diferentes días de cultivo. Cada gráfico es una fecundación artificial diferente, donde las medias de color azulón representan el esperma crioconservado y el oscuro el fresco. Las medias con letras son significativamente diferentes.

Las medias de los pesos húmedos de las larvas obtenidas en las diferentes FA a día 31 se muestran en la figura 31. No se encontraron diferencias entre las larvas obtenidas en la FA 1 ( $p = 0,3189$ ) o FA 2 ( $p = 0,5909$ ). Sin embargo, las larvas obtenidas con esperma crioconservado en la FA 3 pesaban más ( $p = 0,0028$ ), mientras que en la FA 4 eran las larvas de esperma fresco las que pesaban más ( $p = 0,000$ ).



**Figura 31.** Media y error estándar del peso húmedo de larvas (mg) obtenidas con esperma fresco y crioconservado, a diferentes días de cultivo. Cada gráfico es una fecundación artificial diferente, donde las medias de color azulón representan el esperma crioconservado y el oscuro el fresco. Las medias con letras son significativamente diferentes.

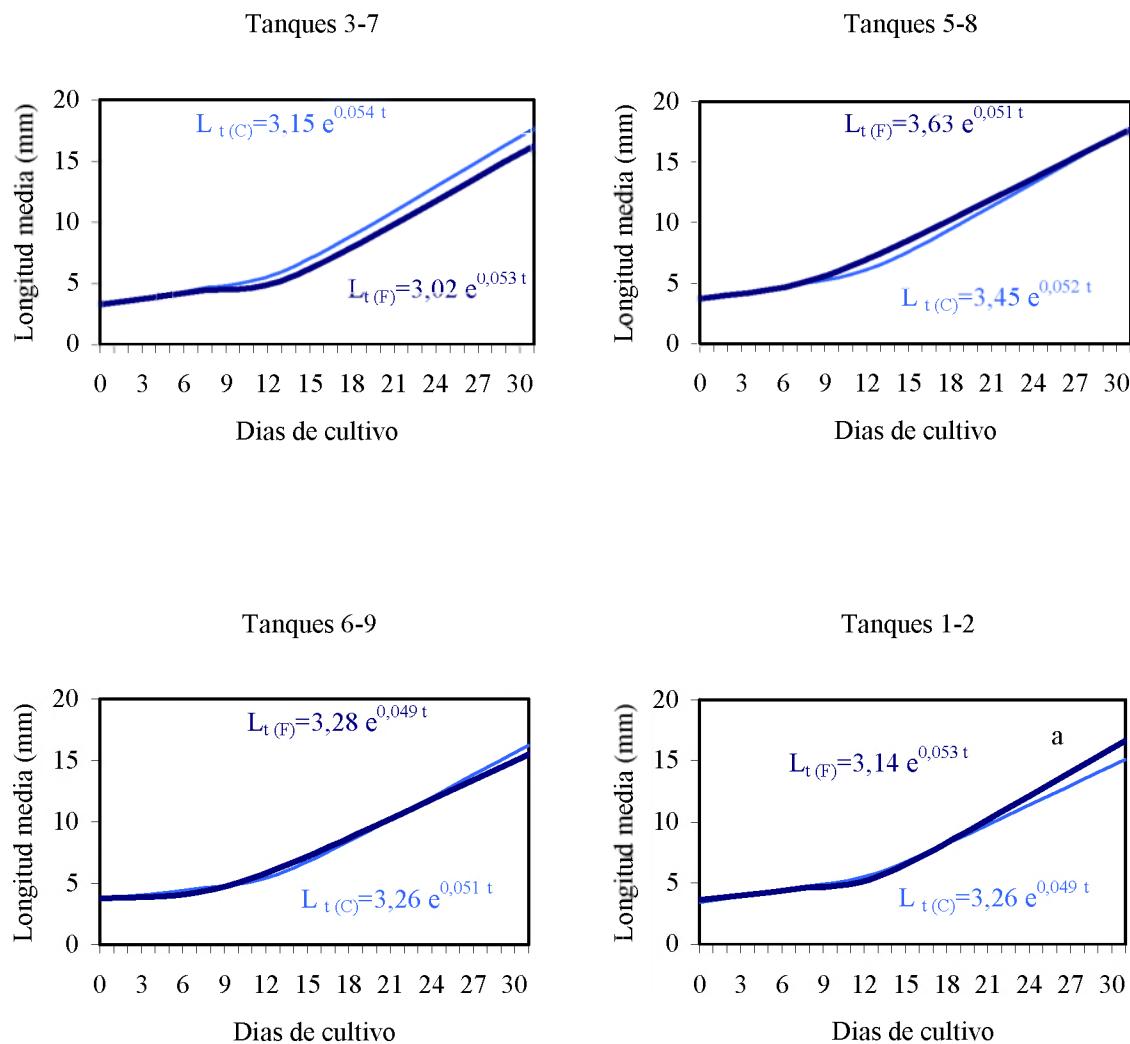
Al analizar los datos de crecimiento larvario a diferentes días de cultivo, encontramos que a día 0, 7 y 14, las larvas obtenidas en las cuatro fecundaciones (FA 1, FA 2, FA 3, y FA 4) tenían similar longitud (día 0,  $p=0,767$ ; día 7,  $p=0,234$ ; día 14,  $p=0,7515$ ) y peso seco (día 0,  $p=0,7009$ ; día 7,  $p=0,837$ ; día 14,  $p=0,336$ ). Sin embargo, a día 31, se encontraron diferencias en longitud y peso húmedo ( $p= 0,000$ ).



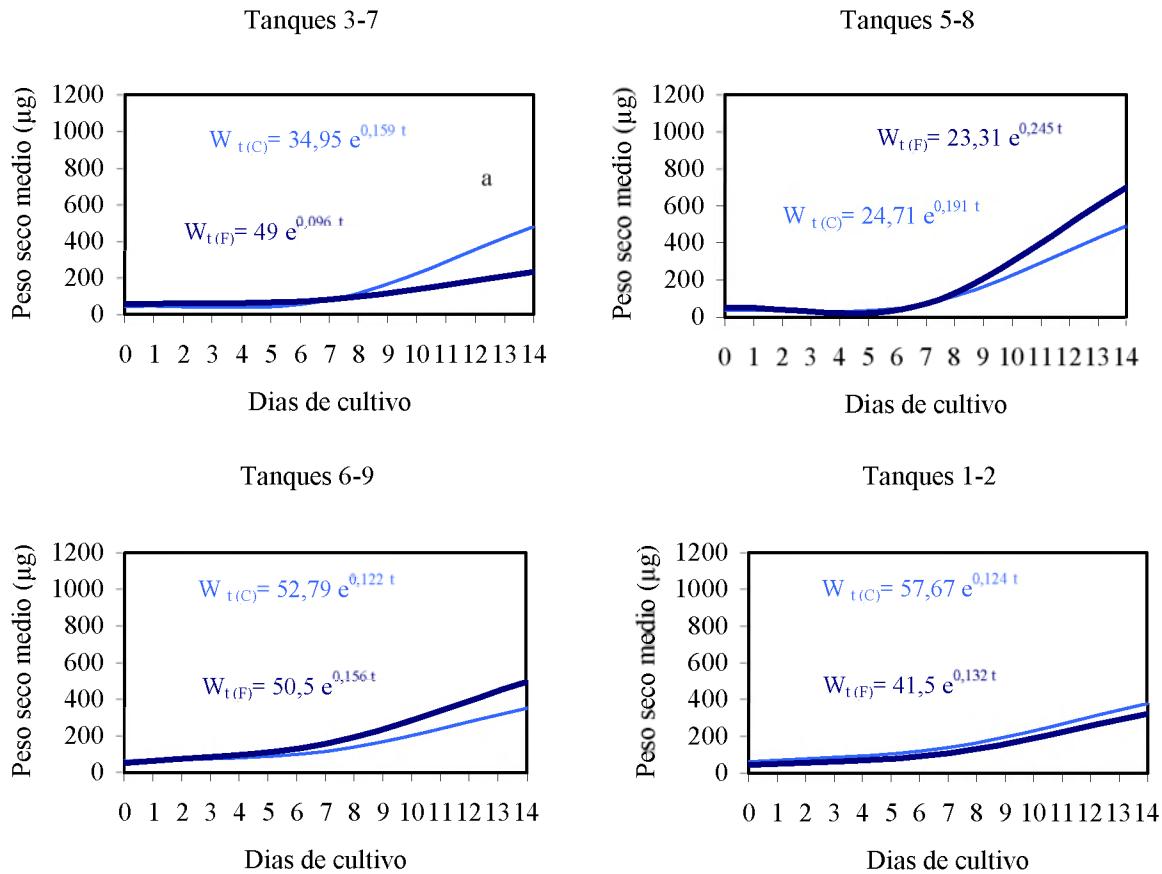
Al comparar las pendientes de las regresiones lineales para la longitud larvaria (Tabla VII), las tasas de crecimiento eran similares, excepto en la FA 4, en donde las larvas obtenidas con esperma fresco mostraban una tasa superior a las larvas crioconservadas, como se muestra en la Figura 32. Al comparar las pendientes de crecimiento larvario en peso, se encontró una diferencia significativa en la FA 1, en la cual las larvas obtenidas con esperma crioconservado presentaban una tasa de crecimiento mayor (Figura 33).

**Tabla VII.** Comparación de pendientes y elevaciones de las regresiones lineales de la longitud y peso de las larvas procedentes de cuatro fecundaciones artificiales con esperma fresco y crioconservado.

	Tanques	Esperma	Regresiones lineales	Coeficiente de regresión	Grupos homogéneos	Elevaciones homogéneas
Longitud	3 y 7	F	$\ln L = 1,105 + 0,053 t$	0,96	*	*
		C	$\ln L = 1,146 + 0,054 t$	0,96	*	*
	5 y 8	F	$\ln L = 1,291 + 0,051 t$	0,94	*	*
		C	$\ln L = 1,238 + 0,052 t$	0,94	*	*
	6 y 9	F	$\ln L = 1,189 + 0,049 t$	0,67	*	*
		C	$\ln L = 1,183 + 0,051 t$	0,87	*	*
	1 y 2	F	$\ln L = 1,144 + 0,053 t$	0,63	*	-
		C	$\ln L = 1,184 + 0,049 t$	0,77	*	-
Peso	3 y 7	F	$\ln W = 3,892 + 0,096 t$	0,71	*	-
		C	$\ln W = 3,554 + 0,159 t$	0,81	*	-
	5 y 8	F	$\ln W = 3,149 + 0,245 t$	0,71	*	*
		C	$\ln W = 3,207 + 0,191 t$	0,74	*	*
	6 y 9	F	$\ln W = 3,922 + 0,156 t$	0,85	*	*
		C	$\ln W = 3,966 + 0,122 t$	0,68	*	*
	1 y 2	F	$\ln W = 3,726 + 0,132 t$	0,65	*	*
		C	$\ln W = 4,055 + 0,124 t$	0,73	*	*



**Figura 32.** Crecimiento larvario en longitud (mm) de rodaballo obtenido de fecundaciones artificiales con esperma fresco y crioconservado. Cada gráfico representa un par de reproductores diferentes, con líneas de color azulón representando el esperma crioconservado y el oscuro el fresco. En el gráfico con la letra (a), las pendientes de ambas curvas son significativamente diferentes.



**Figura 33.** Crecimiento larvario en peso seco (µg) de rodaballo obtenido de fecundaciones artificiales con esperma fresco y crioconservado. Cada gráfico representa un par de reproductores diferentes, con líneas de color azulón representando el esperma crioconservado y el oscuro el fresco. En el gráfico con la letra (a), las pendientes de ambas curvas son significativamente diferentes.

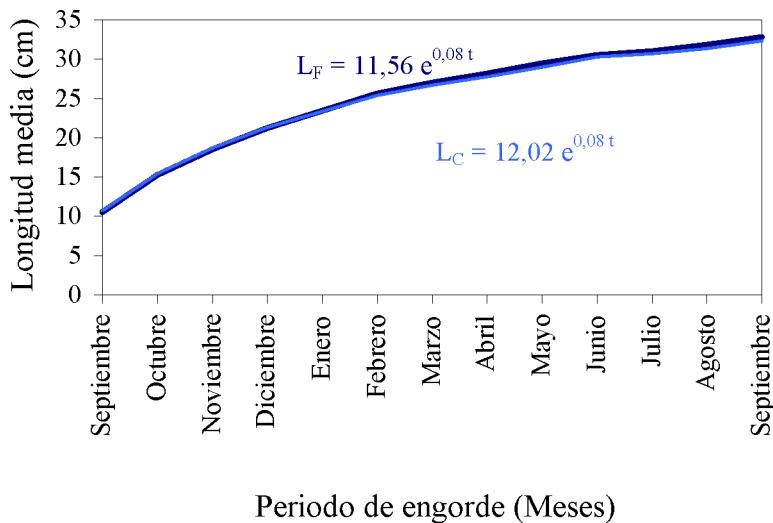
### 3.5 EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE ALEVINES PRODUCIDOS CON ESPERMA CRIOCONSERVADO

En este estudio, se encontró la misma tasa de supervivencia (92,2%) entre los dos grupos de alevines de 4 meses de vida, producidos con esperma fresco (GF) y crioconservado (GC) durante un año de engorde.

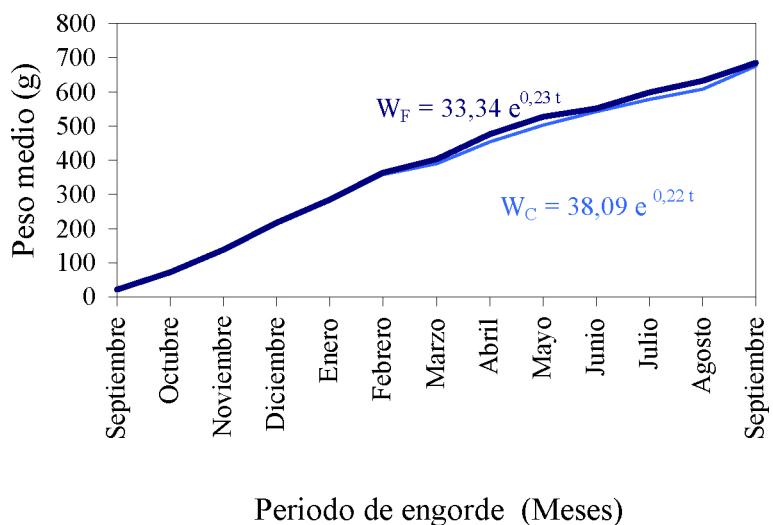
Los valores medios de longitud y peso obtenidos mensualmente en los dos grupos de alevines se muestran en las Figuras 34 y 35. No se encontraron diferencias ni en longitud o peso, excepto en el peso de Octubre ( $p=0,019$ ).

Cuando comparamos los datos de crecimiento de los alevines GF obtenidos durante un año, se encontraron diferencias significativas en peso ( $p = 0,430$ ) pero no en longitud ( $p = 0,5506$ ) entre los tanques. Al contrario, cuando comparamos los datos de crecimiento de los alevines GC, no se encontraron diferencias ni en longitud o peso entre los tanques ( $p = 0,8141$  y  $p= 0,5842$ , respectivamente). Al comparar todos los

datos de crecimiento no se encontraron diferencias significativas en longitud ( $p = 0,894$ ) o en peso ( $p = 0,175$ ) entre los seis tanques.



