



Nuevas especies para la acuicultura de la UE

Manuales técnicos – Cherna (*Polyprion americanus*)



Líder de especie: Álvarez-Blázquez, Blanca, (Instituto Español de Oceanografía, Vigo, España)

Otros científicos participantes: Mylonas, Constantinos C., Papandroulakis, Nikos, Papadakis, Ioannis (Centro Helénico de Investigación Marina, HCMR, Grecia), Linares, Fátima (Centro de Investigaciones Mariñas, Consellería do Mar, Xunta de Galicia, España), Rodríguez Villanueva, J.L. (Instituto Galego de Formación en Acuicultura, Consellería do Mar, Xunta de Galicia, España) Vilar, Antonio (Aquarium A Coruña, Museos Coruñeses, España), Pérez, Montse (IEO), Fauvel, Christian (IFRÉMER, Francia), Duncan, Neil (IRTA, España), Covadonga Rodríguez (Universidad de La Laguna, España), Robles, Rocío (CTAQUA, España).





Contenidos

Introducción	3
Reproducción y genética	4
<i>Adquisición de ejemplares salvajes y establecimiento de un grupo de reproductores en cautividad</i>	4
<i>Descripción del ciclo reproductivo en cautividad</i>	6
<i>Procedimientos para el desove espontáneo e inducido</i>	9
<i>Características del esperma y criopreservación</i>	14
Nutrición	16
<i>Eficacia del alimento vivo e influencia de los enriquecedores</i>	16
<i>Influencia de la alimentación de los reproductores en la fecundidad y la calidad de las puestas</i>	18
Cultivo larvario	22
<i>Desarrollo del aparato digestivo en la cherna</i>	22
<i>Condiciones óptimas para el cultivo larvario</i>	26
Referencias	34



Introducción

La cherna es una de las especies más grandes de la familia Serranidae, alcanzando un tamaño de 100 kg. Es un pez de aguas profundas que se distribuye por casi todo el mundo y se caracteriza por una prolongada fase pelágica juvenil (Sedberry et al., 1999; Ball et al., 2000; Deudero et al., 2000). La cherna es una de las nuevas especies para acuicultura más interesantes, gracias a su rápido crecimiento (Suquet & La Pomélie, 2002; Rodríguez-Villanueva et al., 2011), a una madurez reproductiva tardía (Sedberry et al., 1999), al alto precio de mercado y a las capturas limitadas – las cotas de captura se redujeron un 90 % en 2012 en EE.UU. (NOOA, www.fishwatch.com)- y a la facilidad de manejo en cautividad (Papandroulakis et al., 2008) Rodríguez-Villanueva et al., 2011). Su gran tamaño lo hace apropiado para el procesado y el desarrollo de productos con valor añadido, y su distribución cosmopolita podría facilitar las exportaciones desde la UE.



La cherna se adapta fácilmente a la cautividad y a pesar de su gran tamaño, no se ha informado de mortalidades debido a la manipulación. Acepta el alimento inerte con facilidad y es un carnívoro voraz. En un estudio realizado con individuos capturados en el medio natural se observó que los peces crecían de 1 kg a 5 kg en un período de 10 meses (Rodríguez-Villanueva et al., 2011). La lenta maduración reproductiva de la cherna, que en cautividad tiene lugar a una edad entre 5 y 10 años, puede ser un problema para la obtención y gestión de los reproductores. Por el contrario, su prolongada fase juvenil es una gran ventaja desde el punto de vista de la acuicultura, ya que permite la comercialización antes de la madurez sexual, y por tanto evitar problemas ligados a la maduración tales como la reducción del crecimiento o la pérdida de calidad de la carne y de las propiedades organolépticas. Se ha demostrado que el crecimiento está intensamente determinado por el sexo y que las hembras de cherna son significativamente más grandes que los machos, tal y como se ha observado en muchas otras especies (Rodríguez, J.L.2017).

La cherna es una especie no tropical, distribuida globalmente, que habita las costas continentales y las islas oceánicas a profundidades de 100-1.000 m (Roberts, 1989), formando tres poblaciones genéticamente diferenciadas, en el Atlántico norte y el mar Mediterráneo, en Brasil y en el Pacífico sur (Ball et al., 2000). Se trata de una especie gonocórica sin dimorfismo sexual, que desova en el talud continental a profundidades entre 300 y 500 m, formando agrupaciones para desovar (Peres & Klippel, 2003). El establecimiento de métodos para el control del desove y la producción de huevos de buena calidad es esencial para la producción de cualquier especie animal. La descripción del ciclo reproductivo, aunque no permite la identificación del periodo de desove y las preferencias para desovar de cada especie (temperatura y fotoperiodo), permite reconocer posibles disfunciones reproductivas y el desarrollo de protocolos para la inducción al desove y la producción de huevos viables (Mylonas et al., 2013).

La ausencia de control de la reproducción y de protocolos consolidados para el cultivo larvario ha sido el mayor cuello de botella que han impedido hasta el momento la acuicultura de la cherna. Se ha logrado con relativo éxito la recolección de huevos de reproductores en cautividad mediante inducción hormonal (Papandroulakis et al., 2008) y mediante presión abdominal en peces madurados de forma natural (Peleteiro et al., 2011). Se han descrito el desarrollo embrionario y las primeras fases de vida (Papandroulakis et al., 2008; Peleteiro et al., 2011), y



ambos indican que el gran tamaño de los huevos de esta especie (~2 mm de diámetro) puede ofrecer notables ventajas para el cultivo larvario. Recientemente se ha logrado en Nueva Zelanda la reproducción y el desarrollo larvario de un pariente muy cercano, el hapuku (*Polyprion oxygeneios*) (Anderson et al., 2012; Symonds et al., 2014; Wylie et al., 2018a; Wylie et al., 2018b). La escasez de reproductores es una desventaja para esta especie, pero su claro potencial biológico y económico justificó la asignación de parte de los recursos de DIVERSIFY a reunir a casi todos los socios implicados actualmente en la domesticación de la cherna en Europa, para superar sus bien documentados cuellos de botella –es decir, la reproducción y el cultivo larvario- con el fin de producir el número necesario de juveniles para iniciar la producción comercial.

En este manual técnico proporcionamos toda la información obtenida durante los 5 años del proyecto DIVERSIFY relativo a la adquisición de nuevos reproductores, la gestión de reproductores y el control de la reproducción, la nutrición y el cultivo larvario. Esta información está dirigida a organizaciones empresariales y de investigación que estén interesadas en investigar el potencial de la cherna para la acuicultura. Debido a que el trabajo sobre la cherna todavía está en marcha, todavía no se han evaluado en detalle todos los datos, y por tanto no se presentan todos aquí. Sin embargo, estarán disponibles próximamente en el sitio web del proyecto (www.diversifyfish.eu).

Reproducción y genética

Adquisición de ejemplares salvajes y establecimiento de un grupo de reproductores en cautividad

Fátima Linares, Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA), Consellería do Mar, Xunta de Galicia, España. **José Luis Rodríguez Villanueva**, Instituto Galego de Formación en Acuicultura (IGAFa). Consellería do Mar, Xunta de Galicia, España. **Antonio Vilar**, Aquarium Finisterrae Museos Coruñeses A Coruña, España.

La cherna es un pez de aguas profundas distribuido por todo el mundo. Los individuos demersales habitan fondos rocosos y fangosos, a profundidades entre 40 y 200 m; sin embargo, con frecuencia se encuentran individuos a profundidades mayores de 300 m, y la profundidad máxima registrada es de 1.000 m (Fischer et al., 1987). La primera parte de su vida (desde la eclosión hasta un tamaño corporal sobre 60 cm) es pelágica y los juveniles viven asociados a residuos flotantes cerca de la costa. En Galicia, las ciudades de Vigo y A Coruña son los dos puertos más importantes para la venta de cherna (**Fig. 1**). Las ventas han disminuido de 60,5 t (2007) a 10 t (2017) en A Coruña y de 102 t (2007) a 10 t (2017) en Vigo. El precio en los últimos 10 años ha variado entre los 13 y los 22 €/kg (**Fig. 2**). La mayoría de las capturas proceden de la pesquería de las Azores.

Hay dos métodos principales de captura: mediante red (similar al cerco) que rodea los objetos flotantes y los juveniles (<3 kg) y mediante línea para los adultos (>3 kg) (**Fig. 3**). La época de pesca de la cherna es entre abril y julio.