**Figura 34.** Longitud (cm) de alevines de rodaballo, obtenidos por fecundación artificial con esperma fresco y crioconservado, durante un año. La linea de color azulón es del grupo crioconservado y la oscura es del grupo fresco.



**Figura 35.** Peso (g) de alevines de rodaballo, obtenidos por fecundación artificial con esperma fresco y crioconservado, durante un año. La linea de color azulón es del grupo crioconservado y la oscura es del grupo fresco.



Los resultados del análisis de la varianza de dos vías de los datos transformados se muestran en la Tabla VIII y IX. No se encontraron diferencias en longitud o peso entre los grupos GF y GC ( $p=0,056$  y  $p=0,119$ , respectivamente) o en la interacción mes-esperma ( $p=0,582$  y  $p=0,467$ , respectivamente).

**Tabla VIII.** Resultados del análisis de varianza de dos vías para la longitud respecto al mes y el tipo de esperma (datos transformados en logaritmos neperianos). Nivel de confianza: 95.

Origen de variación	Suma de cuadrados	DF	Media de cuadrados	F	Sig of F
Efectos principales	234,481	13	18,037	3159,621	0,000
Mes	234,458	12	19,538	3422,592	0,000
Esperma	0,022	1	0,022	3,911	0,056
Interacciones de dos vías	0,059	12	0,005	0,865	0,582
Mes/esperma	0,059	12	0,005	0,865	0,582
Explicada	235,155	25	9,406	1647,729	0,000
Residual	12,627	2212	0,006		
Total	247,783	2237	0,111		
2238 casos fueron procesados 0 casos (0.0 pct) fueron perdidos					

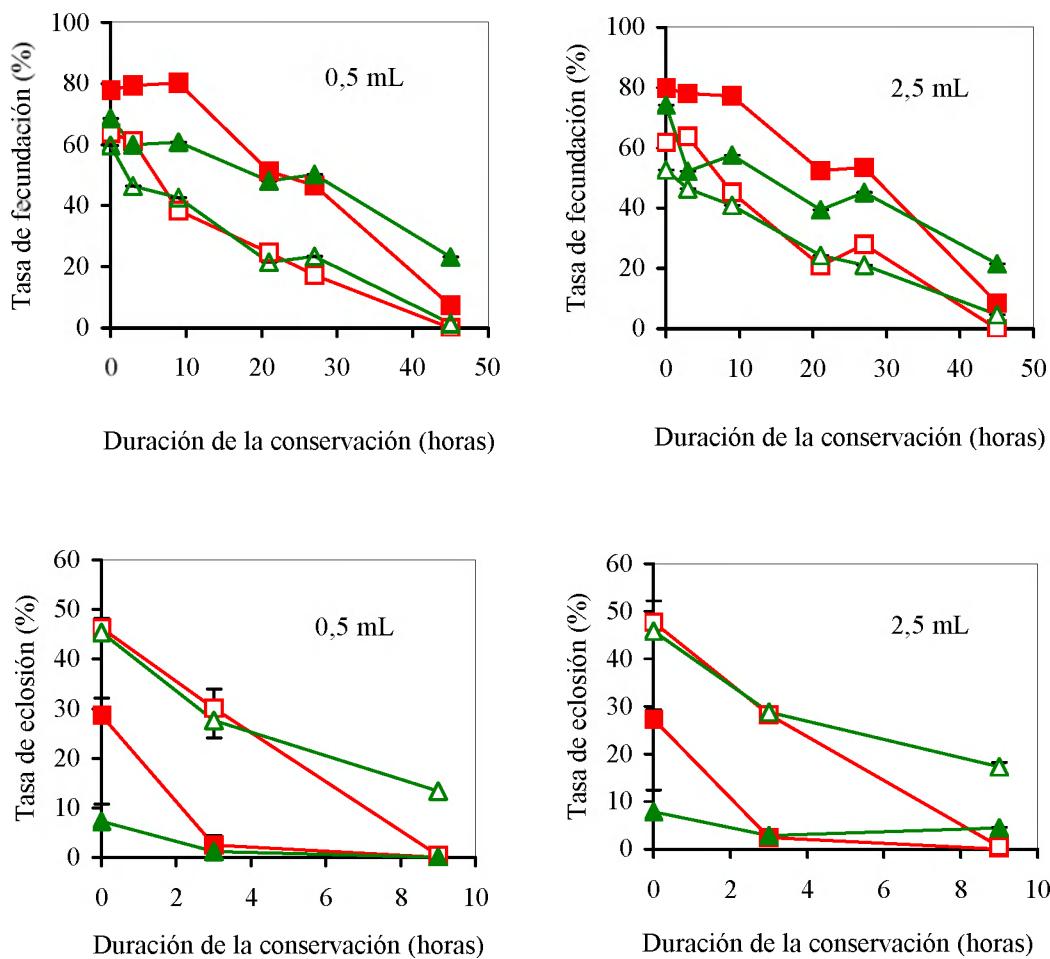
**Tabla IX.** Resultados del análisis de varianza de dos vías para el peso respecto al mes y el tipo de esperma (datos transformados en logaritmos neperianos). Nivel de confianza: 95.

Origen de variación	Suma de cuadrados	DF	Media de cuadrados	F	Sig de F
Efectos principales	2102,907	13	161,762	2964,572	0,000
Mes	2102,602	12	175,217	3211,154	0,000
Esperma	0,145	1	0,145	2,661	0,119
Interacciones de dos vías	0,641	12	0,053	0,979	0,467
Mes/esperma	0,641	12	0,053	0,979	0,467
Explicada	2110,141	25	84,406	1546,880	0,000
Residual	120,698	2212	0,055		
Total	2230,839	2237	0,997		
2238 casos fueron procesados 0 casos (0.0 pct) fueron perdidos					

Cuando se compararon las pendientes de las rectas de regresión de la longitud, entre GF ( $L_F = 11,56 e^{0,08t}$ ) y GC ( $L_C = 12,02 e^{0,08t}$ ), de los alevines de rodaballo durante un año, se encontró la misma tasa de crecimiento ( $g=0,08$ ); y tasas de crecimiento similares ( $g=0,23$  y  $g=0,24$ , respectivamente) para el peso de los alevines del GF ( $W_F=33,34 e^{0,23t}$ ) y del GC ( $W_C=38,09 e^{0,22t}$ ), como se muestran en las Figuras 34 y 35.

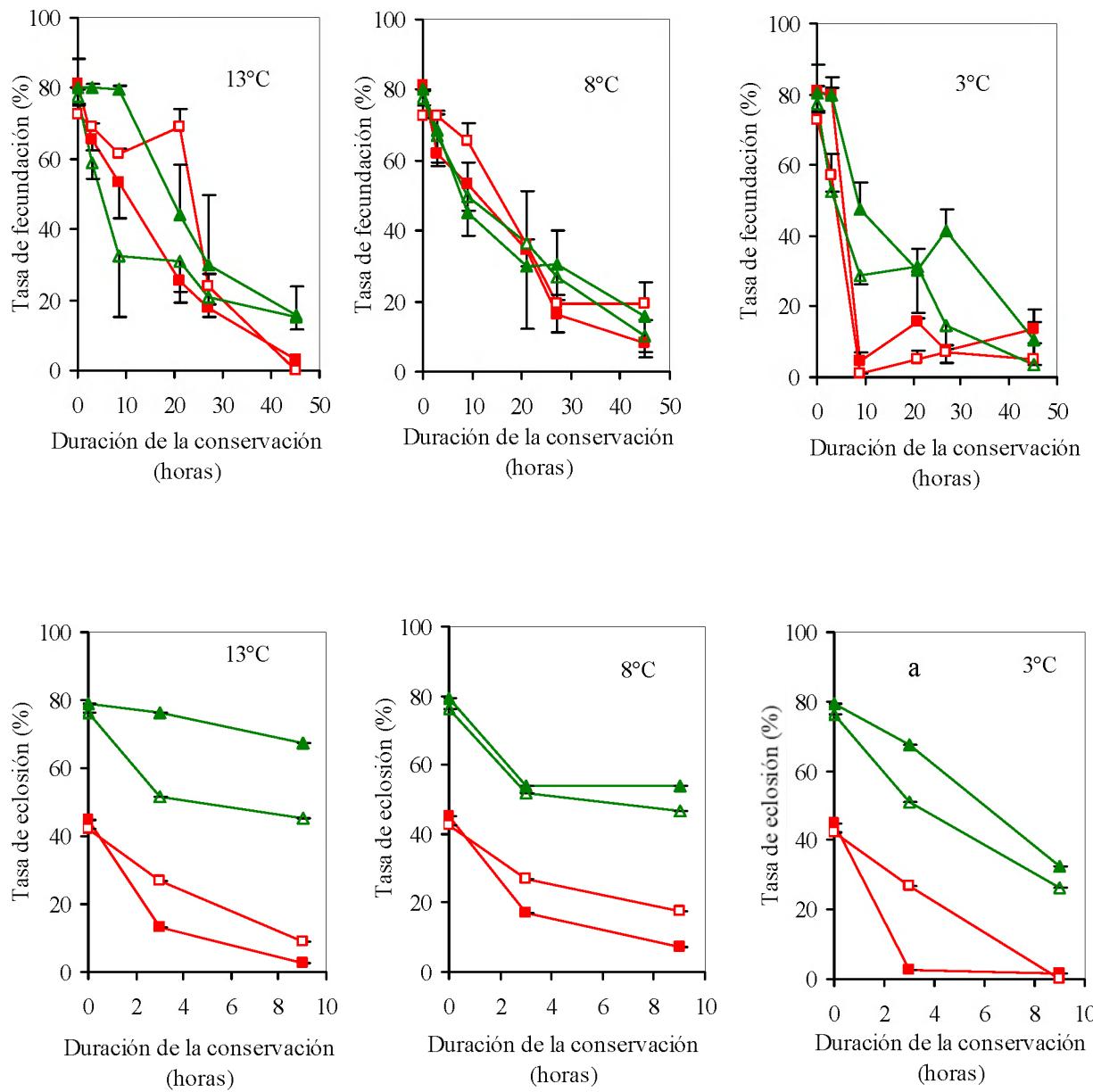
### 3.6 CONSERVACIÓN DE HUEVOS A CORTO PLAZO

Al comparar las tasas de fecundación y eclosión obtenidas usando diferentes volúmenes de huevos en la conservación a corto plazo, no se encontraron diferencias significativas al usar 0,5 ó 2,5 mL de huevos ( $p= 0,938$ ,  $p= 0,592$ , respectivamente), como se muestra en la Figura 36.



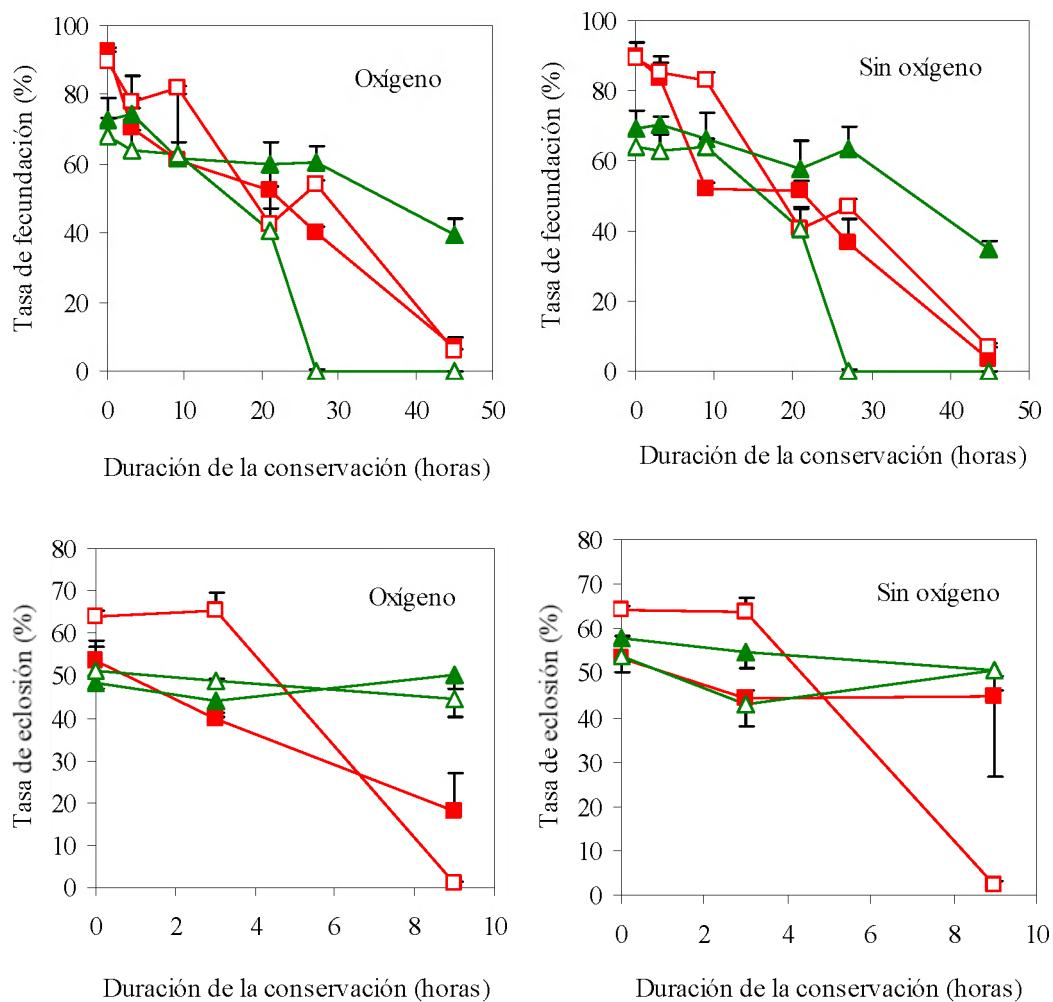
**Figura 36.** Efecto del volumen de huevos en la capacidad de conservación de huevos de rodaballo a corto plazo. Las líneas rojas representan a las dos puestas utilizadas por el IEO y las verdes a las utilizadas por el IFREMER.

La capacidad de conservación de huevos de rodaballo no era significativamente diferente entre las tres temperaturas utilizadas en la conservación, como revelan las tasas de fecundación obtenidas representadas en la Figura 37 ( $p= 0,103$ ). Por otro lado, en cuanto a la eclosión, se encontró una mayor capacidad de conservación a  $8^{\circ}$  y  $13^{\circ}$  C que a  $3^{\circ}$  C ( $p= 0,022$ ).



**Figura 37.** Efecto de la temperatura en la capacidad de conservación de huevos de rodaballo a corto plazo. Las líneas rojas representan a las dos puestas utilizadas por el IEO y las verdes a las utilizadas por el IFREMER. El gráfico de eclosión con la letra (a) a 3° C es significativamente diferente a los otros dos.

La conservación de huevos de rodaballo con una atmósfera de oxígeno inyectada no incrementaba la capacidad de conservación de éstos, como muestran las tasas de fecundación ( $p=0,839$ ) y eclosión ( $p=0,513$ ) representadas en la Figura 38.