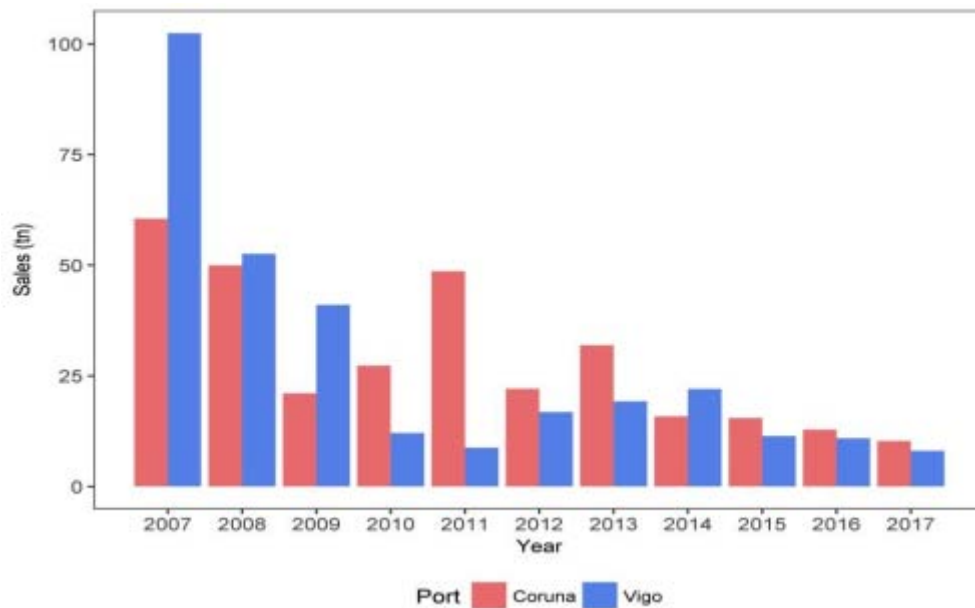


Figura 1. Evolución de las ventas de cherna en los puertos de Galicia (2007-2017). A Coruña (rojo) y Vigo (azul).

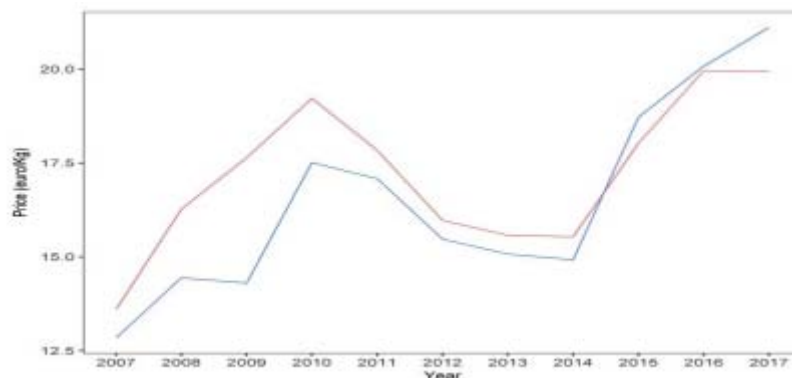


Figura 2. Evolución de los precios de la cherna en Galicia (2007-2017).

La disminución de las capturas de cherna en Galicia dificulta la obtención de individuos para incrementar los stocks de reproductores en cautividad. Se capturó un pequeño número de peces en la costa atlántica (NO de España) que se mantuvieron en cuarentena. Previamente a los muestreos, los animales fueron anestesiados y se midieron la longitud, el perímetro y el peso. Se tomó también una muestra de la aleta para análisis genético. La captura de adultos (>3 kg) resulta difícil ya que la subida a la superficie debe realizarse muy lentamente para evitar problemas de descompresión que pueden causar la muerte del pez.

La muerte en los peces se debe principalmente al barotrauma, una sobreexpansión del gas de la vejiga natatoria. Cuando el pez se sube demasiado rápido a la superficie, el gas se expande y ocasiona la ruptura de la pared de la vejiga natatoria, causando una hemorragia y el colapso de los órganos internos que provoca la muerte del pez a las pocas horas. Por tanto, el pez debe



subirse lentamente para dar tiempo a evacuar el gas expandido. Tan pronto como el pez cae en el anzuelo, la línea debe subirse lentamente. Una vez que el pez está en la superficie, debe evitarse izarlo fuera del agua mediante la línea. Es aconsejable recoger el pez del agua mediante una red no abrasiva. El pez debe ser transferido a un tanque con agua y anestésico. Una vez los individuos están sedados, se puede proceder a la extracción del anzuelo. A continuación se transfiere el pez a un tanque nuevo con oxígeno y agua limpia. Al llegar al puerto, los peces se transfieren a un camión equipado con un tanque con oxígeno. Después de esto, los individuos se trasladan a las instalaciones y se mantienen en cuarentena.

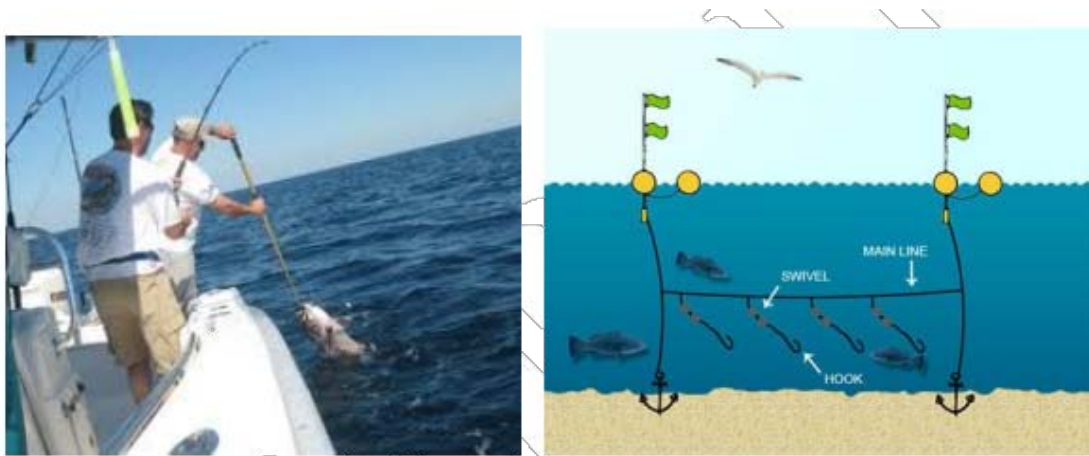


Figura 3. Pesca con anzuelo (izquierda) y con línea de profundidad (derecha).

Descripción del ciclo reproductivo en cautividad

Constantinos C. Mylonas, Centro Helénico de Investigación Marina, Grecia.

Cuatro lotes diferentes con números variables de reproductores (capturados del medio natural como juveniles) se establecieron en instalaciones de investigación en Grecia y España: el Centro Helénico de Investigación Marina (HCMR, n=3) en Heraklion, Creta y en 3 instalaciones en España: Instituto Español de Oceanografía (IEO, n=13) en Vigo; Aquarium Finisterrae (MC2, n=21) en A Coruña; and Consellería do Medio Rural e Mariño (CMRM, n=11) en Pontevedra. Con la excepción del lote del HCMR que se mantuvo a una temperatura del agua constante (15-16 °C) durante todo el año, los otros tres grupos se mantuvieron en condiciones de temperatura relativamente similares, entre 12 y 18 °C. Se examinó el estado de desarrollo reproductivo de los peces entre marzo de 2015 y octubre de 2016, comprendiendo dos épocas de desove (2015 y 2016) y una época reproductiva completa. Las muestras se llevaron a cabo mensualmente entre febrero y junio y bimensualmente de julio a enero.

La vitelogenénesis en la cherna es un proceso largo y comienza en octubre (**Fig. 4**), muchos meses antes de que pueda lograrse los primeros desoves. Durante la época prevista de puesta, de maduración ovocitaria temprana o vitelogénica, el diámetro de los ovocitos alcanza un máximo entre 1.200 y 1.600 μm . Los machos pueden encontrarse en condiciones de producir esperma durante todo el año, como se observó en los cuatro emplazamientos (**Fig. 5**).