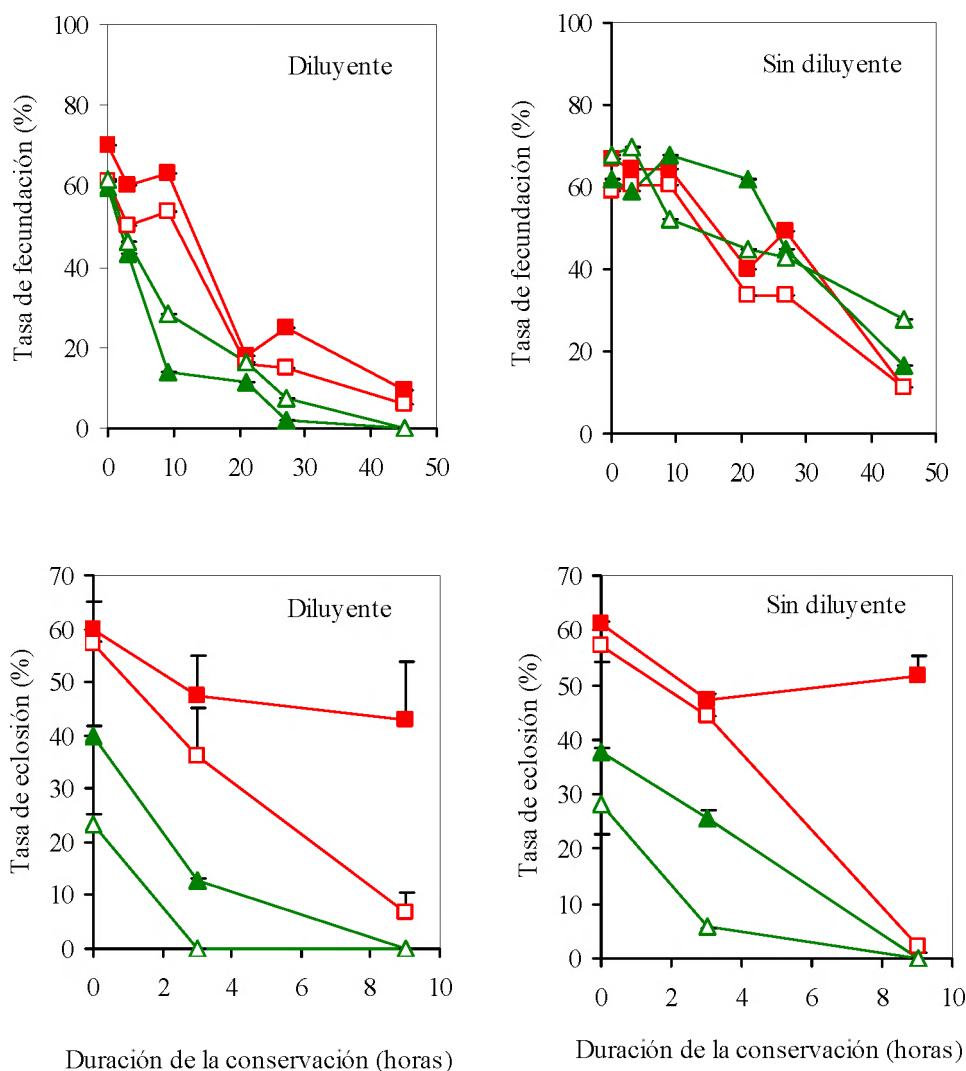


**Figura 38.** Efecto del oxígeno en la capacidad de conservación de huevos de rodaballo a corto plazo. Las líneas rojas representan a las dos puestas utilizadas por el IEO y las verdes a las utilizadas por el IFREMER.

La media del ovatocrito observado en seis puestas fue de  $62,2 \pm 14,1$ . La media de la composición del fluido ovárico de 57 puestas se presenta en la Tabla X. El uso de un fluido ovárico artificial similar al fluido ovárico decrécía las tasas de fecundación ( $p=0,0000$ ) pero no las tasas de eclosión ( $p=0,483$ ), como se muestra en la Figura 39.

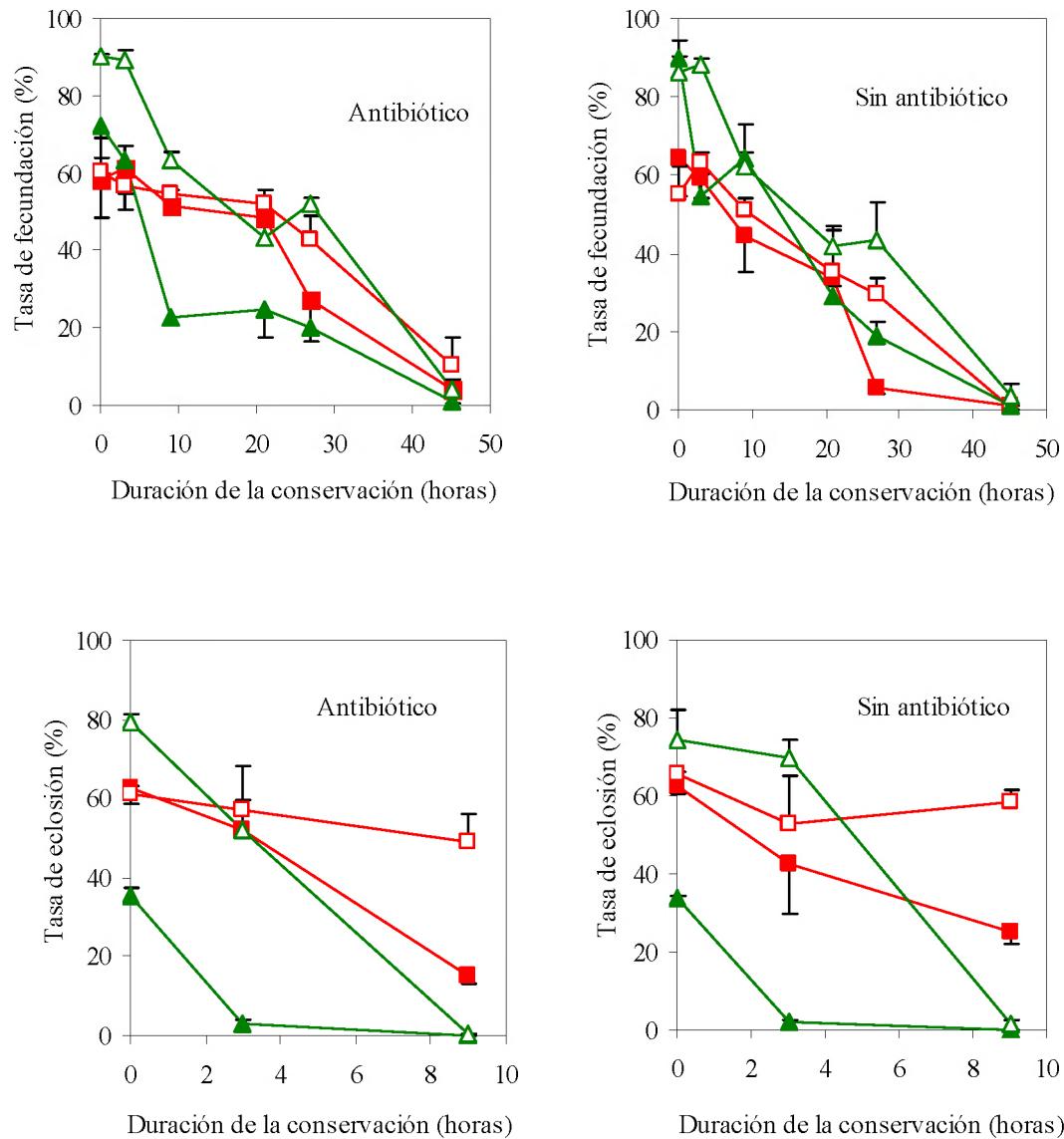
**Tabla X.** Composición media del fluido ovárico de 57 puestas obtenidas de 37 hembras de rodaballo.

	Media ± SD
$\text{Na}^+$ (mmol. $\text{L}^{-1}$ )	97,4 ± 22,4
$\text{K}^+$ (mmol. $\text{L}^{-1}$ )	7,5 ± 3,4
$\text{Ca}^{2+}$ (mmol. $\text{L}^{-1}$ )	2,1 ± 1,4
$\text{Mg}^{2+}$ (mmol. $\text{L}^{-1}$ )	2,6 ± 1,6
$\text{Cl}^-$ (mmol. $\text{L}^{-1}$ )	102,9 ± 25,6
Glucosa (mmol. $\text{L}^{-1}$ )	0,6 ± 0,3
Proteína (mg. $\text{L}^{-1}$ )	6,4 ± 4,2
Presión osmótica (mOsm. $\text{L}^{-1}$ )	234 ± 55
pH	7,60 ± 0,42

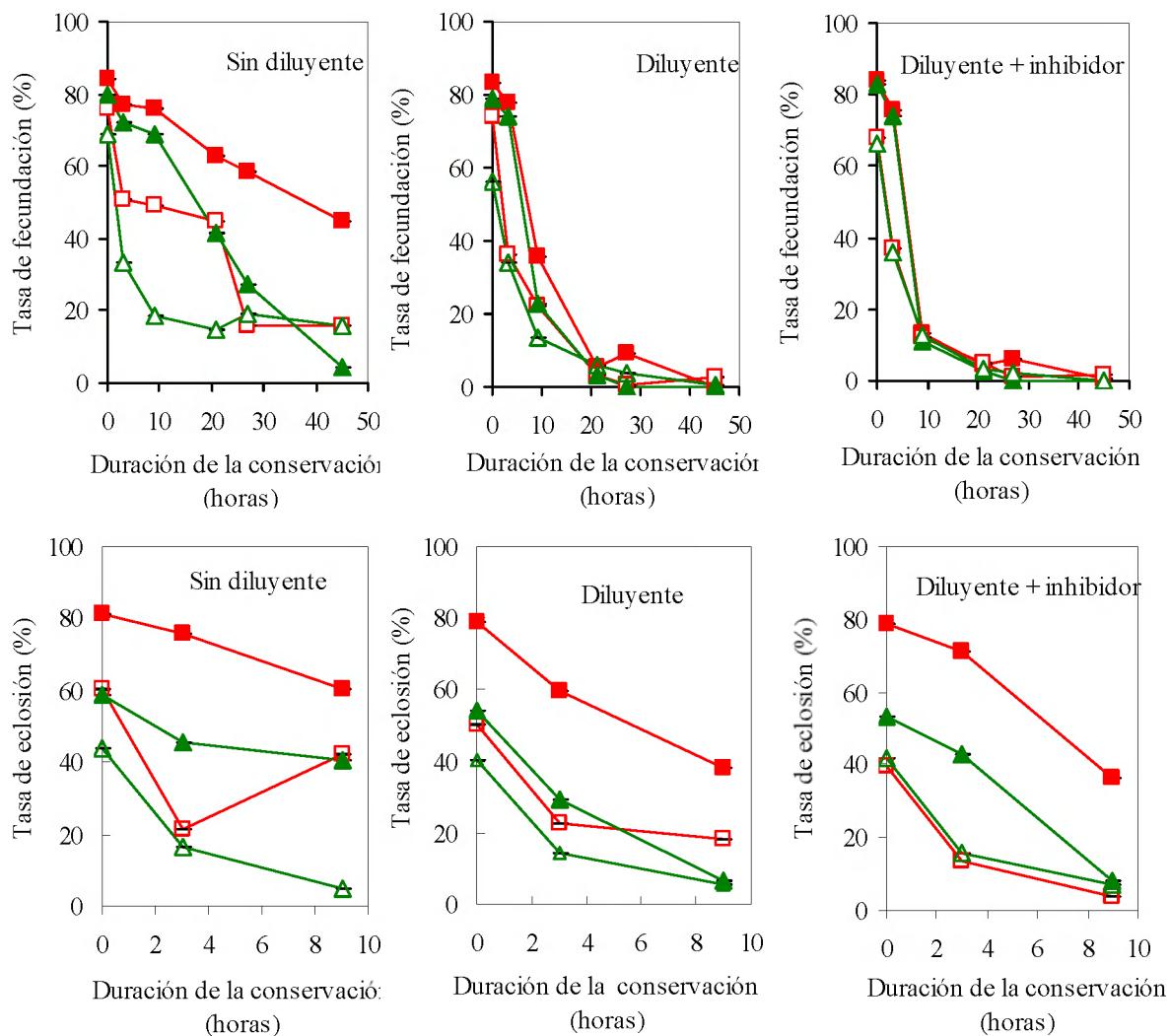


**Figura 39.** Efecto de la presencia de un fluido gonadal artificial en la capacidad de conservación de huevos de rodaballo a corto plazo. Las líneas rojas representan a las dos puestas utilizadas por el IEO y las verdes a las utilizadas por el IFREMER.

La adición de un antibiótico en la conservación de huevos, no inducía a ninguna diferencia en la capacidad de conservación de huevos con respecto a las tasas de fecundación y eclosión ( $p=0,352$ ,  $p=0,777$ ), como puede observarse en la Figura 40.

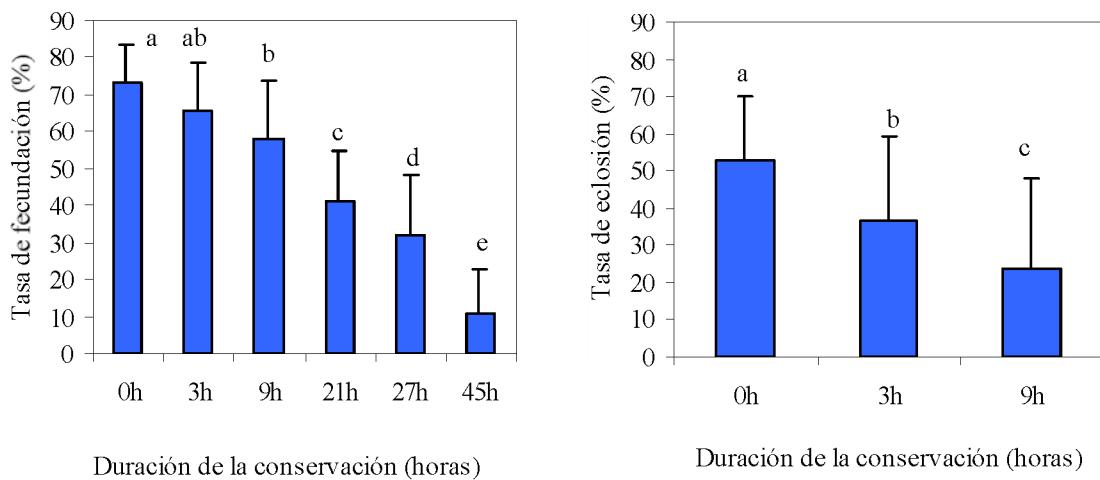


Por otro lado en el último experimento, se observó que la dilución de huevos en un fluido ovárico artificial disminuía la capacidad de conservación, como revelan las tasas de fecundación ( $p=0,0000$ ) y de eclosión ( $p=0,004$ ) representadas en la Figura 41. Se encontró una interacción significativa ( $p=0,0003$ ) entre las puestas y diluyente para las tasas de fecundación. Además, la adición de un inhibidor no cambió los resultados obtenidos cuando usamos un fluido ovárico artificial.



**Figura 41.** Efecto de la presencia de un fluido gonadal artificial o del fluido gonadal artificial con 2% del inhibidor tripsina de soja en la capacidad de conservación de huevos de rodaballo a corto plazo. Las líneas rojas representan a las dos puestas utilizadas por el IEO y las verdes a las utilizadas por el IFREMER.