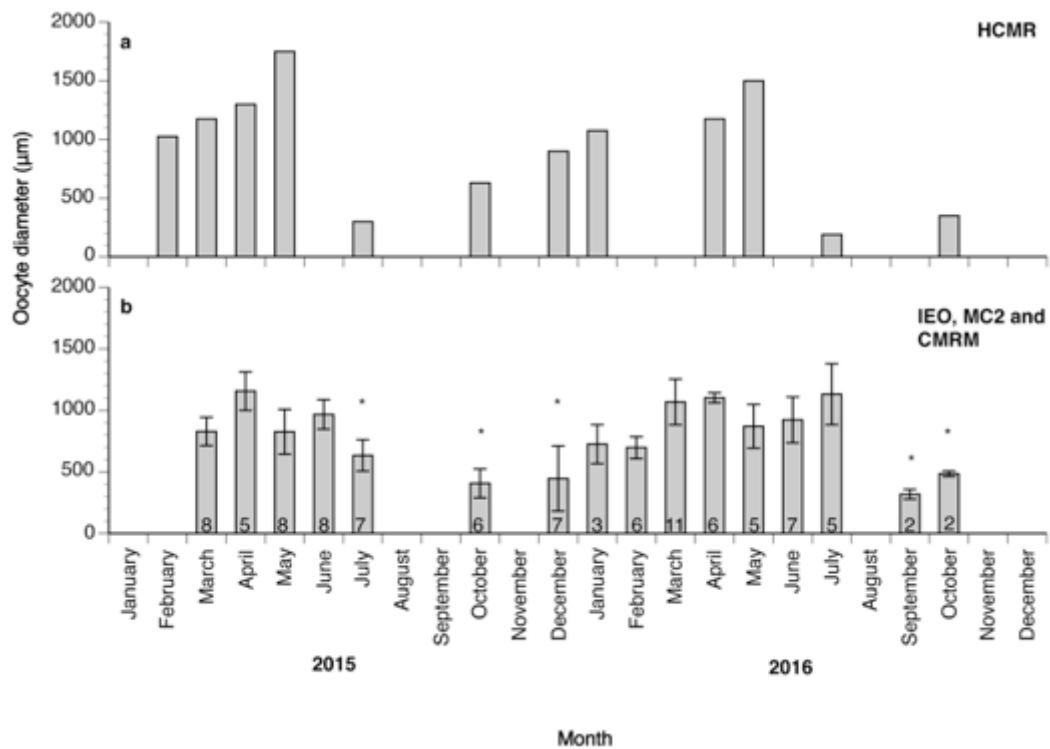


Figura 4. Diámetro (media \pm d.e.) de los ovocitos de las chernas (*Polyprion americanus*) del HCMR (a) y de los tres lotes de reproductores en España (b) durante los ciclos reproductivos anuales de 2015 y 2016. Los números en el interior de las barras indican el número de hembras biopsiadas en cada mes. Los asteriscos (*) indican valores significativamente más bajos que los máximos observados (abril 2015).

El porcentaje de motilidad del esperma mostró valores altos y poco variables durante los dos años de estudio (60-90 %). La duración de la motilidad del esperma fue de entre 2 y 6 minutos, y fue más prolongada que la de muchas de las especies comunes de la acuicultura mediterránea. La densidad espermática mostró valores elevados durante todo el año ($4-18 \times 10^9$ espermatozoides ml^{-1}), y la supervivencia de los espermatozoides a 4°C varió entre 3 y 14 días. Los desoves espontáneos se lograron a finales de la primavera en todos los años monitorizados, pero el éxito de la fertilización fue generalmente bajo y variable (Fig. 6).

Los resultados de DIVERSIFY ponen de manifiesto que las hembras de cherna pueden adaptarse a la cautividad, madurar y producir huevos tanto bajo temperaturas naturales fluctuantes como bajo temperaturas bajas constantes. Las hormonas sexuales esteroideas en el plasma de las hembras se correlacionan bien con los estadios de maduración (datos no mostrados). Sin embargo, en algunas hembras el desarrollo de los ovocitos cesa en el estadio de alvéolo cortical y éstos no crecen más de $350 \mu\text{m}$, o dejan de hacerlo en la fase de vitelogénesis y no alcanzan la maduración.

Por otra parte, los machos producen esperma de buena calidad y en buena cantidad, capaz de fecundar los ovocitos producidos. Además, los machos pueden producir esperma a lo largo de todo el año, estando disponible para los acuicultores para proceder a la fecundación artificial en cualquier momento. Los niveles de hormonas sexuales esteroideas en los machos aumentan cuando éstos están espermiando, lo que sugiere que excepto para la $17,20\beta\text{-P}$, los niveles de



hormonas se correlacionan correctamente con los estadios de maduración (datos no mostrados). Una disfunción reproductiva que puede atribuirse a las chernas macho es el bajo porcentaje de fecundación observado en gran número de desoves espontáneos. En algunos casos, aunque las hembras ponen una gran cantidad de huevos, éstos no son fecundados, un fenómeno que puede ser atribuido a un fallo en el comportamiento del cortejo por parte del macho.

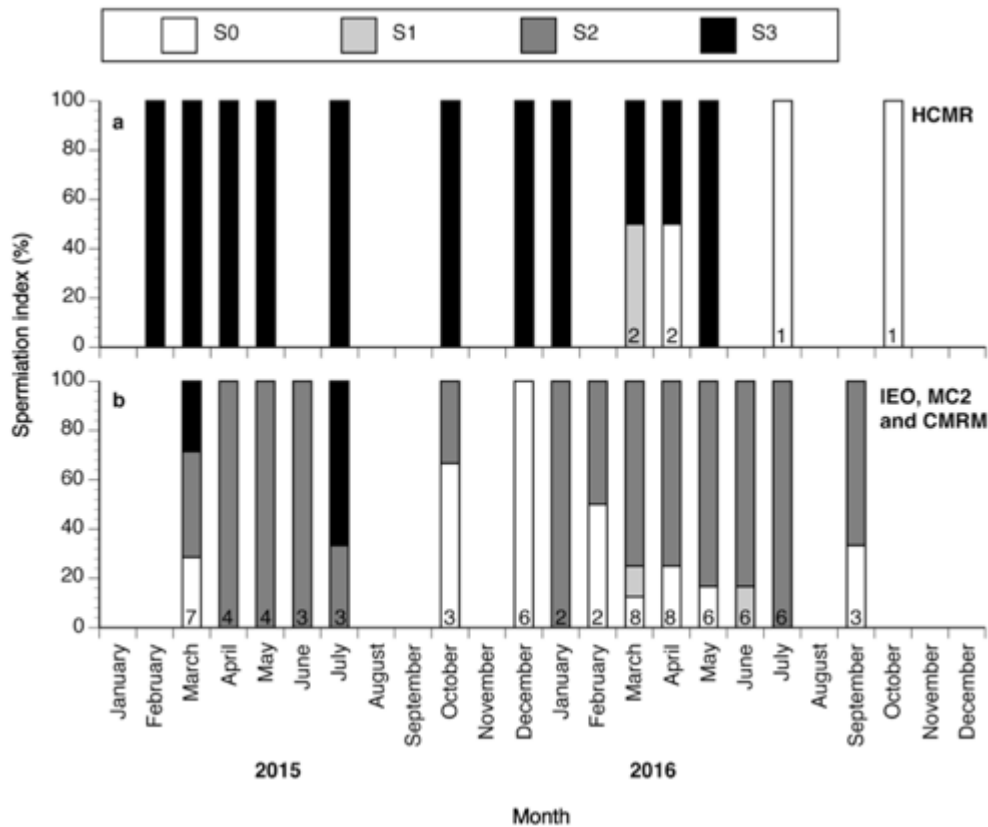


Figura 5. Porcentaje de chernas macho en diferentes fases de espermiación en función del mes en el HCMR (a) y en los tres lotes de reproductores en España (b), desde febrero de 2015 hasta octubre de 2016. El índice de espermiación se determinó según una escala subjetiva, con S0 = sin liberación de esperma; S1 = solo una gota de esperma liberada después de múltiples intentos de presión abdominal; S2 = esperma liberado fácilmente después del primer intento de presión abdominal y S3 = esperma liberado de forma abundante incluso sin necesidad de presión abdominal. Los números en el interior de las barras indican el número de machos examinados cada mes.