La capacidad de conservación de los lotes de huevos control usados en cada uno de los seis experimentos (volumen: 0,5 mL; temperatura: 13° C; sin diluyente; n=24) mostró un decrecimiento en las tasas de fecundación y eclosión en función del tiempo de la conservación, como se representa en la Figura 42. Bajo estas condiciones, la capacidad de fecundación disminuía significativamente a  $80 \pm 20.5$  % del valor inicial después de 9 horas de conservación ( $p=0,00421$ ) y a  $57,1 \pm 19,3$  % después de 21 horas. Además, la tasa de eclosión se reducía significativamente a  $62,4 \pm 29,4$  % del valor inicial a las 3 horas y a  $38,1 \pm 37,7$  % después de 9 horas ( $p=0,00476$ ). Cuando se agruparon los datos obtenidos a 0, 3 y 9 horas desde la presión abdominal, se observaba una correlación significativa entre las tasas de fecundación (x) y las de eclosión (y):  $y = 0,84 + 0,19 x$  ( $n=72$ ,  $P=0,0009$ ,  $R=0,38$ , SE de estimación = 0,15).





## 4. DISCUSIÓN



#### 4.1 FECUNDACIÓN ARTIFICIAL

Este estudio se basó en comparar tres de los métodos generalmente usados en “hatcheries” comerciales, y no se encontraron diferencias significativas en las tasas de fecundación obtenidas utilizando el método seco FS y el húmedo FH2. Sin embargo, si encontramos diferencias entre los métodos húmedos FH1 y FH2.

Las concentraciones de los diferentes “pools” de esperma de rodaballo usados en todas las FA, fueron similares a los valores de esperma reportados por Fauvel *et al.* (1992, 1993 a) y Suquet *et al.* (1992, 1994).

En estudios preliminares para mejorar la activación del esperma en la FA (Chereguini *et al.* 1995), se obtuvieron las mayores tasas de fecundación cuando se usaba agua de mar  $35 \text{ g L}^{-1}$  como un diluyente activante, comparado con otros diluyentes (agua de mar  $20 \text{ g L}^{-1}$  o solución salina de Ringer), ya que la presión osmótica es el factor de activación del esperma de rodaballo, como observó Chauvaud (1993). En el presente estudio, también hemos observado una diferencia en la tasa de fecundación entre los dos métodos húmedos, que puede ser debida a que en la FH1 (cuando la relación huevo/agua de mar es 2V/V) la cantidad de agua de mar usada es insuficiente para activar todos los espermatozoides, y facilitar el desplazamiento de éstos al micropilo.

En la determinación de la relación óptima de esperma/huevo para cada método, se encontraron mayores tasas de fecundación significativas en la FS cuando esta relación era mayor de 9.000 espermatozoides por huevo, y en la FH2 cuando era entre 3.000-4.000. Sin embargo, no se encontraron diferencias en las tasas de fecundación obtenidas con las diferentes proporciones de esperma-huevo en la FH1, mientras que Suquet *et al.* (1995), utilizando este mismo método, recomiendan 6.000 espermatozoides por huevo para obtener el máximo éxito en la fecundación.

El gran requerimiento de esperma encontrado para la FS puede ser debido a que un porcentaje de espermatozoides inicia ya su activación al ponerse en contacto con el líquido gonadal, pero al no facilitarse su desplazamiento éstos pierden la movilidad con el tiempo. Más tarde, cuando se añade el agua de mar para activar al esperma, parte de este podría estar ya deteriorado. Esto estaría de acuerdo con Chauvaud (1993), quién reportó un porcentaje bajo de células móviles en rodaballo a presiones osmóticas menores de  $300 \text{ mOsm L}^{-1}$  (la osmolaridad del fluido gonadal es  $260 \text{ mOsm L}^{-1}$ , Suquet comm. pers.) y un incremento de la movilidad del esperma a altas presiones osmóticas, tal como la del agua de mar ( $1.050 \text{ mOsm L}^{-1}$ ), donde la movilidad es sincrónica en el 100% de los espermatozoides.

Así pues, la cantidad de esperma de rodaballo requerida no depende solamente de la calidad de los huevos (Suquet *et al.*, 1995), sino también del método de fecundación artificial usado. En el rodaballo, este requerimiento es muy bajo, como en el caso de la especie marina corvinón brasileño *Micropogonias undulatus* (1.000; Gwo *et al.*, 1991), cuando lo comparamos con especies de agua dulce. El requerimiento de esperma es de 300.000 espermatozoides para la trucha arco iris *Salmo gairdneri* Richardson, y la carpa *Cyprinus carpio* (Billard 1975; Koldras & Mejza 1983), y de 26.000



espermatozoides para el lucio *Esox lucius*. (Erdhal & Graham, 1987). Este bajo requerimiento de esperma indica que los espermatozoides de rodaballo tienen una capacidad de fecundación alta en comparación con otras especies, y como Suquet *et al.* (1995) han sugerido, esto puede ser debido a la combinación de algunas facetas específicas de los gametos del rodaballo, tales como el largo desplazamiento que realiza el espermatozoide (12 mm ; Chauvaud, 1993), la duración del movimiento celular (1-17 min; Chereguini *et al.*, 1992 a; Fauvel *et al.*, 1993a) y el pequeño tamaño del huevo (0,91-1,20 mm de diámetro), que hacen que la probabilidad del esperma en alcanzar el micropilo sea mayor que en otras especies.

#### 4.2 CONSERVACIÓN DE ESPERMA A CORTO PLAZO

La conservación del esperma bajo diferentes atmósferas mostró que la supervivencia del esperma era superior con aire que con oxígeno o nitrógeno. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Billard (1981) con esperma de trucha arcoiris, ya que los espermatozoides de rodaballo no pueden conservarse bajo una atmósfera de oxígeno. En una revisión bibliográfica sobre estudios de conservación de gametos, Stoss (1983) reportó el caso del esperma de varias especies en las que era favorable la conservación bajo condiciones anaeróbicas, y concluía que no era necesaria una gran interfase líquido-gas para el esperma de todas las especies. Sin embargo, nuestras observaciones muestran que el esperma de rodaballo tampoco puede conservarse bajo condiciones anaeróbicas, y consecuentemente una concentración del oxígeno similar a la del aire de un 21%, puede tener influencia positiva en la conservación del esperma de rodaballo.

En este estudio, cuando comparamos el efecto de diferentes diluyentes sobre la supervivencia del esperma, durante la conservación a corto plazo y bajo condiciones diferentes, los resultados obtenidos mostraron que el medio de Ringer 200 mOsm. L<sup>-1</sup> y el líquido seminal (ASL2) a 6° C, bajo una atmósfera de aire, eran diluyentes útiles para la recogida y conservación del esperma de rodaballo, ya que estos medios evitaban la movilidad del esperma durante varios días y el efecto deletéreo de la contaminación de orina. La obtención del esperma de rodaballo se realiza por presión abdominal y se recoge aspirando con una jeringa (Chauvaud *et al.*, 1995), pero la contaminación de orina no se evita completamente. En muchas especies, la recogida del esperma sin orina es muy difícil cuando se realiza una presión abdominal y esta contaminación a menudo causa una pérdida de la calidad del esperma y de la duración de la conservación. En el rodaballo se observó una pérdida de la movilidad, de las capacidades de conservación a corto plazo y de fecundación, cuando el esperma estaba contaminado por orina (Dreanno *et al.*, 1998). Resultados similares han sido reportados en varias especies de agua dulce (Linhart *et al.*, 1987; Saad *et al.*, 1988; Rana, 1995a,b). Este último autor sugirió cateterizar el testículo para evitar la contaminación en la obtención de esperma del salmón, y Linhart *et al.* (1987) mejoró la tasa de fecundación del pez gato Europeo *Silurus glanis* recogiendo el esperma en una solución inmovilizante.

En cuanto a la temperatura de conservación del esperma, nuestros resultados muestran que temperaturas entre 0° y 20° C no influyen en su conservación durante 18 horas,



pero con periodos de tiempo superiores es mejor la conservación del esperma diluido a 6° C, bajo una atmósfera de aire.

Por otro lado, en este estudio se determinó la relación adecuada esperma- diluyente para el método de conservación de esperma de rodaballo a corto plazo, comparando las tasas de fecundación utilizando diferentes relaciones esperma-diluyente almacenadas durante 0-144 horas, y no se encontraron diferencias hasta las 96 horas; se encontraron tasas de fecundación significativamente más altas a 120 y 144 horas cuando se utilizaba la relación esperma- diluyente menor (1:20). Estos resultados están de acuerdo con los de Erdahl & Graham (1987) que observaron que si el tiempo de conservación se incrementa, la fecundación decrece a diluciones mayores del esperma, mientras que a diluciones menores se mantenía la fecundación, probablemente debido a que está teniendo lugar algún efecto del tipo de dilución que causa la movilidad del esperma a diluciones mayores. Además, no se encontraron diferencias en las tasas de fecundación usando esperma diluido conservado frente al esperma fresco no diluido hasta las 96 horas.

Más aún, para validar el método de conservación de esperma de rodaballo a corto plazo, usando la relación esperma - diluyente más adecuada (1:20) previamente obtenida, y confirmar las tasas de fecundación y eclosión, se conservó el esperma diluido de 26 machos a 6° C desde 0 a 144 horas. Al comparar las tasas de fecundación y eclosión del esperma diluido y conservado a 6° C, no se encontraron diferencias en las tasas de fecundación durante 72 horas y las tasas de eclosión fueron similares desde 0 a 144 horas.

Cuando comparamos nuestros resultados en rodaballo con los reportados en otras especies, observamos que muchos presentan solamente resultados de movilidad (Bowden *et al.*, 1990; Babiak *et al.*, 1996; Christensen & Tiersch, 1996; Wayman *et al.*, 1998) y unos pocos dan tasas de fecundación, principalmente en salmonidos, para validar estos métodos de conservación a corto plazo (ver revisión de Scott & Baynes, 1980; Rana, 1995a). En general, la movilidad del esperma puede ser un parámetro útil para evaluar la viabilidad de las células del esperma, y existe generalmente una correlación entre la presencia de la movilidad del esperma de peces y su capacidad para fecundar huevos (Stoss, 1983; Erdahl, 1986; Chao *et al.*, 1987; Goodall, *et al.*, 1989). En teleósteos, es necesario un desplazamiento progresivo del esperma para penetrar en el micropilo (Ginzburg, 1972). Sin embargo, es cierto que la movilidad no siempre es una garantía de la capacidad de fecundación (Ginzburg, 1972; Alberdice *et al.*, 1988b; Scott & Baynes, 1980), principalmente cuando el esperma es conservado *in vitro* durante varios días (Carpentier & Billard, 1978). Esto es debido a que diferentes partes del espermatozoide que son responsables del desplazamiento (cola) y de la fecundación (cabeza), pueden sufrir cambios patológicos diferenciales, que pueden ser incrementados con la duración de la conservación o almacenamiento (Saad *et al.*, 1988).

Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Alberdice *et al.* (1988b) en bacalao negro *Anoplopoma fimbria*, donde obtuvieron una relativa buena fecundación (48,4 %) después de 3 días de conservación, pero no hubo fecundación después de 6



días, incluso cuando el esperma conservado mostraba todavía movilidad. Por otra parte, Lim *et al.* (1997) encontraron buenas tasas de fecundación en brema negra *Acanthopagrus schlegeli* después de 7-10 días de conservación del esperma en suero de brema negra.

#### 4.3 CONSERVACIÓN DE ESPERMA A LARGO PLAZO

Los primeros resultados de la viabilidad del esperma crioconservado de rodaballo, mostraron que el esperma descongelado presentaba una buena movilidad después de 9-10 meses de almacenaje en nitrógeno líquido, y que la adaptación de esta técnica era válida (Chereguini *et al.*, 1992a,b; Suquet *et al.*, 1998b). Sin embargo, era necesario realizar fecundaciones con esperma descongelado, porque aunque se ha mostrado una correlación entre la movilidad del esperma y la capacidad de fecundación (Stoss, 1983; Erdahl, 1986; Chao *et al.*, 1987), la movilidad no es siempre una garantía de calidad (Ginzburg, 1972; Scott & Baynes, 1980), sobre todo después de que el esperma ha sido congelado y puede sufrir cambios o daños durante la congelación (Legendre & Billard, 1980; Rana, 1995a; Yao *et al.*, 2000). Los primeros experimentos de fecundación con esperma crioconservado, usando como diluyentes el medio Ringer y el Mounib modificado, así como diferentes relaciones esperma: diluyente (1:2 y 1:3), mostraron que no había diferencias entre los dos diluyentes y las diluciones usadas (Peleteiro *et al.*, 1996).

En este estudio sobre la supervivencia del esperma crioconservado usando dos diluyentes, Ringer 200 y Mounib, con 10-20% de yema de huevo o leche descremada como crioprotectores no permeables, no se encontraron diferencias en la movilidad del esperma descongelado respecto al incremento o sustitución de la yema de huevo o leche descremada; sin embargo, aunque la movilidad del esperma descongelado era buena con ambos diluyentes, el medio Mounib era significativamente mejor, quizás debido al efecto protector de la sacarosa del medio Mounib sobre la membrana del espermatozoide (Crowe *et al.*, 1988). Estos resultados muestran que el medio Mounib, modificado por Legendre y Billard (1980) para el esperma de trucha, es adecuado para el rodaballo. Cuando se crioconservó el esperma de ocho machos de rodaballo, usando el medio Mounib con 10% DMSO y 10% de yema de huevo en la crioconservación, se encontró que la capacidad de fecundación era alta, aunque ligeramente inferior a la del esperma fresco.

Por otro lado, la utilización de una dilución menor esperma-diluyente (1:1) en la crioconservación, no influyó en las tasas de fecundación obtenidas tras las fecundaciones artificiales, y hace posible incrementar el volumen de esperma a la hora de congelar, lo cual es muy interesante desde un punto de vista práctico. Estos resultados, en cuanto al tipo de dilución, son similares a los obtenidos para otras especies de agua dulce. En carpa *Cyprinus carpio*, no se encontraron diferencias entre 1:1 y 1:2 (Moczarski, 1977). En trucha arcoiris *Salmo gairdneri*, tampoco se encontraron diferencias en fecundación entre 1:1 y 1:3 (Stoss *et al.*, 1978). En otras dos especies marinas, lubina *Dicentrarchus labrax* y dorada *Sparus aurata*, la dilución optima encontrada fué de 1:1, siendo desaconsejable utilizar diluciones mayores a 1:2



(Billard, 1978). Por otra parte, diluciones superiores a 1:20 y 1:50 en corvinón brasileño *Micropogonias undulatus* y dorada *Sparus aurata* respectivamente, reducen la supervivencia del esperma descongelado (Gwo *et al.*, 1991; Chambeyron & Zohar, 1990). En rodaballo, diluciones entre 1:1 y 1:9 no modificaban la tasa de la movilidad del esperma descongelado (Dreanno *et al.*, 1997).

Al comparar los criotubos de 2 mL de capacidad frente a las tradicionales pajuelas de 0,5 mL, no se encontraron diferencias en las tasas de fecundación y eclosión, tras una modificación realizada en la habitual técnica de crioconservación. Esta sencilla modificación, cambiando la distancia entre el flotador y la superficie de nitrógeno líquido de la caja y prolongando el tiempo, permite cambiar las condiciones de congelación. Las condiciones de congelación no dependen solamente del tamaño del contenedor o tubo usado, sino que son también específicas de la especie (Lahnsteiner, 2000). Así, Yao *et al.* (2000) encontraron una menor movilidad del esperma descongelado en pajuelas de 1,7 mL que con pajuelas de 0,25 mL, debido a las bajas tasas de congelación obtenidas con las pajuelas de 1,7 mL. Cabrita *et al.* (2001) también encontraron unas tasas de fecundación ligeramente menores con esperma descongelado en pajuelas de 5 mL que con pajuelas de 0,5 mL (73,2% y 84%, respectivamente); sin embargo al fecundar grandes volúmenes de huevos con esperma descongelado en pajuelas de 5 mL las tasas de fecundación eran similares (73%), y esa ligera pérdida de fecundación es compensada por las ventajas de utilizar pajuelas de mayor volumen. Los resultados obtenidos en este estudio están de acuerdo con los obtenidos en salmonidos por Lahnsteiner *et al.* (1997a, 1998) que utilizando diferentes condiciones de congelación con pajuelas de 0,5 mL y criotubos de 1,2 mL y 5 mL, obtuvo también tasas de fecundación similares a las pajulas cuando en la crioconservación se utilizaron tasas de congelación más bajas y tasas de descongelación más altas.

El incrementar el volumen de esperma a congelar, mediante el uso de diluciones menores esperma-diluyente y de tipos de contenedores más grandes en la crioconservación, era interesante debido a la demanda para realizar la transferencia de esta tecnología a “hatcheries” comerciales, especialmente interesadas en su uso para programas de selección genética.

Estos resultados obtenidos anteriormente sobre la crioconservación del esperma de rodaballo, nos ha llevado a realizar un estudio de crioconservación del mismo, con el mayor número de machos, a fin de confirmar o validar la técnica puesta a punto con fecundaciones artificiales. En el estudio de crioconservación de esperma realizado con 49 machos diferentes, se encontró que las tasas de fecundación obtenidas con la misma cantidad de esperma fresco y crioconservado eran similares en un 75% de las veces. Sin embargo, en un 25% de las fecundaciones artificiales, con tasas de fecundación menores al 69,2%, había diferencias entre los dos tipos de esperma. Estas diferencias podrían ser debidas a la variabilidad inherente de los ejemplares usados, más que a la propia técnica de crioconservación, ya que el esperma de rodaballo ha mostrado una buena aptitud en la congelación en anteriores estudios (Chereguini *et al.*, 1992a,b; Dreanno *et al.*, 1997; Ogier de Baulny, 1997). Estas diferencias de fecundación entre ejemplares han sido encontradas también en otras especies, como el halibut Atlántico

*Hippoglossus hippoglossus* y lucio *Esox lucius* (Bolla *et al.*, 1987; Babiak *et al.*, 1997a). En cuanto a la eclosión, no se encontraron diferencias entre los dos tipos de esperma, como tampoco se han encontrado tales diferencias entre esperma fresco y crioconservado en estudios realizados con lucio *Esox lucius* (Babiak *et al.*, 1995; Lahnsteiner *et al.*, 1998), carpa *Cyprinus carpio* (Magyary *et al.*, 1996; Babiak *et al.*, 1997b), trucha arcoiris *Salmo gairdneri* (Conget *et al.*, 1996), o peces planos (Tabata & Mizuta, 1997). Sin embargo, si se han encontrado diferencias en eclosión con lubina *Dicentrarchus labrax* (Fauvel *et al.*, 1998a,b).

#### **4.4 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LARVAS OBTENIDAS CON ESPERMA CRIOCONSERVADO**

Las investigaciones llevadas a cabo con la crioconservación de esperma, se continuaron con otro estudio sobre el crecimiento de las larvas obtenidas después de fecundaciones artificiales realizadas con esperma fresco y crioconservado de cuatro machos diferentes, utilizando esta técnica de crioconservación de esperma. Los únicos datos sobre el crecimiento de larvas de rodaballo producidas con esperma crioconservado fueron obtenidos previamente por Suquet *et al.* (1998b), pero solamente hasta el día 10 de vida larvaria.

En el presente estudio, basado en cuatro FA realizadas con esperma fresco y crioconservado, cuando comparamos las tasas de fecundación y eclosión utilizando los dos tipos de esperma del mismo macho, no se encontraron diferencias significativas. Estos resultados fueron similares a los reportados por Peleteiro *et al.* (1996) y Suquet *et al.* (1998) en rodaballo.

Fueron obtenidas tasas de eclosión similares, al comparar el esperma fresco y crioconservado, por Babiak *et al.* (1995) y Lahnsteiner *et al.* (1998) en lucio *Esox lucius*; por Magyary *et al.* (1996) y Babiak *et al.* (1997b) en carpa *Cyprinus carpio*; y en hembras ginogenéticas con reversión de sexo de lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* (Tabata & Mizuta, 1997).

Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en longitud y peso húmedo en larvas de 0, 7 y 14 días de edad obtenidas con esperma fresco y crioconservado. Nuestros resultados están de acuerdo con los de Suquet *et al.* (1998), que tampoco encontraron diferencias significativas en la supervivencia y en el peso de larvas de 10 días de edad.

Al final de 31 días de cultivo, en dos de las FA (FA 1 y FA 2) los grupos de larvas de esperma fresco y crioconservado no presentaron diferencias en el crecimiento. En las otras dos se encontraron diferencias; en la FA 3 las larvas obtenidas con esperma crioconservado eran más grandes y en la FA 4 las larvas obtenidas con esperma fresco tambien eran más grandes. Esta diferencia es debida más probablemente a la variabilidad inherente al cultivo larvario de rodaballo que al tipo de esperma empleado (Kingwell *et al.*, 1977; Stottrup & Attramadal, 1992; Stottrup & Gravning, 1993; Olmedo, 1996), y también a la variabilidad de los reproductores utilizados en nuestro estudio, ya que machos y hembras fueron diferentes en cada FA.



#### **4.5 EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE ALEVINES PRODUCIDOS CON ESPERMA CRIOCONSERVADO**

Aunque hay muchos estudios sobre crioconservación de esperma de especies de agua dulce y de especies marinas con éxito, hay pocos estudios sobre la supervivencia y el crecimiento de la descendencia producida utilizando esperma congelado y descongelado.

La supervivencia registrada en los alevines de rodaballo después de un año de engorde fue similar entre ambos grupos GS Y GC. Estos resultados están de acuerdo con Moczarski (1977) que no encontró decrecimiento en las tasas de supervivencia en juveniles de carpa *Cyprinus carpio* de un año de edad procedentes de fecundaciones realizadas con esperma descongelado.

Los datos de crecimiento de los dos grupos de alevines de rodaballo están de acuerdo con los resultados obtenidos en tilapia *Oreochromis hornorum* por Chao *et al.* (1987) donde juveniles de tilapia producidos con esperma descongelado, crecían tan bien como el grupo control, alcanzando 800 gramos después de 18 meses; y en el pez gato Americano *Ictalurus punctatus* tampoco encontraron diferencias a ninguna edad (2-12 meses) entre la descendencia producida con esperma crioconservado o esperma no tratado, y los juveniles de tilapia crecían con la misma tasa de crecimiento hasta los 30 gramos (Tiersch *et al.*, 1994).

Sin embargo, se obtuvieron diferencias significativas en el pez gato Africano *Clarias gariepinus* entre las longitudes y pesos medios en algunos grupos a 30, 60 y 90 días, donde los obtenidos con esperma crioconservado eran más pequeños, pero estamos de acuerdo con el autor en que estas diferencias podrían ser atribuidas a condiciones ambientales variables encontradas entre los tanques de cultivo (Van der Walt *et al.*, 1993), también obtenidas por Klar *et al.* (1988).

Algunos estudios sobre la calidad de la descendencia obtenida con esperma congelado del pez gato Africano y descongelado después de un mes, obtienen una tasa de crecimiento más uniforme en la descendencia producida con esperma crioconservado, que era atribuida al hecho de que casi toda la descendencia tenía idéntico genotipo (Wan der Bank & Steyn, 1992). Al contrario, en nuestro estudio con alevines de rodaballo, durante un periodo de un año, encontramos tasas de crecimiento similares pero no un crecimiento más uniforme para los juveniles producidos con esperma crioconservado.

#### **4.6 CONSERVACIÓN DE HUEVOS A CORTO PLAZO**

Cuando estimamos las tasas de fecundación de los huevos de rodaballo, observamos que los blastómeros eran menos visibles a medida que aumentaba la duración de la conservación, y presentaban anormalidades morfológicas más frecuentemente, lo que sugería una pérdida de la calidad del huevo. El decrecimiento en la tasa de eclosión, comparado al de la tasa de fecundación era más temprano o precoz. Esta observación confirma los resultados ya obtenidos por McEvoy (1984) en rodaballo. La capacidad

de fecundación de huevos de limanda japonesa *Limanda yokohama* era alta después de tres días desde su obtención, mientras que la tasa de eclosión decrecía después de solo 24 horas (Hirose *et al.*, 1979). Este decrecimiento retardado en la tasa de fecundación fue también observado en el arenque Pacífico *Clupea harengus pallasi* y en el halibut Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* (Hay, 1986); Basavaraja, 1991). De acuerdo con las observaciones previamente publicadas por Kjorsvik *et al.* (1983), esto indica que la tasa de fecundación de huevos de algunas especies de peces es mantenida por más tiempo que su capacidad a sobrevivir la fase de desarrollo embrionario. En rodaballo, esta observación puede explicarse por el bajo coeficiente de correlación obtenido entre la tasas de fecundación y eclosión, cuando se agruparon los datos obtenidos a 0, 3 y 9 horas desde la presión abdominal para la obtención de huevos.

La capacidad de conservación de huevos en el rodaballo no cambia ni con el incremento del volumen de huevos de 0,5 a 2,5 mL, ni con la incorporación de oxígeno. Este resultado sugiere un bajo requerimiento de oxígeno de los huevos de rodaballo. En la conservación de huevos del salmon *Oncorhynchus kisutch* tampoco se encontraron diferencias usando aire o oxígeno (Rosenberg, 1983). Por otro lado, se observó una mejor capacidad de conservación de huevos del salmón *Oncorhynchus keta* cuando se incrementaba la relación aire-huevos (Jensen & Alberdice, 1984). Más aún, la incorporación de oxígeno incrementa la supervivencia de los huevos de tilapia *Sarotherodon mossambicus* y del matalote jorobado *Xyrauchen texanus* (Carmichael *et al.*, 1996).

El uso de antibióticos no cambia la supervivencia de los huevos del rodaballo durante el periodo de conservación. Una flora bacteriana, de 10 a  $10^3$  bacterias por huevo, fue asociada con huevos de esta especie (Omnes *et al.*, 1993). La proliferación bacteriana en huevos de tilapia *Sarotherodon mossambicus* después de 19 horas de conservación, fue inhibida con sulfato de kanamicina (Harvey & Kelley, 1984). Sin embargo, el decrecimiento de la calidad de los huevos de rodaballo observado durante el periodo de conservación en presencia de un antibiótico, podría deberse más a la lisis celular que al desarrollo de una flora bacteriana.

Se registró una mejor supervivencia de huevos de rodaballo a  $8^\circ$  y  $13^\circ$  C que a  $3^\circ$  C. Sin embargo, un descenso de la temperatura de  $15^\circ$  C a  $3^\circ$  C prolongaba la supervivencia de huevos del salmón *Oncorhynchus keta* (Jensen & Alberdice, 1984). Por otro lado, fue obtenida una mayor capacidad de conservación de huevos de carpa de hierba *Ctenopharyngodon idella* a  $22^\circ$  C que a  $9^\circ$  C (Zlabek & Linhart, 1987). La temperatura óptima para la conservación de huevos en el pez gato Europeo *Silurus glanis* es de  $19^\circ$  C (Linhart & Billard, 1995 b) y en tilapia *Sarotherodon mossambicus* de  $20^\circ$  C (Harvey & Kelley, 1984). Para la conservación de huevos de rodaballo a bajas temperaturas, podría ser necesario incluir crioprotectores en el diluyente.

La incorporación de un fluido ovárico artificial a los huevos de rodaballo no incrementa la supervivencia de éstos. Mientras que, la dilución de los huevos de trucha arcoiris en un medio ovárico artificial o en plasma sanguíneo, incrementaba su capacidad de conservación (Billard & Jalabert, 1974); sin embargo, decrecían la supervivencia de huevos de esta especie la utilización de soluciones de sucrosa con



---

presiones osmóticas entre 200 y 300 mOsm. L<sup>-1</sup> (Billard, 1980). La incorporación de un inhibidor de tripsina de soja incrementaba la capacidad de conservación de huevos del carpín *Carassius auratus*, al bloquear la expansión del corion (Hsu & Goetz, 1993). Sin embargo, el uso de este inhibidor en huevos de rodaballo no incrementaba la capacidad de conservación de éstos. No se observó una activación espontánea durante el periodo de conservación de huevos de esta especie.

La presión osmótica estimada en el fluido ovárico del rodaballo es baja en comparación a otras especies: en salmonidos es de 256 a 292 mOsm.L<sup>-1</sup> (Lahnsteiner *et al.*, 1995), en carpa *Cyprinus carpio* es de 305 mOsm.L<sup>-1</sup> (Plouidy & Billard, 1982), y en la liebre de mar *Cyclopterus lumpus* es de 359 mOsm.L<sup>-1</sup> (Davenport & Lonning, 1983). Sin embargo, fue medida una presión osmótica baja en el fluido ovárico del ciprínido *Alburnus alburnus* (237 mOsm.L<sup>-1</sup>; Lahnsteiner *et al.*, 1997 b). En rodaballo, la media del pH (7,60) es también más baja que los valores registrados en salmonidos (8,4 – 8,8; Lahnsteiner *et al.*, 1995) o en carpa *Cyprinus carpio* (8,5; Plouidy & Billard, 1982). Sin embargo, se observa una alta concentración de proteínas en rodaballo, en comparación con salmonidos (0,95-2,78 mg L<sup>-1</sup>; Lahnsteiner *et al.*, 1995) o en la liebre de mar *Cyclopterus lumpus* (1,58 mg L<sup>-1</sup>).

La supervivencia de los huevos de rodaballo a 13°C, sin ningún diluyente es bastante más baja en comparación al esperma (Billard *et al.*, 1996; Rana, 1995a,b), y cuando los huevos fueron fecundados 3 horas después de la presión abdominal, la tasa de eclosión era inferior a un 62,4 ± 29,4% del control. La baja capacidad de conservación de huevos ha sido también registrada en otras especies de peces: de 1 a 6 horas en carpa *Cyprinus carpio* (Linhart *et al.*, 1995a), de 2 a 12 horas en siluros (Legendre *et al.*, 1996), de 3 a 6 horas en trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* y 12 horas en la trucha *Salmo trutta fario* (Marcel *et al.*, 1982), de 1 a 9 horas en bacalao *Gadus morhua* (Kjorsvik & Lonning, 1983) y de 6 horas en el halibut Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* (Holmefjord, 1991). En el ovario de rodaballo, McEvoy (1984) mostró que la capacidad de conservación de huevos era de 10 horas después de la ovulación a 12-14° C; y que después de 24 horas en el ovario, no había eclosión.



## **5. CONCLUSIONES**



## 5.1

La relación óptima del esperma-huevo en el método de fecundación seca (FS) y húmeda (FH2), es de 9.000 y entre 3.000-4.000 espermatozoides por huevo, respectivamente, para obtener las máximas tasas de fecundación en puestas de rodaballo con viabilidades superiores al 70%. Se recomienda a las empresas comerciales productoras de rodaballo el método de fecundación FH2, por el bajo requerimiento de esperma.

## 5.2

Los resultados indican que el método de conservación de esperma de rodaballo a corto plazo, usando una dilución del esperma en el medio Ringer 200 mOsm.L<sup>-1</sup> de 1:20, mantiene la capacidad de fecundación durante tres días y las tasas de eclosión como las obtenidas con el esperma fresco. Este método de conservación del esperma puede ser una técnica útil para la gestión práctica de los reproductores del rodaballo y complementaria a la crioconservación para incrementar la diversidad genética en empresas comerciales productoras del rodaballo.