En el último año de proyecto, se han obtenido mejores resultados en términos de desoves espontáneos y la producción de huevos fertilizables, lo que dio lugar a un mayor número de larvas viables. En una ocasión, dos machos fertilizaron 40 desoves, con un porcentaje de fecundación entre el 80 % y el 100 %. Los resultados están siendo evaluados y no se han incluido en este manual, pero estarán disponibles próximamente en la página web del proyecto.

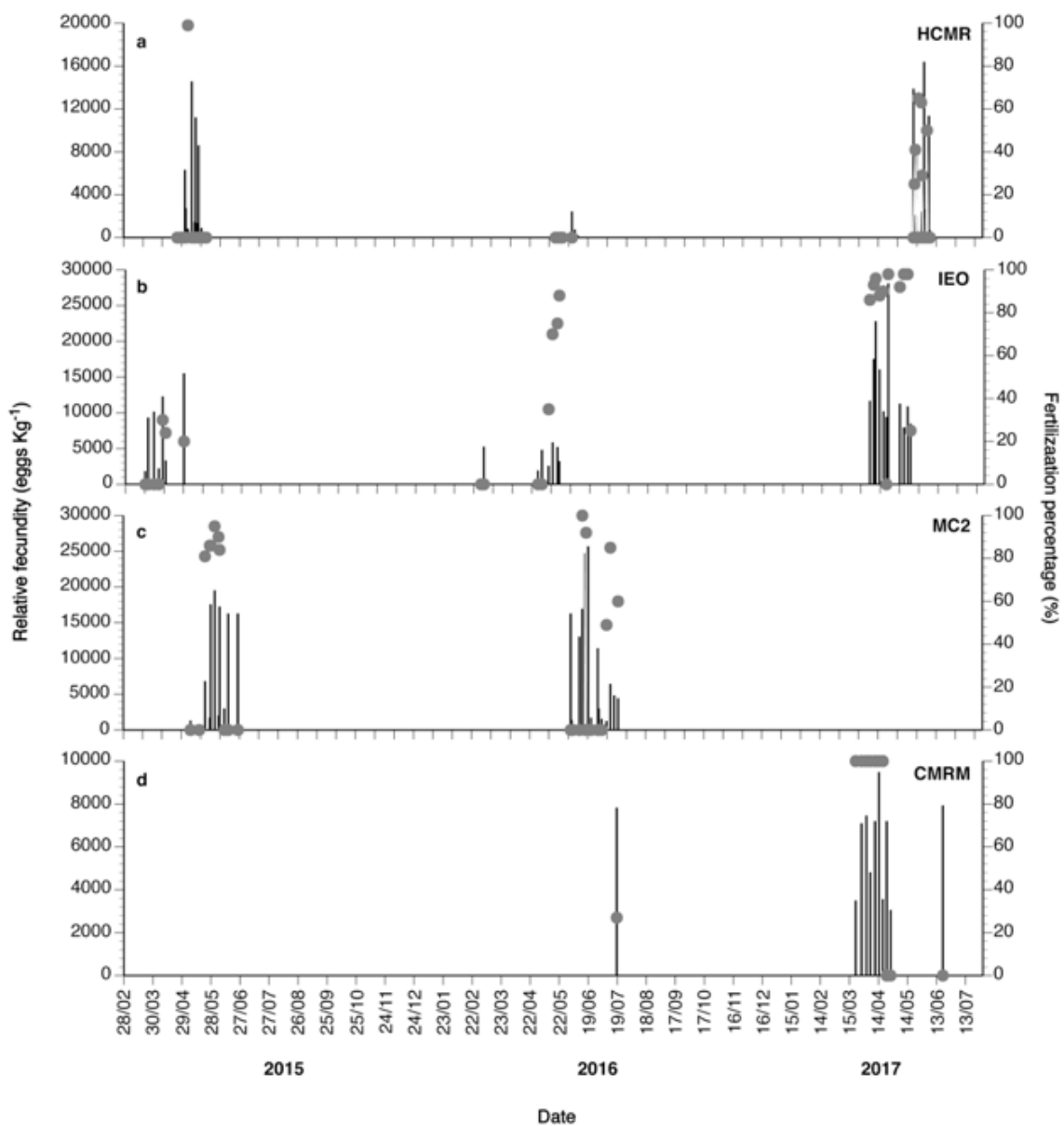


Figura 6. Fecundidad relativa y fertilización (%) medias de los desoves espontáneos de los reproductores de cherna obtenidas en el HCMR (a), IEO (b) MC2 (c) y CMRM (d) durante 2015, 2016 and 2017.

Procedimientos para el desove espontáneo e inducido

Blanca Álvarez-Blázquez, Instituto Español de Oceanografía, Vigo, España.

Durante los años 2014 a 2018, los cuatro lotes de cherna en sus respectivas instalaciones: MCA, IGAFa AND IEO (**Fig. 7**) fueron observados para analizar los aspectos reproductivos, de cultivo larvario y nutrición, con el objetivo de determinar las mejores condiciones para que esta especie se convierta en candidata para la acuicultura europea.



Fig 7. Diferentes lotes de reproductores de cherna en las cuatro instalaciones, de izquierda a derecha: wreckfish broodstock at the fourth facilities: HCMR (Creta). MC2 (A Coruña), IGAFa (Illa de Arousa) e IEO (Vigo).

Los peces se mantuvieron en una variedad de condiciones ambientales en cuanto a tamaño de tanque, régimen fototérmico, incluyendo tanques en interior y en exterior bajo condiciones ambientales naturales, y tanques en interior con condiciones fototérmicas simuladas o temperatura constante. Esta especie exhibe una alta tasa de crecimiento y fácil adaptación a ambientes de cautividad, así como tolerancia al manejo. Durante la época reproductiva (de marzo a julio) se observaron bajas tasas de alimentación, mientras que durante el otoño la tasa de alimentación fue más alta (**Fig. 8**). La tasa de ingestión varió entre el 0,2 y el 0,5 % para los peces alimentados con dieta semihúmeda, y entre el 1 y el 1,8 % para los alimentados con pienso seco.

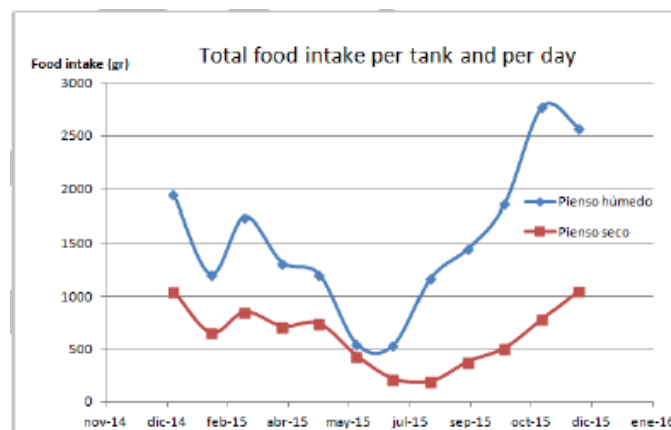


Figura 8. Ingestión de alimento total por tanque y día durante un año en los dos stocks de cherna del IEO.

Por otra parte, se analizó la composición bioquímica de los huevos y las gónadas de las hembras con el fin de desarrollar una dieta apropiada para los reproductores de esta especie. La mayoría de los resultados figuran en la sección Nutrición de este manual (ver más adelante). Se encontraron algunas diferencias entre el contenido de carotenoides y vitaminas de las gónadas de hembras salvajes maduras y el de los huevos obtenidos en distintas condiciones de estabulación y alimentación. Estos datos se están evaluando y se publicarán próximamente en la página web del proyecto DIVERSIFY.



Existen tres procedimientos para obtener desoves de cherna en cautividad (**Fig. 9**):

1. Desoves naturales y espontáneos en tanques grandes (>40 m³), recogiendo los huevos a medida que salen por el desagüe del tanque (**Fig. 9a**)
2. Inducción del desove mediante hormonas exógenas (GnRH α) (**Fig. 9b**). Este método puede llevarse a cabo en tanques grandes (>40 m³) en condiciones fototérmicas controladas, permitiendo que los peces desoven espontáneamente.
3. Inducción del desove seguida de presión abdominal de las hembras y machos maduros mantenidos en tanques pequeños, y fecundación *in vitro* (**Fig. 9c**).

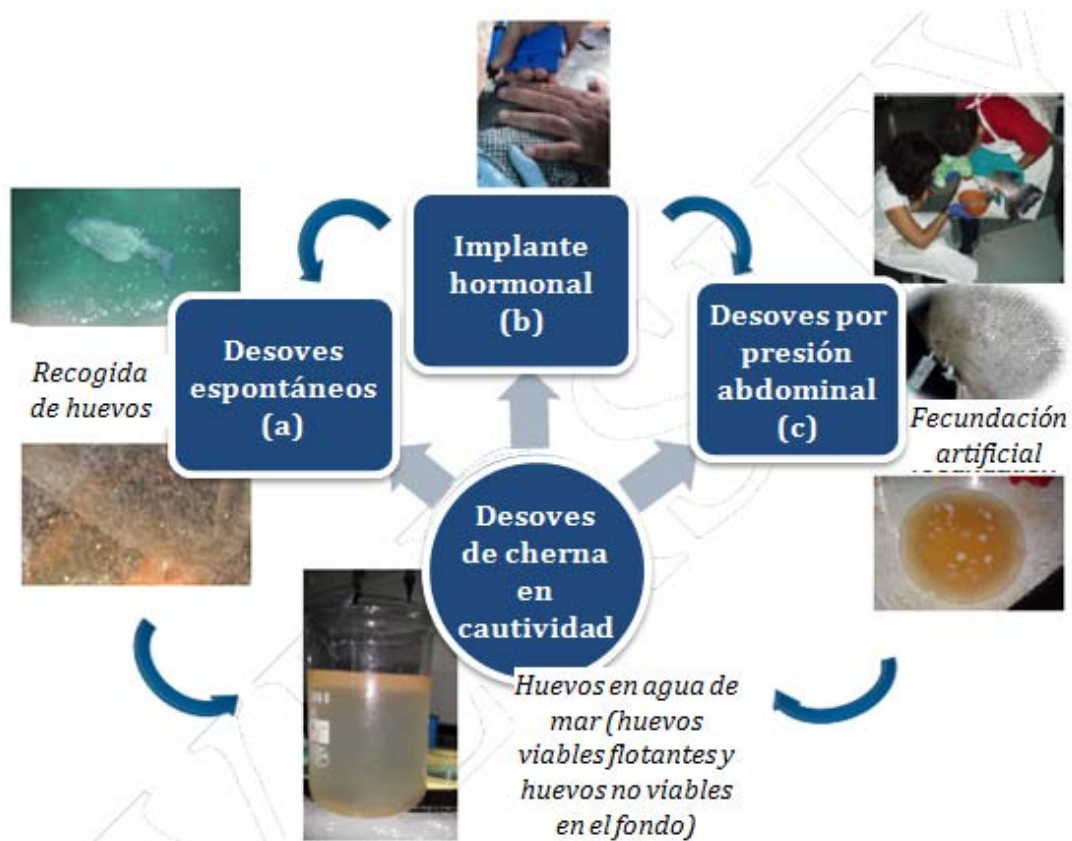


Figura 9. Distintos procedimientos para obtener puestas de cherna en cautividad.

Las hembras experimentan la vitelogénesis y la maduración de los ovocitos de forma espontánea en cautividad, y tuvieron puestas naturales sobre todo en los grupos mantenidos en España, con mayor regularidad y tasas de fecundación a medida que el proyecto progresaba y aumentaba la experiencia en el manejo de los peces (**Fig. 10**)

En estos últimos años, el número de puestas espontáneas se ha incrementado, y se ha reducido el número de puestas inducidas. La razón es probablemente una mejor adaptación de las hembras a condiciones de cautividad y la promoción del ciclo natural de maduración, lo que da lugar no solamente a la vitelogénesis, sino también a la maduración espontánea de los ovocitos (**Fig. 11**).

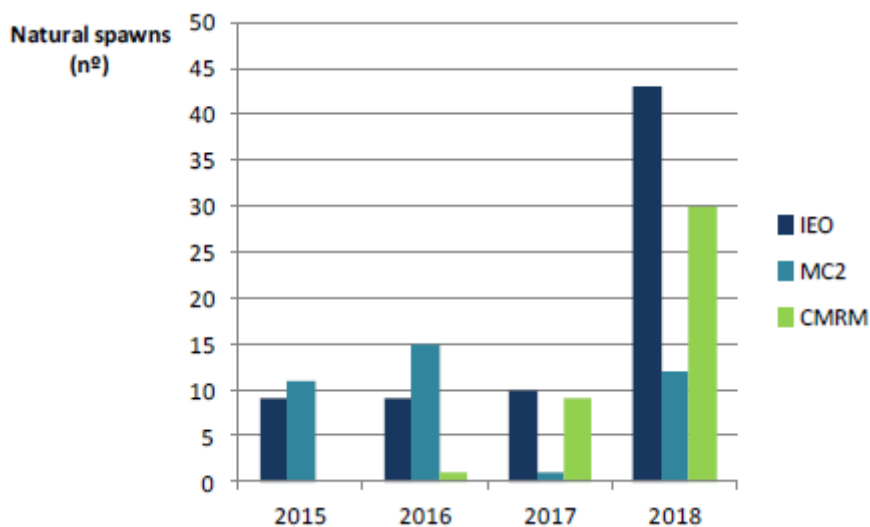


Figura 10. Puestas naturales totales de los tres grupos de reproductores en Galicia (IEO, MC2 y CMRM) entre 2015 y 2018.

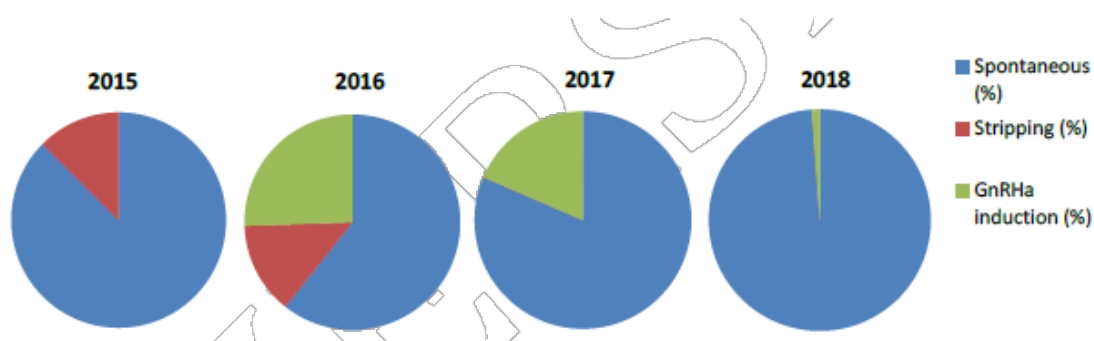


Figura 11. Porcentaje (%) de puestas espontáneas, inducidas mediante presión abdominal e inducidas mediante GnRH_a (análogo de la hormona liberadora de gonadotropina) de los lotes de reproductores de cherna de Galicia en los últimos 3 años.

El comportamiento natural de puesta se caracteriza por la persecución de las hembras por parte de los machos, y la liberación de los gametos a continuación. La puesta tiene lugar durante la noche o muy temprano por la mañana. En 2017 y 2018, las puestas espontáneas en el IEO, el MC2 y en la CMRM dieron lugar a un gran número de huevos fecundados y una alta tasa de fecundación. La frecuencia de puesta fue de 3-5 días en todos los lotes y la hora de la puesta fue principalmente entre las 05:00 y las 08:00 h, con alguna excepción de puestas al mediodía. La tasa de fecundación se situó entre el 50 % y el 100 %, siendo la calidad de los huevos mejor hacia la mitad o el final de la época de puesta de cada hembra. Se observó que una hembra es capaz de desovar unas diez veces por cada época de puesta.



Con respecto a los machos, la maduración sexual tiene lugar en la misma época que la de las hembras, alcanzando su pico en los meses de abril a junio, con concentraciones máximas de $25-35 \times 10^9$ espermatozoides/ml. La motilidad de los espermatozoides es alta, con valores medios de 2-3 minutos, y supervivencia media a 4 °C de 4 días. Sin embargo, en algunos casos los espermatozoides pueden llegar a los 18 días de supervivencia tras la recogida. En las instalaciones del IEO, se comprobó que un macho puede fecundar al menos 30 puestas en un período de 150 días.