## 5.3

El estudio sobre la crioconservación de esperma de rodaballo, utilizando en la fecundación artificial la misma cantidad de esperma, no solo valida nuestra técnica puesta a punto, sino que muestra que con esta técnica se obtienen tasas de fecundación y eclosión similares a las del esperma fresco, aunque se observa una cierta variabilidad entre las muestras crioconservadas. Por tanto, la crioconservación de esperma de rodaballo puede ser considerada una técnica práctica, sencilla y útil, que presenta enormes ventajas en la gestión de reproductores para las empresas comerciales productoras de rodaballo.

Sin embargo, es todavía necesaria una investigación posterior para determinar la cantidad óptima de esperma crioconservado por huevo que debe emplearse en la fecundación artificial (FA) con el fin de alcanzar las mayores tasas de fecundación y optimizar más esta técnica de crioconservación, tal y como se ha realizado para el esperma fresco.

## 5.4

Los resultados indican que el uso de esperma fresco o crioconservado durante la fecundación artificial (FA) no es un factor determinante en la fecundación, eclosión o en el crecimiento de la larvas, ya que en el destete, solamente un caso mostró un menor crecimiento de las larvas producidas con esperma crioconservado. En conclusión, nuestros resultados confirman una vez más la alta calidad del esperma de rodaballo obtenido empleando la técnica de crioconservación.



## 5.5

La supervivencia, el crecimiento y la calidad de alevines producidos con esperma crioconservado es similar a las de esperma fresco. Nuestros resultados confirman que la técnica de crioconservación es una herramienta útil para mejorar el rendimiento del cultivo de rodaballo a nivel industrial.

## 5.6

Este estudio muestra que la viabilidad de los huevos decrece muy rápidamente durante su conservación en vitro a 13° C sin ningún diluyente. Cuando los huevos fueron fecundados 3 horas después de la presión abdominal, la tasa de eclosión era inferior a un  $62,4 \pm 29,4\%$  del valor inicial. A excepción de la temperatura, los factores estudiados tienen un bajo efecto sobre la capacidad de conservación de huevos de rodaballo.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- 
- Alberdice D.F., Jensen J.O.T. & Velsen F.P.J., 1988 a. Preliminary trials in incubation of sablefish eggs (*Anoplopoma fimbria*). *Aquaculture* 69, 271-290.
- Alberdice D.F., Jensen J.O.T. & Velsen F.P.J., 1988 b. Incubation of sablefish (*Anoplopoma fimbria*) in a system designed for culture of fragile marine teleost eggs. *Aquaculture* 71, 271-283.
- Alderson R. & Bromley P.J., 1973. A method for rearing larvae of the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). to metamorphosis. International Council for the Exploration of the sea. C.M. 1973/ E:20.
- Alessio G. & Bronzi P., 1975. Artificial reproduction of gilthead bream, *Sparus aurata* (L.) (Osteichthyes, Sparidae) 2. The artificial insemination, incubation and hatching of eggs obtained by hormone induced ovulation. *Bulletino di pesca, piscicoltura e idrobiologia* 29, 123-132.
- Al Maghazachi S.J. & Gibson R. 1984. The developmental stages of larval turbot *Scophthalmus maximus* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 82, 35-51.
- Anthony R., 1910. The cultivation of the turbot. *Proc. 4<sup>th</sup> Int. Fishery Congress*, Washington, 1908. U.S. Bureau of Fisheries Bull. 28 (2), 859-870.
- Babiak I., Goglowski J., Luczynski M.J., Kucharczyk D. & Luczynski M., 1995. Cryopreservation of the milt of the northern pike. *Journal of Fish Biology* 46, 819-828.
- Babiak I., Glogowski J., Kozlowski J., Chybowski L. & Ulikowski D., 1996. Short-term preservation of European Catfish (*Silurus glanis* L.) milt. *Arch. Pol. Fish.* 4,1, 85-90.
- Babiak I., Goglowski J., Luczynski M.J. & Luczynski M., 1997 a. Effect of individual male variability on cryopreservation of northern pike, *Esox lucius* L., sperm. *Aquaculture Research* 28, 191-197.
- Babiak I., Goglowski J., Brzuska E., Szumiec J. & Adamek J., 1997 b. Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research* 28, 567-571.
- Babiak I., Glogowski J., Kujawa R., Kucharczyk D. & Mamcarz A., 1998. Cryopreservation of sperm from *Aspius aspius*. *The Progressive Fish-Culturist* 60, 146-148.
- Barton L.A., 1981. Egg-quality of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) kept in captive conditions. PhD thesis, University of Liverpool, UK. 127 pp.

- 
- Basavaraja N., 1991. Effects of stripping and fertilization methodology on egg quality in the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), Thesis, University of Stirling, 67 p.
- Baynes S.M. & Scott A.P., 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: The influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture* 66, 53-67.
- Billard R., 1975. L'insémination artificielle de la truite, *Salmo gairdneri* Richardson. Effects de la dilution et définition du rapport potimum gamètes/dilueur. *Bulletin Francaise de Pisciculture* 257, 121-135.
- Billard R., 1978. Some data on gametes preservation and artificial insemination in teleost fish. *Actes Collection of Center National of Exploitation Oceans (CNEXO)* 8, 59-73.
- Billard R., 1980. Survie des gametes de truite arc-en ciel après dilution dans des solutions salines ou de sucre. *Reproduction, Nutrition, Development* 20, 1899-1905.
- Billard R., 1981. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 23, 287-293.
- Billard R., 1984. La conservation des gametes et l'insémination artificielle chez le bar et la daurade. En: *L'Aquaculture du Bar et des Sparidés*. Institut National de la Recherche Agronomique Publication, Paris, 95-116.
- Billard R., 1988. Artificial insemination and gamete management in fish. *Marine Behaviour Physiology* 14, 3-21.
- Billard R., 1990. Artificial insemination in fish. En: *Marshall's Physiology of Reproduction*, Lamming G.E (Ed.), Churchill Livingstone, Edinburgh, Vol. 2, 870-888.
- Billard R., Breton B. & Jalabert B., 1971. La production spermatogénétique chez la truite. *Annales de Biologie animale Biochimie et Biophysique* 11, 190-212.
- Billard R. & Jalabert B., 1974. L'insémination artificielle de la truite (*Salmo gairdneri* Richardson) II- Comparaison des effets de différents dilueurs sur la conservation de la fertilité des gamètes avant et après insémination. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 14, 601-610.
- Billard R., Petit J., Jalabert B. & Szollosi D., 1974. Artificial insemination in trout using a sperm diluent. En: *The early life history of fish*. Blaxter J.H.S. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, 765 pp.

- Billard R. & Dupont R., 1975. Etudes sur la congélation du sperme de poissons marins (bar, daurade, turbot). Rapport Science Contract d'activité CNEXO, 15 p.
- Billard R., Dupont R. & Barnabe G., 1977. Diminution de la mobilité et la durée de conservation du sperme de *Dicentrarchus labrax* L. pendant la période de spermiation. Aquaculture 11, 363-367.
- Billard R. & Gillet C., 1981. Vieillissement des ovules et potentialisation par la température des effets des micropolluants du milieu aquatique sur les gamètes chez la truite. Cah. Lab. Montereau 12, 35-42.
- Billard R., Cosson J., Crim L.W. & Suquet M., 1995. Sperm physiology and quality. En: Broodstock management and egg and larval quality. Bromage N.R. & Roberts R.J (Eds). Blackwell Science, Oxford, 25-52.
- Billard R., Suquet M. & Dreanno C., 1996. La conservation à court terme des gamètes de poissons, En: Proc. Refrigeration and Aquaculture, International Institute of Refrigeration. Coll. Biotechnica, 437-442.
- Blaxter J.H.S., 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. Nature 172, 1189-1190.
- Blaxter J.H.S., 1955. Herring rearing. I. The storage of herring gametes. Marine Research. Department of Agriculture and Fisheries for Scotland 3, 1-12.
- Blaxter J.H.S., 1963. The behaviour and physiology of herring and other clupeids. En: Advances in Marine Biology, Vol. 1, Academic Press, London, 261-293.
- Bolla S., Holmefjord I. & Refstie T., 1987. Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. Aquaculture 65, 371-374.
- Bowden D.G., Groot E.P. & Jensen J.O.T., 1990. Tests on short-term storage of Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepsis*) sperm and salinity tolerance of Pacific halibut and sablefish (*Anoplopoma fimbria*) sperm. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 1725.
- Broonprakov U. & Dhebtaranon Y., 1974. Experiments on artificial fertilization and descriptive studies of eggs and larvae of Indo-Pacific mackerel *Rastrilliger neglectus* (Van Kampen). Indo-Pacific Fisheries Council Proceedings 15 (III), 144-158.
- Browley P.J., 1978. The weaning of hatchery reared turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) on a dry diet. Aquaculture 8, 115-128.
- Browley P.J. & Howell B.R., 1983. Factors influencing the survival and growth of turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L., during the change from live to compound feeds. Aquaculture 31, 31-40.

- Bromley P.J., Sykes P.A. & Howell B. R., 1986. Egg production of turbot (*Scophthalmus maximus*) spawning in tank conditions. *Aquaculture* 53, 287-293.
- Brown, J.A.G., Jones A. & Matty A.J., 1984. Oxygen metabolism of farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). 1. The influence of fish size and water temperature on metabolic rate. *Aquaculture* 36, 273-281.
- Bye V. & Htun-Han M., 1979. Light and temperature are key to controlled spawning. *Fish Farmer* 2, 27-28.
- Cabrita E., Robles V., Alvarez R. & Herraez P., 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture* 201, 301-314.
- Carmichael G.J., Williamson J.H., Gorman O.T. & Tiersch T.R., 1996. Field propagation techniques for the endangered razorback sucker. *N. Am. J. Fish. Manag.* 16, 963-966.
- Carpentier P. & Billard R., 1978. Conservation à court terme des gamètes de Salmonidés à des températures voisines de 0°C. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 18, 1083-1088.
- Chambeyron F. & Zohar Y., 1990. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquaculture* 90, 345-352.
- Chao N.H., Chao W.C., Liu F.C. & Liao I., 1987. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *Journal of Fish Biology* 30, 107-118.
- Chauvaud L., 1993. Motilité et énergétique des spermatozoides de turbot (*Scophthalmus maximus*). Diplomé d'Etudes Apprfondies. Université de Bretagne Occidentale. Brest, 30 pp.
- Chauvaud L., Cosson J., Suquet M. & Billard R., 1995. Sperm motility in turbot, (*Scophthalmus maximus*): initiation of movement and changes with time of swimming characteristics. *Environ. Biol. Fish.* 43, 341-349.
- Chen F.Y., Chow M., Chao T.M. & Lim R., 1977. Artificial spawning and larval rearing of the grouper *Epinephelus tauvina* (Forsskal) in Singapore. *Singapore Journal of Primary Industry* 5, 1-21.
- Chereguini O., Fernandez Pato C. & Rasines I., 1992 a. Adaptación de la Técnica de Crioconservación de esperma de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y besugo (*Pagellus bogaraveo*). Informe Técnico Instituto Español de Oceanografía 117, 1-13.
- Chereguini O. & Peleteiro J.B. , 1992 b. Preliminary studies on the cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) and black-spot seabream (*Pagellus bogaraveo*) sperm.

Abstracts Workshop on gamete and embryo storage and cryopreservation in aquatic organisms. Marly le Roi, 30 Marzo-2 Abril. Francia.

Chereguini O., Peleteiro B., Cal R. & García A., 1995. Preliminary results of different methods of artificial fertilization with fresh sperm of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). International Council for the Exploration of the Sea marine Science Symposium 201, 170-172.

Christensen J.M. & Tiersch T.R., 1996. Refrigerated storage of channel catfish sperm. J. World Aquacult. Soc. 27, 3, 340-346.

Conget P., Fernandez M., Herrera G. & Minguell J.J., 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. Aquaculture 143, 319-329.

Cousin J.C.B. & Baudin-Laurencin F.B., 1985. Morphogénèse de l'appareil digestif et de l vessie gazeuse du turbot, *Scophthalmus maximus* L Aquaculture 47, 305-319.

Cousin J.C.B, Balouet G., Baudin-Laurencin F.B., 1986. Altérationa histologiques observées chez des larves de turbot (*Scophthalmus maximus* L) en élevage intensif. Aquaculture 52, 173-189.

Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F., Rudolph A.S., Aurel Wistrom C., Spargo B.J. & Anchordoguy T.J., 1988. Interaction of sugars with membranes. Biochmin. Biophys. Acta 947, 367-384.

Davenport J. & Lonning S., 1983. On the structure and function of the urogenital system of the female lump sucker *Cyclopterus lumpus* L. (Teleostei: Scorpaeniformes). Proc. R. Soc. Lond. B 218, 201-210.

Devauchelle N., Alexandre J.C., Le Corre N., & Letty Y., 1986. Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus*) in captivity. ICES C.M./ F:10.

Devauchelle, N., Alexandre J.C, Le Corre N. & Letty Y., 1988. Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus*) in captivity. Aquaculture 69, 159-184.

DiLauro M.N., Krise W.F., Hendrix M.A. & Baker S.E., 1994. Short-Term cold storage of Atlantic Sturgeon Sperm. Prog. Fish-Cult. 56, 143-144.

Downing N., 1980. Maintenance of turbot broodstock. The production of turbot eggs and larvae, 1979-1980. White Fish Authority. Field Report n° 1, 893 pp.

Dreanno C., Suquet M., Quemener L., Cosson J., Fierville F., Normant Y. & Billard R., 1997. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. Theriogenology 48, 589-603.

- Dreanno C., Suquet M., Desbruyères E., Cosson J., Le Delliou H. & Billard R., 1998. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture 169, 247-262.
- Drokin S.I., 1993. Phospholipid distribution and fatty acid composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in sperm of some freshwater and marine species of fish. Aquatic Living Resources 6, 49-56.
- Erdahl D.A., 1986. Preservation of spermatozoa and ova from freshwater fish. Ph.D. Thesis, University of Minnesota, USA.
- Erdahl A.W., Erdahl D.A. & Graham E.F., 1984. Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa. Aquaculture 43, 341-350.
- Erdhal A.W. & Graham E.F., 1987. Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a plasma-mimicking medium. Aquaculture 60, 311-321.
- Fauvel C., Omnes M.H., Suquet M. & Normant Y., 1992. Enhancement of the reproduction of turbot (*Scophthalmus maximus*), larvae by controlling over-ripening in mature females. Aquaculture and Fisheries Management 23, 209-216.
- Fauvel C., Omnes M.H., Mugnier C., Normant Y., Dorange G. & Suquet M., 1993 a. La reproduction du turbot (*Scophthalmus maximus*): aspects biologiques et gestion des reproducteurs. Pisciculture Francaise 112, 23-39.
- Fauvel C., Omnes M.H., Suquet M. & Normant Y., 1993 b. Reliable assessment of overripening in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a simple pH measurement. Aquaculture 117, 107-113.
- Fauvel C., Suquet M., Dreanno C., Zonno V. & Menu B., 1998 a. Cryopreservation of seabass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production-simulating conditions. Aquatic Living Resources 11(6), 387-394.
- Fauvel C., Zonno V., Suquet M., Storelli C. & Dreanno C., 1998 b. Cryopreservation of seabass (*Dicentrarchus labrax*) sperm in both experimental and production conditions. En: 8th International Symposium on Fish Physiology, Uppsala, 64 p.
- Fernández-Pato C., Martínez Tapia I. & Chereguini O., 1990. Larval rearing of turbot (*Scophthalmus maximus*): effect of density of living food. ICES C.M./F:24.
- Fernández-Pato C., Martínez Tapia I., Chereguini O. & Sola E., 1990. Growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L) from 1 to 3,000 g in the North of Spain. ICES C.M./F:29.
- Fischer, W., Schneider M. & Bauchot M.-L. (eds.), 1987. Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. (Révision 1). Méditerranée et mer Noire.

Zone de Pêche 37. Vol. II. Vertébrés. Food and Agriculture Organization and Commission des Communautés Européennes. Rome, FAO, 2, 761-1530.

Flüchter J., 1972. Induction of spawning in the turbot (*Rombus maximus* L.) by injection of hypophyseal suspensions. Aquaculture 1, 285-287.

Forés, R., Iglesias J., Olmedo M., Sanchez F. J. & Peleteiro J. B., 1988. Induction of spawning in turbot *Scophthalmus maximus* L., by photoperiod control. ICES, C.M./F:7.

Forés, R., Iglesias J., Olmedo M., Sanchez F. J. & Peleteiro J. B., 1991. Induction of spawning in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a sudden change in photoperiod. Aquacult. Eng. 9, 357-366.

García de la Banda I., Chereguini O. & Rasines I., 1992. Improvement of turbot larval development by lactic bacterial addition. ICES C.M./F:8.

Gatesoupe F.J., 1982. Nutritional and antibacterial treatments of live food organism: the influence on survival, growth rate and weaning success of turbot (*Scophthalmus maximus*). Ann. Zootech. 31, 353-368.

Gatesoupe F.J., 1986. Evolution des teneurs en acides amines libres dans les larves de bar et de turbot. Ichtyophysiologica Acta n° 10, Lyon, 253-265.

Gatesoupe F.J., 1989. Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae *Scophthalmus maximus* L. En: Aquaculture, a biotechnology in progress. Pauw N., Jaspers E., Ackefors H. & Wilkins N. (Eds). European Aquaculture Society, Bredene, Belgium. Vol. 2, 721-730.

Gatesoupe F.J., 1990. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. Aquaculture 89, 139-148

Geffen A. J. & Frayer O., 1993. Retention of sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus* L.: the effects of time from activation, thermal shock and adenosine triphosphate levels. Aquac. Fish. Manag. 24, 203-209.

Ginzburg A.S., 1972. Fertilization in fishes and the problem of polysperm. Keter Press, Israel, 366 pp.

Girin M., 1972. Metamorphose en élevage de deux larves de turbot (*Scophthalmus maximus* L.). C. R. Acad. Sc. Paris, 275.

Girin M., 1974. Régime alimentaire et pourcentage de survie chez la larve de turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Colloque sur l'aquaculture. Brest, Oct.1973. Actes de colloques n°1.

- Girin M., 1979. Méthodes de production des juvéniles chez trois poissons marins: le bar (*Dicentrarchus labrax*), la sole (*Solea solea*), et le turbot (*Scophthalmus maximus*). Public. C. N. E. X.O. Rapports Scientifiques Techniques, n° 39.
- Girin M. & Devauchelle N., 1978. Shift in the reproduction period of salt-water fish using shortened photoperiod and temperature cycles. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18 (4), 1059-1065.
- Goodall J.A., Blackshaw A.W. & Capra M.F., 1989. Factors affecting the activation and duration of motility of the spermatozoa of the summer whiting (*Sillago ciliata*). *Aquaculture* 77, 243-250.
- Graybill J.R. 1968. Cryo-preservation of viable fish sperm. Thesis Oregon State University, Corvallis, Oregon 92.
- Graybill J.R. & Horton H.F., 1969. Limited fertilization of steelhead trout eggs with cryopreserved sperm. *Journal Fisheries Research Board of Canada* 26, 1400-1404.
- Gwo J.C., 1994. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa (Teleost, Pesciformes, Sparidae). *Theriogenology* 41, 989-1004.
- Gwo J.C., 2000. Cryopreservation of sperm of some Marine Fishes. En: Cryopreservation in Aquatic Species. Advances in World Aquaculture 7, Tiersch T.R. & Mazik P.M. (Eds. ), World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 138-160.
- Gwo J.C., Strewn K., Longnecker M.T. & Arnold C.R., 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture* 94, 355-375.
- Harvey B., 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture* 32, 313-320.
- Harvey B. & Ashwood- Smith M.J., 1982. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. *Cryobiology* 20, 29-40.
- Harvey B. & Kelley R.N., 1984. Short-term storage of *Sarotherodon mossambicus* ova. *Aquaculture* 37, 391-395.
- Hay D.E., 1986. Effects of delayed spawning on viability of eggs and larvae of Pacific herring. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115, 155-161.
- Hirose K., Machida Y. & Donaldson E.M., 1979. Induced ovulation of Japanese flounder (*Limanda yokohama*) with HCG and salmon gonadotropin, with special references to changes in the quality of eggs retained in the ovarian cavity after ovulation. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45, 31-36.

- Hodgins H.O. & Ridgeway G.J., 1964. Recovery of viable salmon spermatozoa after fast-freezing. *Progressive Fish Culture* 26, 95.
- Holmefjord I., 1991. Timing of stripping relative to spawning rhythms of individual females of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). En: Proc. Larvi'91, Lavens P., Sorgeloos P., Jaspers E. & Ollevier F. (Eds.). Eur. Aquac. Soc. Vol. 15, 203-204.
- Horton H.F., Graybill J.R. & Wu A.S.H., 1967. Cryogenic preservation of viable fish sperm. Contract Completion Report Department of Fisheries and Wildlife, Oregon State University, Corvallis, Oregon, 93.
- Horton H.F. & Ott A.G., 1976. Cryopreservation of fish spermatozoa and ova. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 33, 995-100
- Howell B.R. 1973. The effect of unicellular algae on the growth of early larvae of the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). ICES, C.M./E:21.
- Howell B.R. 1979. Experiments on the rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture* 18, 215-225.
- Howell B.R. & Scott A.P., 1989. Ovulation cycles and post-ovulatory deterioration of eggs of the turbot, *Scophthalmus maximus* L. En: The Early Life History of Fish. Blaxter J. H. S., Gamble J. C. & H-Von Westernhagen (Eds.) The Third ICES Symposium. Beregen, Norway. Vol. 191, 21-26.
- Hoyle R.J. & Idler D.R., 1968. Preliminary results in the fertilization of eggs frozen sperm of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal Fisheries Research Board of Canada* 25, 1295-1297.
- Hsu S.Y. & Goetz F.W., 1993. Inhibition of chorion expansion and preservation of fertility in goldfish (*Carassius auratus*) eggs by protease inhibitors. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 932-935.
- Iglesias J., Rodríguez- Ojea G., Calcedo E., 1993 a. Influencia del tamaño de rotífero en la primera alimentación de larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) European Aquaculture Society. Special Publication nº 19, 389 pp.
- Iglesias J., Rodríguez- Ojea G., Alvarez-Blazquez B., Gomez C., 1993 b. Definición del punto del no retorno en larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) sometidas a un proceso de inanición a tres temperaturas (13,15 y 18° C). European Aquaculture Society. Special Publication nº 19, 390 pp.
- Iglesias J. & Rodríguez- Ojea G., 1994. Fitness of hatchery-reared turbot, *Scophthalmus maximus* L., for survival in the sea: first year results on feeding, growth and distribution. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25 Supplement 1, 179-188.

- Imsland A. K., Folkvord A., Grung G. L., Stefansson S. O. & Taranger G. L., 1997 a. Sexual dimorphism in growth and maturation of turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque, 1810). Aquaculture Research 28, 101-114.
- Imsland, A., Folkvord A., Jonsdottir O. & Stefansson S., 1997 b. Effects of exposure to extended photoperiods during the first winter on long-term growth and age at first maturity in turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 159, 125-141.
- Jensen J.O.T. & Alderdice D.F., 1984 Effect of temperature on short-term storage of eggs and sperm of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Aquaculture 37, 251-265.
- Jones A., 1970. Some aspects of the biology of the turbot (*Scophthalmus maximus* L.) with special reference to feeding and growth in the juvenile stage. PhD Thesis, University of East Anglia, U.K., 145 pp.
- Jones A., 1972 a. Studies on egg development and larval rearing of turbot *Scophthalmus maximus* L. and brill, *Scophthalmus rhombus* L. in the laboratory. J. Mar. Bio. Ass. U.K., 52, 965-986.
- Jones A., 1972 b. Marine fish farming: an examination of the factors to be considered in the choice of species. M.A.F.F. Laboratory Leaflet (New Series), nº 24.
- Jones A., 1973. Observations of the growth of turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L., reared in the laboratory. Aquaculture 2, 149-155.
- Jones A., 1974. Sexual maturity, fecundity and growth of the turbot, *Scophthalmus maximus* L. J. Mar. Bio. Ass. U.K. 54, 109-125.
- Jones, A., Alderson R. & Howell B.R., 1974. Progress towards the development of a successful rearing technique for larvae of the turbot, *Scophthalmus maximus* L. En J.H.S. Blaxter (Ed.) The early life history of fish. Springer-Verlag, New York, 731-737.
- Kerby J.H., 1983. Cryogenic preservation of sperm from striped bass. Transactions of the American Fisheries Society 112, 86-94.
- Kerby J.H., Bayles J.D.V. & Hadell R.D., 1985. Growth, survival and harvest of striped bass produced with cryopreserved spermatozoa. Transactions of the American Fisheries Society 114, 761-765.
- Kingwell S.J., Duggan M.C. & Dye J.E., 1977. Large scale handling of the larvae of the marine flatfish turbot, *Scophthalmus maximus* L. and Dover sole, *Solea solea* L. with a view to their subsequent fattening under farming conditions. Actes de Colloques du CNEXO 4: 27-34.
- Kjorsvik E.K. & Lonning S., 1983. Effects of egg quality on normal fertilization and early development of the cod, *Gadus morhua* L. J. Fish Biol. 23, 1-12.

- Kjorsvik E., Mangor-Jensen A. & Holmefjord I., 1990. Egg quality in fishes. En: Advances in Marine Biology, Academic Press Vol. 26, 71-113.
- Klar G.T., Parker N.C. & Goudie C.A., 1988. Comparison of growth among families of channel catfish. Progressive Fish Culturist 50, 173-178.
- Koldras M. & Mejza T., 1983. Effects of quantity and quality of carp sperm on egg fertilization sucess. Acta Ichthyologica et Piscatoria 13 (2), 83-92.
- Kuhlmann, D., Quantz G. & Witt U., 1981. Rearing of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) on cultured food organisms and postmetamorphosis growth on natural and artificial food. Aquaculture 23, 183-196.
- Kuhlmann D., Quantz G., Witt U. & Kattner G., 1982. Survival on growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) reared on different food organisms with special regard to long-chain polyunsaturated fatty acis. ICES C.M./ F:6.
- Lahnsteiner F., 2000. Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. Aquaculture Research 31, 245-258.
- Lahnsteiner F., Weismann T. & Patzner R.A., 1995. Composition of the ovarian fluid in 4 salmonid species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta* f. *lacustris*, *Salvelinus alpinus* and *Hucho hucho*. Reprod. Nutr. Dev. 35, 465-474.
- Lahnsteiner F., Weissmann T. & Parner R.A., 1997 a. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 mL and 5 mL straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. Aquaculture Research 28, 471-479.
- Lahnsteiner F., Weismann T. & Patzner R.A., 1997 b. Structure and function of the ovarian cavity and oviduct and composition of the ovarian fluid in the bleak, *Alburnus alburnus* (Teleostei, Cyprinidae), Tissue Cell 29, 305-314.
- Lahnsteiner F., Weissmann T. & Parner R.A., 1998. An efficient method for cryopreservation of testicular sperm from the Northern pike, *Esox lucius* L. Aquaculture Research 29, 341-347.
- Lee C.S., Tamaru C.S., Kelley C.D., Moriwake A. & Miyamoto G.T., 1992. The effect of salinity on the induction of spawning and fertilization in the striped mullet, *Mugil cephalus*. Aquaculture 102, 289-296.
- Legendre M. & Billard R., 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. Reproduction, Nutrition, Développment 20, 1859-1868.
- Legendre M., Linhart O. & Billard R., 1996. Spawning and manegement of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. Aquatic Living Resources 9, 59-80.



- Leung L.K.P. & Jamieson B.G.M., 1991. Live preservation of fish gametes. En: Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa, Jamieson B.G.M. (Ed.), Cambridge University Press, 252-254.
- Lim H.K., Kho K.H. & Chang Y.J., 1997. Effect of diluents on the short-term storage of sperm in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. J. Korean Fish. Soc. 30, 211-215.
- Linhart O., Kudo S., Billard R., Slechta V. & Mikodina E.V., 1995 a. Morphology, composition and fertilization of carp eggs: a review. Aquaculture 129, 75-93.
- Linhart O. & Billard R., 1995 b. Survival of ovulated oocytes of the European catfish (*Silurus glanis*) after in vivo and in vitro storage or exposure to saline solutions and urine. Aquatic Living Resources 8, 317-322
- Linhart O., Kouril J. & Hamackova J., 1987. Increased rate of egg fertilization in artificial propagation of sheatfish (*Silurus glanis* L.) by means of suppressing the movements of spermatozoa with inmobilization solution. Aquaculture 65, 353-358.
- Linhart O., Proteau J.P., Redondo C. & Billard R., 1991. Preservation of gametes in european catfish (*Silurus glanis* L.) En: 4<sup>th</sup> International Symposium Reproductive Physiology of fish, Scott A.P (Ed.). Norwich, 283.
- Lovelock J.E. & Bishop M.W.H., 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dymethyl sulfoxide. Nature 183, 1394-1395.
- Lubzens E. Daube N., Pekarsky I., Magnus Y., Cohen A., Yusefovich F. & Feigin P., 1997. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks strategies in research and application. Aquaculture 155, 13-30.
- Magary I., Urbanyi B. & Horvath L., 1996. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization. Journal of Applied Ichthyology 12, 117-119.
- Maisse G., 1996. Cryopreservation of fish semen: a review. En: Proceedings of the Commision C2, Refrigeration and Aquaculture, International Symposium "Froid et Aquaculture", Bordeaux, International Institute of refrigeration (Ed.), Paris, 443-466.
- Marcel J., Billard R. & Matei D., 1982. Conservation des gamètes de truites arc-en-ciel et fario en conditions in vitro et post mortem. Bull. Fr. Piscic. 284, 155-161.
- Martínez- Tapia C. & Fernández -Pato C., 1991 a. Effect of temperature in early growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) from 0.1 to 500g. ICES C.M./ F: 19.
- Martínez- Tapia C. & Fernández -Pato C., 1991 b. Influence of stock density on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) growth. ICES C.M./ F:20.