Se han registrado las características de los huevos y la embriogénesis de la cherna. Los huevos presentan un diámetro grande ($1.996 \pm 0,034$ mm) y contienen una gran gota lipídica. La eclosión tiene lugar después de cinco días de incubación a una temperatura del agua de $16 \pm 0,8$ °C (**Fig. 12**). Los experimentos de incubación se describen en la sección de cultivo larvario.

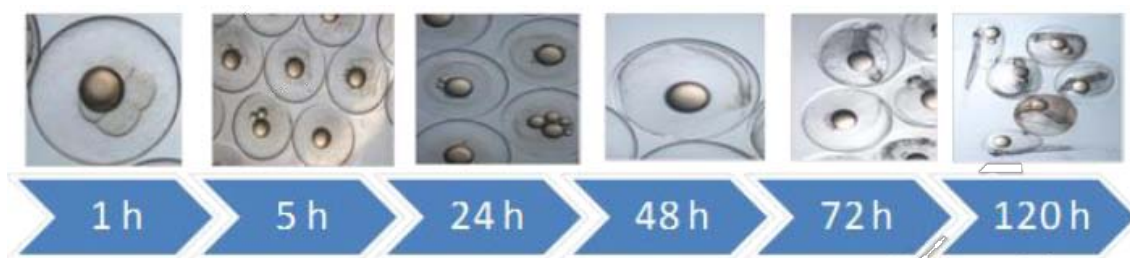


Figura 12. Desarrollo embrionario de la cherna a $16 \pm 0,8$ °C.

Durante los experimentos de inducción hormonal, se implantaron 500 µg de GnRH α a las hembras de tres de los cuatro lotes. La respuesta de las hembras a los implantes de GnRH α varió, desde la ausencia de respuesta en 2015, puestas espontáneas o inducidas mediante presión con huevos no viables en 2016, hasta los buenos resultados en fecundación pero no en eclosión en 2017. Solamente hubo una puesta que permitió el cultivo larvario con éxito hasta los 25 post-eclosión en 2016.

La necesidad de más información en este aspecto hizo necesario utilizar más hembras. Así, se utilizó el lote de la empresa Isidro de la Cal (España), y se trabajó con dos de sus hembras en el marco de un acuerdo realizado para este propósito. Los experimentos se llevaron a cabo durante los meses de junio y julio de 2017. Como resultado, se obtuvo más información sobre el tiempo de ovulación tras la inducción con GnRH α (**Fig. 13**). Los resultados sugieren que el tamaño de ovocito apropiado para la implantación de la GnRH α es >1.200 µm, pero podría ser mejor si los ovocitos superan los 1.300-1.400 µm. Además, se observó que las inyecciones de GnRH α son más efectivas que los implantes, y generan una respuesta más rápida. Uno de los riesgos es la formación de tapones gonadales, si la dosis de hormona no es adecuada. Los resultados muestran un periodo de respuesta de unos seis días tras la inyección de hormonas.

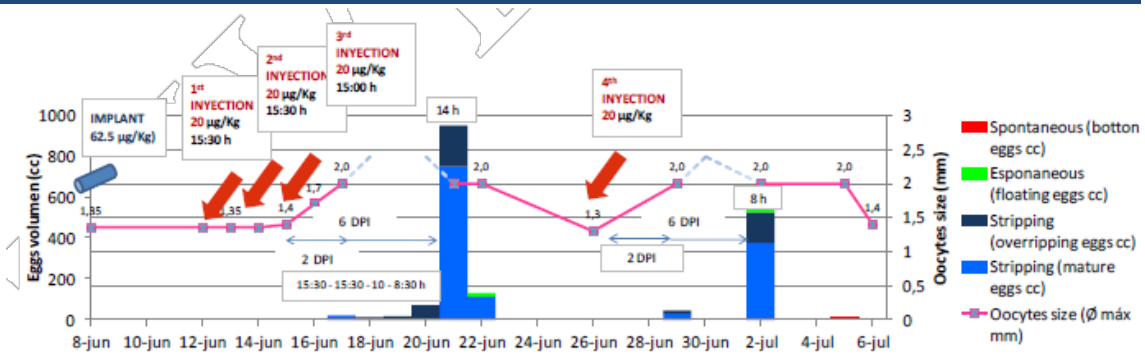


Figura 13. Experimentos de inducción a la puesta con una hembra de la empresa Isidro de la Cal (España).

En 2018 se realizó otro experimento con una hembra de MC2 inducida mediante un implante con una dosis mayor de GnRH α , con buenos resultados en cuanto a tamaño de puesta tras 6 días de inducción. Estos mismos resultados se habían alcanzado el año anterior mediante inyecciones en las instalaciones de Isidro de la Cal.

Por otra parte, los métodos de inducción de la maduración y la puesta mediante hormonas gonadotrópicas (FSH y LH de Rara Avis, España) han demostrado ser bastante eficientes para estimular el desarrollo ovocitario completo en algunos individuos de cherna en los que esto no ocurre de forma natural en cautividad. Los resultados de este trabajo muestran que el uso de FSH y LH estimula el desarrollo gonadal, pero es necesario llevar a cabo pruebas con un mayor número de individuos y diferentes dosis de hormonas.

En cuanto al método de inducción de la puesta mediante presión abdominal en la cherna, éste es factible en hembras maduras que presentan dificultades para desovar espontáneamente tras la inducción con GnRH α , pero no en hembras que desarrollan la maduración ovocitaria de forma natural (sin hormonas exógenas). Esto se debe a que los individuos adultos son pesados y el estrés causado por la presión abdominal puede dar lugar a problemas con la calidad de los huevos y el éxito de la fertilización.

Características del esperma y criopreservación

Christian Fauvel, IFRÉMER, Francia.

En DIVERSIFY se estableció un Análisis de Esperma Asistido por Ordenador (CASA) para la evaluación de la calidad del esperma de la cherna. El método está disponible en forma de un vídeo que describe el procedimiento de activación del esperma y el análisis CASA en la página web del proyecto (www.diversifyfish.eu). Se determinaron los parámetros del CASA que mejor se adaptaban al análisis del esperma de la cherna, para optimizar la capacidad del análisis para evaluar el potencial de fertilidad del esperma en el transcurso de futuros experimentos de desove. Los análisis demostraron que el esperma de las chernas en cautividad comparte patrones de motilidad tanto con peces marinos como de agua dulce, basados en una activación general de



todos los espermatozoides en el momento de la eyaculación en un ambiente activador; a continuación se produce un descenso de la motilidad hasta su cese total en un breve intervalo, entre 30 segundos a algo más de 20 minutos debido al agotamiento de las reservas energéticas, que no se recuperan debido a la escasa respiración.

La concentración media de espermatozoides en el semen de la cherna fue $2,41 \times 10^{10}$ (sd: $0,4 \times 10^{10}$, n=9) por ml en Galicia en el mes de enero, mientras que de abril a septiembre en Creta, Grecia la concentración permaneció en valores alrededor de 1×10^{10} , sin diferencias significativas entre muestreos. En 2015, la concentración alcanzó valores superiores de hasta 2×10^{10} . La desviación estándar fue muy alta entre las distintas localizaciones y entre los distintos machos, y no es posible concluir que hubiese diferencias significativas en la concentración de espermatozoides entre las chernas de Galicia y las de Creta. Estas concentraciones no difieren de valores previos (entre $1,5$ y $2,71 \times 10^{10}$ espermatozoides/ml) de los reproductores del HCMR. Finalmente, la concentración en el esperma extraído mediante presión abdominal fue del mismo orden de magnitud que en especies pelágicas como la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la dorada (*Sparus aurata*) o la corvina (*Argyrosomus regius*) y fue mayor que en el lenguado (*Solea solea*) y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*).

El esperma fresco mostró un elevado porcentaje de motilidad inicial en el momento de la activación, y una disminución regular a lo largo del tiempo durante 5 minutos. La velocidad inicial media a lo largo de una trayectoria lineal fue de unos $230 \mu\text{m/s}$, descendiendo progresivamente a 0 tras 5 minutos (**Fig. 14**). Esto fue corroborado por la disminución de la linearidad de las trayectorias calculadas mediante la relación entre la velocidad media y la velocidad en línea recta (**Fig. 14**).