- McAndrew B.J., Rana K.J. & Penmam D.J., 1993. Conservation and preservation of genetic variation in Aquatic organisms. En: Recent Advances in Aquaculture IV. Muir J.F. & Roberts R.J. (Eds.). Institute of Aquaculture. Blackwell scientific publications, 295-336.
- McEvoy L. A., 1984. Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in cultivated turbot, *Scophthalmus maximus* L.. J. Fish Biol. 24, 437-448.
- McEvoy L. A., 1985. Double ovalatory cycles in some captive turbot (*Scophthalmus maximus*). J. Fish. Biol. 26, 63-66.
- McEvoy L. A., 1989. Reproduction of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in captivity. Cuadernos da Area de Ciencias Mariñas, Seminario de Estudios Galegos 3, 9-28.
- McEvoy L.A. & McEvoy J., 1992. Multiple spawning in several commercial fish specie and its consequences for fisheries management, cultivation and experimentation.. J. Fish Biol. 41 (Suppl. B), 125-136.
- Moczarski M., 1977. Deep freezing of carp *Cyprinus carpio* L. sperm. Bulletin de l' Academie Polonaise des Sciences. Serie des Sciences Biologiques 25, 187-190.
- Morley R.B. & Withler F.C., 1969. Observations on sockeye and pink salmon ova and milt relative to spawn collection. J. Fish. Res. Bd Can. 111, 1-11.
- Mounib M.S., 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility 53, 13-18.
- Mounib M.S., Hwang P.C. & Idler D.R., 1968. Cryogenic preservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm. Journal Fisheries Research Board of Canada 25, 2623-2632.
- Nicholas J.L., Robic E. & Ansquec D., 1989. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. Aquaculture 83, 237 -248.
- Nomura M., 1964. Studies on reproduction of rainbow trout *Salmo gairdneri*, with special reference to egg taking. VI. The activities of spermatozoa in different diluents, and preservation of semen. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 30, 723-733.
- Nursall J.R. & Hasler A.D., 1952. The viability of gametes and the fertilization of eggs by minute quantities of sperm. Prog. Fish. Cult. 14, 165-168.
- Ogier de Baulny B., 1997. Cryoconservation du sperme de poissons, évaluation des dommages cellulaires, amélioration de la technique de congélation, perméabilité membraire aux cryoprotecteurs. Thesis. École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, 129 pp.

- Ohta H. & Izawa T., 1996. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture* 142, 107-118.
- Omnes M.H., Normant Y., Suquet M., & Fauvel C., 1991. Analysis of turbot (*Scophthalmus maximus*) broodstock pilot scale production. En: *Aquaculture and the Environment*, De Pauw N. & Joyce J. (Ed.). European Aquaculture Society, Special Publication 14, 245.
- Omnes M.H., Temey Y., Daniel J.Y. & Nicolas J.L., 1993. Bacterial environment of gametes and eggs of turbot (*Scophthalmus maximus*), En: *World Aquaculture'93*, Eur. Aquat. Soc., Spec. Publ. 19, 423 p.
- Olmedo M., 1995. Contribución al desarrollo del cultivo intensivo de larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus Linnaeus, 1758*) (Pisces, Pleuronectiformes) en Galicia. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España. 142 pp.
- Olmedo M., Álvarez-Blázquez B. & Gómez C., 1995. Effect of rotifer (*Brachionus plicatilis*) density on the first-feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *ICES mar. Sci. Symp.* 201, 202.
- Ott A.G. & Horton H.F., 1971. Fertilization of steelhead trout (*Salmo salar*) eggs with cryo-preserved sperm. *Journal Fisheries Research Board of Canada* 28, 1915-1918.
- Palmer P.J., Blackshaw A.W. & Garrett R.N., 1993. Successful fertility experiments with cryopreserved spermatozoa of barramundi *Lates calcarifer* (Bloch) using dimethylsulfoxide and glycerol as cryoprotectants. *Reproduction and Fertility Development* 5, 285-293.
- Palmer P.J., Hogan A.E. & Barlow C.G., 1994. Chilled storage of pikey bream (*Acanthopagrus berda*) sperm and activation in different salinities. *Asian Fish. Sci.* 7, 35-40.
- Peleteiro J.B., 2001. Control de la reproducción del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) en cautividad. Tesis doctoral. Universidad de Compostela. España. 161 pp.
- Peleteiro J.B., Rodríguez-Ojea G. & Iglesias J., 1995. Individual spawning control in different turbot (*Scophthalmus maximus* L.) broodstocks under artificial and natural photoperiod. International Council for the Exploration of Sea Marine Science Symposium 201, 202-203.
- Peleteiro J.B., Chereguini O. & Cal R.M., 1996. Preliminary results of artificial fertilization carried out with cryopreserved sperm of turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758). *Informe Técnico del Instituto Español de Oceanografía* 162, 1-13.
- Perez Benavente G. & Gatesoupe F. J., 1988. Bacteria associated with cultured rotifers and Artemia are detrimental to larval turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Engineering* 7, 289-293.

- Person Le Ruyet J., Alexandre J.C., Le Roux A. & Nedelec G., 1978. La generation 1977 de turbot (*Scophthalmus maximus*) au centre oceanlogique de Bretagne CNEXO-France. Cons. Int. pour L'Expl. de la Mer. C.M./G:55.
- Person-Le Ruyet, J., L'Elchat D. & Nedelec G., 1981. Research on rearing turbot (*Scophthalmus maximus*): results and perspectives. J. World Maricult. Soc. 12, 143-152.
- Person-Le Ruyet, J., Menu B., Cadena Roa M. & Matailler R., 1983. Use of expanded pellets supplemented with attractive chemical substances for the weaning of turbot (*Scophthalmus maximus*). J. World Maricul. Soc. 14, 676-678.
- Person Le Ruyet J. 1989. The hatchery rearing of turbot larvae (*Scophthalmus maximus*). Cuadernos de Area de Ciencias Mariñas, Seminario de Estudios Galegos 3, 57-91.
- Plouidy M.G. & Billard R., 1982. The chemical composition of the companion fluids of the gametes in the common carp (*Cyprinus carpio*). En: Reproductive Physiology of Fish. Richter C.J.J. & Goos H.J.Th. (Eds.), PUDOC, Wageningen, 134 p.
- Polge C., Smith A.U. & Parks A.S., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164, 666.
- Pullin R.S.V. 1972. The storage of plaice (*Pleuronectes platessa*) sperm at low temperatures. Aquaculture 1, 279-283.
- Purdom C.E., Jones A. & Linconl R.F., 1972. Cultivation trials with turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 1, 213-230.
- Quantz G. 1985. Effect of temperature and prey density on feeding of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae under laboratory conditions. International Council for the Exploration of the Sea C.M./ F:51.
- Quantz G. 1989. Larvae feeding. Cuadernos da Area de Ciencias Mariñas, Seminario de Estudos Galegos 3, 37-55.
- Rana K., 1995 a. Preservation of gametes. En: Broodstock management and egg and larval quality, Bromage N.R. & Roberts R.J. (Eds.), Blackwell Science Ltd Cambridge, 53-93.
- Rana K., 1995 b. Cryopreservation of aquatic gametes and embryos: recent advances and applications. En: Proceeding of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of fish, Goetz F.W., Thomas P. (Eds.), Austin USA, 85-89.
- Rana K. & McAndrew J., 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. Aquaculture 76, 333-345.

- Rana K.J., Muiruri R.M., McAndrew B.J. & Gilmour A., 1990. The influence of diluents, equilibration time and pre-freezing storage time on the viability of cryopreserved *Orechromis niloticus* (L.) spermatozoa. *Aquaculture & Fisheries Management* 21, 25-30.
- Richardson G.F., C.E. Wilson, L.W. Crim & Yao Z., 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. *Aquaculture* 174, 89-94.
- Robin J.H. 1989. The quality of livings preys for fish larval culture: preliminary results on mineral supplementation. En: *Aquaculture, a biotechnology in progress*. Pauw N., Jaspers E., Ackefors H. & Wilkins N. (Eds). European Aquaculture Society, Bredene, Belgium. Vol. 2, 769-774.
- Ronnestad I., Fyhn H.J. & Gravningen K., 1992. The importance of free aminoacids to the energy metabolism of eggs and larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Biol.* 114, 517-525.
- Rosenberg D.L., 1983. Fertilization success of coho salmon under various atmospheric conditions, temperature acclimatation, and temperature variations. *Prog. Fish. Cult.* 45, 84-87.
- Rostand J., 1946. Glycerine et resisttance du sperme aux basses températures. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances. Academie des Sciences, Paris* 222, 1524 -1525.
- Rothbard S., Rubinshtein I. & Gelman E., 1996. Storage of common carp, *Cyprinus carpio* L., eggs for short durations. *Aquaculture Research* 27, 175-181.
- Saad A., 1992. Preservation of male reproductive cells and the artificial fertilization of the white bass (*Dicentrarchus labrax*). *Bulletin of the Marine Biology Research Centre, Tajura* 9, 56-68.
- Saad A., Billard R., Theron M.C. & Hollebecq M.G., 1988. Short-Term Preservation of Carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture* 71, 133-150.
- Saitoh S., 1996. Cryopreservation of flatfish sperm. *Science Report Hokkaido Fisheries Experimental Station*. 48, 9-17.
- Sánchez F.J., Peleteiro J.B., Forés R., Olmedo M. & Iglesias J. 1990 . Crecimiento del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L) en condiciones experimentales de cultivo. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 6 (1), 127-132.
- Sánchez-Rodríguez M., 1975. Contribution à l'étude de l'insemination artificielle de la truite (*Salmo gairdneri*): les possibilités de manipulation des gamètes et de conservation du sperme, DEA Physiology Reproduction, University of Paris VI.



- Satterfield J.R. & Flickinger S., 1995. Factors Influencing storage potencial of preserved walleye semen. *Prog. Fish-Cult.* 57, 175-181.
- Scott A.P. & Baynes S.M., 1979. The effect of unicellular algae on the survival and growth of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). En: *Finnish Nutrition and Fishfeed Technology. Proceedings of a World Symposium, Hamburg, 20-23 June 1978.*, Halver J.E & Tiews K. (Eds), Berlin. Vol. 1, 423-433.
- Scott A.P. & Middleton C., 1979. Unicellular algae as food for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. The importance of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture* 18, 227-240.
- Scott J. & Baynes S.M., 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology* 17, 707-739.
- Sneed K.E. & Clemens H.P., 1956. Survival of fish sperm after freezing and storage at low temperatures. *Progressive Fish Culture* 18, 99-103.
- Stoss J., 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. En: *Fish Physiology*, Hoar W.S., Randall D.J. & Donaldson E.M. (Eds.), Academic Press, Inc, London, 305-360.
- Stoss J., Büyükhatioglu S. & Holtz W., 1978. Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. *Annales de Biologie animale Biochimie et Biophysique* 18, 1077-1082.
- Stoss J. & Holtz W., 1981. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. 1. Effect of thawing solutions, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture* 22, 97-104.
- Stoss J. & Reftsie T., 1983. Short term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture* 30, 229-236.
- Stottrup J.G. & Attramadal Y., 1992. The influence of different rotifer and Artemia enrichment diets on growth, survival and pigmentation in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) Larvae. *J. World Aquacult. Soc.* 23, 307-316.
- Stottrup J.G. & Gravningen K., 1993. The role of different microalgae on the growth and survival of turbot larvae in intensive cultivation system. *ICES Mass rearing Symposium, Bergen, n° 28.*
- Sunitha M.S. & Jayaprakas V., 1997. Influence pf pH, temperature, salinity and media on activation of motility and short term preservation of spermatozoa of an estuarine fish *Mystus gulio* (Hamilton)(Siluridae-Pisces). *Indian J. Mar. Sci.* 26, 361-365.

- Suquet M., Omnes M.H., Normant Y. & Fauvel C., 1992 a. Influence of photoperiod, frequency of stripping and presence of females on sperm output in turbot. *Aquaculture and Fisheries Management* 23, 217-225.
- Suquet M., Omnes M.H., Normant Y., & Fauvel C., 1992 b. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 101, 177-185.
- Suquet M., Dorange G., Omnes M.H., Normant Y., Le Roux A. & Fauvel C., 1993. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Fish Biology* 42, 509-516.
- Suquet M., Billard R., Cosson J., Dorange G., Chauvaud L., Mugnier C. & Fauvel C., 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine species. *Aquatic Living Resources* 7, 283-294.
- 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., Gaignon J.L., Quemener L. & Normant Y., 1995. Artificial insemination of turbot (*Scophthalmus maximus*), eggs: a procedure for experimental purposes, En: Proc. Larvi'95, Eur. Aquac. Soc., Spec. Publ. 24, 57 p.
- Suquet M., Petton B., Normant Y., Dosdat A. & Gaignon J.L., 1996. First rearing attempts of pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquat. Living Resour.* 9, 103-106.
- Suquet M., Dreanno C., Dorange G., Normant Y., Quéméner L., Gaignon J.L. & Billard R., 1998 a. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility, and concentration, intracellular ATP content, fertilization and storage capacities. *Journal of Fish Biology* 52, 31-41.
- Suquet M., Dreanno C., Petton B., Normant Y., Omnes M.H. & Billard R., 1998. Long-term effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. *Aquatic Living Resources* 11, 45-48.
- Suquet M., Dreanno C., Fauvel C., Cosson J. & Billard R., 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research* 31, 231-243.
- Tabata K., & Mizuta A., 1997. Cryopreservation of sex reversed gynogenetic female sperm in Hirame. *Fisheries Science* 63(3), 482-483.
- Tiersch T.R., Goudie C.A. & Carmichael G.J., 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: Storage in cryoprotectants, fertilization trials and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Transactions of the American Fisheries Society* 123, 580-586.

- Trippel E.A. & Neilson J.D., 1992. Fertility and sperm quality of virgin and repeat-spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*) and associated hatching success. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 2118-2127.
- Truscott B. & Idler D.R., 1969. An improved extender for freezing Atlantic salmon spermatozoa. *Journal Fisheries Research Board of Canada* 26, 3254-3258.
- Van der Bank F.H. & Steyn G.J., 1992. The effect of cryopreservation and various cryodiluents on the allozyme variation of glucose phosphate isomerase in the F<sub>1</sub> progeny of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 103B, 641-643.
- Van der Meeren, T., 1991. Selective feeding and prediction of food consumption in turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) reared on the rotifer *Brachionus plicatilis* and natural zooplankton. *Aquaculture* 93, 35-55.
- Van der Walt L.D., Van der Bank F.H. & Steyn G.J., 1993. The suitability of using cryopreservation of spermatozoa for the conservation of genetic diversity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 106A (2), 313-318.
- Wayman W.R., Tiersch T.R. & Thomas R.G., 1998. Refrigerated storage and cryopreservation of sperm of red drum, *Sciaenops ocellatus* L. *Aquaculture Research* 29, 267-273.
- Witt U., Quantz G., Kuhlmann D. & Kattner G., 1984. Survival and growth of turbot larvae *Scophthalmus maximus* L. reared on different food organisms with special regards to long-chain polyunsaturated fatty acids. *Aquacultural Engineering* 3, 177-190.
- Yao Z., Crim L.W., Richardson G.F. & Emerson C.J., 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture* 181, 361-375.
- Zar J.H., 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, IncEnglewood Cliffs, NJ.
- Zheltonozhko O., Cherepanov V.V. & Petrenko A., 1997. Cryopreservation and banking of salmon fish sperm on Kamchatka peninsula. *Crio'97* 146. Barcelona.
- Zlabek A. & Linhart O., 1987. Short-term storage of noninseminated and unfertilized eggs of the common carp, grass carp and silver carp. *Bul. Vyzk. Ustav Ryb. Hydrobiol., Vodnany* 23, 3-11.
- Zolotnitskii A.P., 1980. Some data on the gonadotrophic activity of the hypophysis in the Black Sea turbot (*Scophthalmus maeoticus*) in connection with storage times. *J. Ichthyol.* 20 (5), 160-162.