Las chernas macho produjeron un gran volumen de esperma fácilmente extraíble con una concentración considerada como media para peces marinos, y desde luego muy superior a la de los peces planos. Además de estas características generales, la puesta en marcha de un protocolo de CASA adaptado al esperma de la cherna demostró que éste presenta un alto porcentaje de espermatozoides móviles en el momento de activación y una de las velocidades iniciales más altas registradas en esperma de peces. Esta velocidad tan alta está asociada a una gran duración del movimiento en comparación con otras especies de peces marinos. Esta larga duración mostró una trayectoria de doble forma. La primera trayectoria es recta (ligada a la búsqueda de ovocitos), pero a continuación la trayectoria comienza a curvarse, lo que se interpreta como una fase de búsqueda del micropilo en la superficie del huevo. Además, los resultados obtenidos por el CASA están en línea con las observaciones de campo realizadas al microscopio, y las complementan con datos objetivos que pueden ser analizados estadísticamente con mayor facilidad.

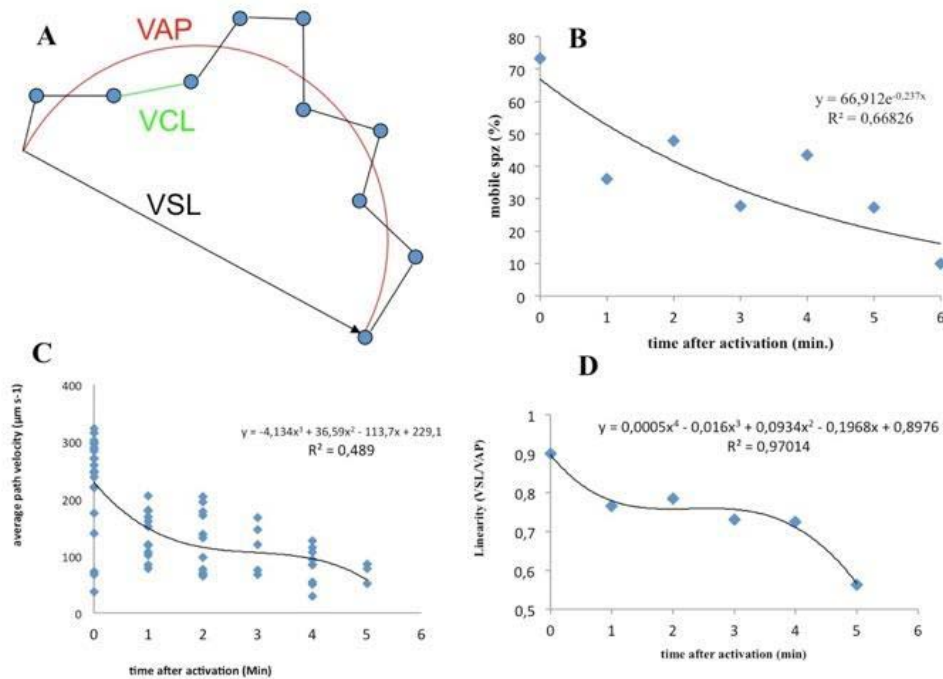


Figura 14. Parámetros de motilidad de los espermatozoides de cherna. A) representación esquemática del movimiento de un espermatozoide ilustrando los tres parámetros de velocidad generados por CASA; B) variaciones del porcentaje de espermatozoides móviles a lo largo del tiempo; C) descenso de la velocidad de desplazamiento a lo largo del tiempo tras la activación; D) descenso de la linealidad de las trayectorias de los espermatozoides tras la activación.

Nutrición

Eficacia del alimento vivo e influencia de los enriquecedores

Fátima Linares, Centro de Investigaciones Mariñas, Consellería do Mar, Xunta de Galicia, España.

Los resultados de los análisis bioquímicos realizados en la CMRM de las gónadas de chernas hembra salvajes, y huevos y larvas obtenidos de peces mantenidos en cautividad se enviaron a la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (FCPCT) para desarrollar varios enriquecedores para el alimento vivo destinado a las larvas de cherna. Durante 2017 se formularon tres productos experimentales que reproducían los niveles de EPA, DHA y ARA encontrados en los tejidos de chernas salvajes. Para la preparación de estos enriquecedores experimentales, se utilizó una combinación de diferentes productos basados en microalgas: *Chlorella* en polvo (>1% lípidos, > 12% proteína; Shaanxi Pioneer Biotech Co., Ltd, Xi'an, China), Microalgae DHA Powder (>40% DHA; Shaanxi Pioneer Biotech Co., Ltd, Xi'an, China), and ARA Powder (>40% ARA); Shaanxi Pioneer Biotech Co., Ltd, Xi'an, China) (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Enriquecedores experimentales.

<i>Enriquecedor experimental</i>	<i>DHA-Rot</i>	<i>ARA-Rot</i>	<i>ARA-Art</i>
<i>Ingredientes (g kg⁻¹ dieta)</i>			
<i>Polvo de Chlorella</i>	500	500	400
<i>Microalgae DHA Powder</i>	400	400	500
<i>ARA Powder</i>	20	100	100

Los enriquecedores experimentales para rotífero se formularon con dos niveles de ARA diferentes (3 % y 10 % de los ácidos grasos totales), mientras que el enriquecedor para *Artemia* contenía un 9 % de ARA sobre el total de los ácidos grasos. La composición de todos los productos se muestra en la **Tabla 2**. Se evaluó el efecto de los nuevos enriquecedores en la composición bioquímica de los rotíferos y *Artemia* y los resultados muestran un enriquecimiento eficiente de ambos tipos de presa. La influencia de los enriquecedores en las larvas de cherna no pudo evaluarse, dado que en 2017 la cantidad y la supervivencia de las larvas obtenidas no fue suficiente para llevar a cabo los experimentos necesarios.

Tabla 2. Composición proximal (% material seca) y de ácidos grasos (% de ácidos grasos totales) de los enriquecedores experimentales. HUFA: ácidos grasos altamente insaturados; ARA, ácido araquidónico; DHA, ácido docosahexaenoico; EPA, ácido eicosapentaenoico.

	<i>DHA-rot</i>	<i>ARA-Rot</i>	<i>ARA-Art</i>
<i>Análisis proximal (% materia seca)</i>			
<i>Lípidos</i>	9,34±0,14	9,34±0,24	9,23±0,34
<i>Proteínas</i>	25,58±0,21	30,08±0,13	22,54±0,09
<i>Contenido de ácidos grasos (% total ácidos grasos)</i>			
<i>Saturados</i>	19,39	17,61	21,95
<i>Monoenoicos</i>	8,30	8,76	8,35
<i>n-3</i>	48,82	45,72	45,14
<i>n-6</i>	20,87	25,43	24,26
<i>n-9</i>	4,55	5,65	4,88
<i>Total HUFA n-3</i>	44,20	41,42	44,62
<i>20:4n-6 (ARA)</i>	3,10	9,86	9,03
<i>20:5n-3 (EPA)</i>	6,33	5,87	6,40
<i>22:6n-3 (DHA)</i>	33,06	31,16	33,55
<i>EPA/ARA</i>	2,04	0,60	0,71
<i>DHA/EPA</i>	5,22	5,31	5,24
<i>n-3/n-6</i>	2,34	1,80	1,86



En base a los resultados obtenidos en 2017, tres nuevos enriquecedores (dos para rotífero y uno para *Artemia*) se formularon en 2018 y los experimentos sobre el efecto de las presas vivas enriquecidas con estos productos en las larvas de cherna están todavía en desarrollo. Los resultados estarán disponibles en la página web del proyecto próximamente.

Influencia de la alimentación de los reproductores en la fecundidad y la calidad de las puestas

Fátima Linares, Centro de Investigaciones Mariñas, Consellería do Mar, Xunta de Galicia, España.

Los requerimientos nutricionales de la cherna son por el momento desconocidos, y solamente existen algunas referencias relacionadas con los lugares de alimentación de las capturas comerciales (Brick Peres & Haimovi, 2003), y las tasas de alimentación en cautividad (Papandroulakis et al., 2004). Recientemente, se han realizado algunos estudios sobre la composición de la cherna salvaje (Roncarati et al., 2014; Linares et al., 2015). El desarrollo de dietas optimizadas para los reproductores es esencial para el futuro de la acuicultura de esta especie. Los lípidos de la dieta y especialmente los ácidos grasos tienen un papel crítico en la producción con éxito de gametos de alta calidad en los peces marinos (Izquierdo et al., 2001; Sargent et al., 2002).

Los experimentos llevados a cabo en DIVERSIFY incluyeron:

- ✓ Un estudio preliminar de la composición bioquímica de algunos tejidos de chernas salvajes y la comparación con la composición bioquímica de los tejidos de individuos mantenidos en cautividad.
- ✓ La composición bioquímica de varios alimentos para reproductores con especial atención al contenido de ácidos grasos.
- ✓ El efecto de diferentes regímenes de alimentación basados en alimento natural y comercial seco en la composición de ácidos grasos de los ovocitos y los huevos.
- ✓ El efecto de los regímenes alimentarios en la fecundidad y la calidad de huevos y esperma.

Para los experimentos preliminares, se muestrearon 91 peces de las Azores entre febrero de 2014 y abril de 2015. Los objetivos de este experimento fueron obtener información básica sobre esta especie, avanzar en el conocimiento de los requerimientos nutricionales de la cherna, identificar potenciales déficits nutricionales y finalmente formular dietas adecuadas para los reproductores.

Se extrajeron muestras de músculo, hígado y gónadas para su análisis y comparación con la composición de los tejidos de peces mantenidos en cautividad (**Fig. 15**).

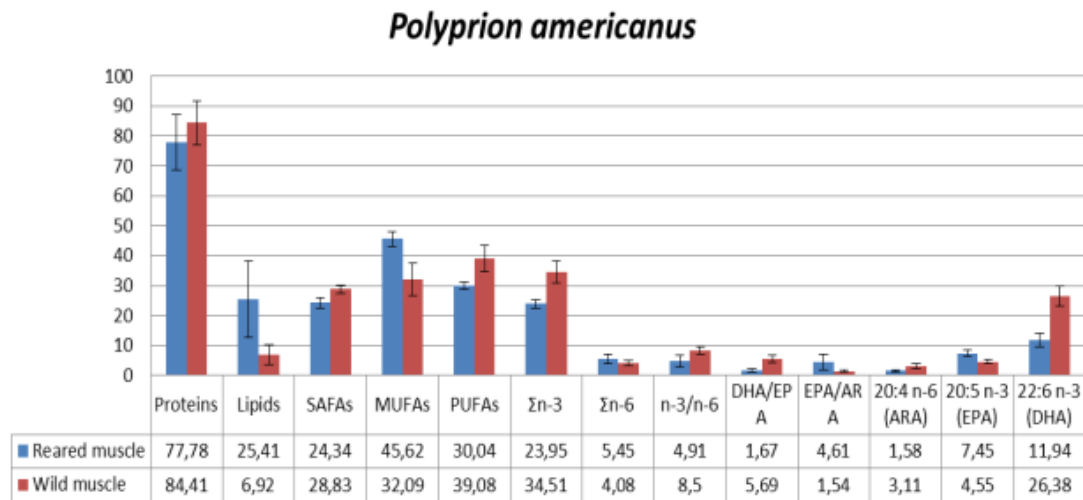


Figura 15. Proteínas, lípidos y ácidos grasos del músculo de chernas salvajes y mantenidas en cautividad.

Los resultados muestran que la cherna presenta un cantidad de proteínas en el músculo muy elevada (84 % en peces salvajes y 78 % en peces en cautividad) y que el nivel de lípidos es más bajo en los peces salvajes (7 % del peso seco) que en los peces en cautividad (25 %). En relación a la composición de ácidos grasos del músculo, los valores de PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados) y n-3 totales son más altos en las chernas salvajes (39 % y 34 % del total de ácidos grasos respectivamente) que en los peces mantenidos en cautividad (30 % y 24 % respectivamente). El DHA representa un 12 % en los peces cultivados y un 26 % en los salvajes. El contenido de EPA es de un 7 % en los peces cultivados y un 4 % en los salvajes, y el ARA representa un 1,6 % y un 3,1 % en peces cultivados y salvajes respectivamente. La relación EPA/ARA mostró valores de 4,6 en los peces cultivados y 1,5 en los salvajes.

Además se analizaron algunas muestras de gónadas maduras de machos y hembras salvajes, mostrando altos contenidos de proteínas (60 % en hembras y 44 % en machos). El contenido de lípidos representó un 21 % en las hembras y un 13 % en los machos). Los PUFA n-3 alcanzaron valores superiores al 35 % tanto en hembras como en machos, con una gran cantidad de DHA (25-31 %), mientras que el ARA representó un 7 % y un 10 % de los ácidos grasos totales en hembras y machos respectivamente.

En DIVERSIFY se utilizaron diferentes dietas para alimentar a los reproductores de cherna. FCPCT y Sparos S.A. formularon en 2015 la primera dieta seca (50 % de harina de pescado, 12,5 % de harina de calamar, 6 % de krill). Esta dieta tenía un 60 % de proteínas y un 16 % de lípidos. Se llevó a cabo un experimento en las instalaciones del IEO para comparar el efecto de la composición de ácidos grasos de este alimento seco y de una dieta semihúmeda en la composición de ácidos grasos de los ovocitos. En base a los resultados obtenidos en 2015, los datos obtenidos de peces salvajes y el análisis de muestras de huevos obtenidos de peces capturados, se formuló un nuevo alimento seco (25 % de harina de pescado, 34,2 % de harina de calamar, 4,5 % de krill). Los ingredientes de este alimento seco figuran en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Ingredientes del alimento seco.

<i>Ingrediente</i>	<i>% en el alimento seco</i>
Harina de pescado 70 LT FF Skagen	25,00
CPSP 90	10,00
Harina de calamar	34,20
Harina de krill (Aker Biomarine)	7,50
Gluten de trigo	7,00
Harina de trigo	7,25
Aceite de atún	1,00
Algatrium 70 % DHA	0,20
Incromega DHA 500TG	1,00
VEVODAR	1,30
Premix de vitaminas y minerales PV01	2,00
Lutavit E50	0,05
Lecitina de soja en polvo	1,50
Mezcla de macroalgas	1,00
Antioxidante en polvo (Paramega)	0,20
Antioxidante líquido (Naturax)	0,20
SelPlex – levadura enriquecida en Se	0,02
Carophyll Pink 10 % astaxantina	0,05
Nucleótidos (Nucleoforce)	0,03
L-aurina	0,50
Total	100,00

Se evaluó el efecto de las distintas dietas: semihúmeda y seca suministrada a dos lotes de reproductores en las instalaciones del IEO y una mezcla de merluza y calamar (mitad y mitad) suministrada a los reproductores del IGAFa en la composición de ácidos grasos de los ovocitos y los huevos. Los experimentos se llevaron a cabo durante 2016 y 2017.

La dieta semihúmeda consistía en una mezcla de 14,8 % de pescado blanco, 14,8 % de pescado graso, 18 % de mejillones, 17,6 % de calamar y 34,8 % de harina de pescado. Esta dieta contenía un 65 % de proteínas y un 17 % de lípidos. La dieta seca contenía un 68 % de proteínas y un 12,5 % de lípidos, y la dieta de merluza y calamar contenía un 63 % de proteínas y un 8 % de lípidos. El perfil de ácidos grasos de estas dietas se muestra en la **Fig. 16**.

Se extrajeron muestras de ovocitos y huevos viables mediante biopsia a las hembras alimentadas con las tres dietas, con el fin de determinar la influencia de la composición de ácidos grasos de las dietas en ambos. La cantidad total de lípidos fue mayor en los huevos de las hembras del lote del IEO alimentadas con dieta semihúmeda o con alimento seco (25 % y 19 % del peso seco respectivamente), que en las hembras del IGAFa alimentadas con merluza y calamar (9 % del peso seco), lo que indica que este parámetro está claramente influenciado por la dieta. El mayor contenido de PUFAs n-3 se observó en los ovocitos y los huevos de hembras alimentadas con merluza/calamar, mientras que los valores de PUFAs n-6 fueron mucho mayores en los ovocitos (12 %) y los huevos (10 %) de las hembras alimentadas con alimento seco. En el caso del ARA,



los valores más altos se encontraron en los ovocitos y huevos de las hembras alimentadas con dieta seca, 7 % y 5 % respectivamente. Se observó correlación entre el perfil de ácidos grasos de la dieta de los reproductores y el de los ovocitos y huevos.

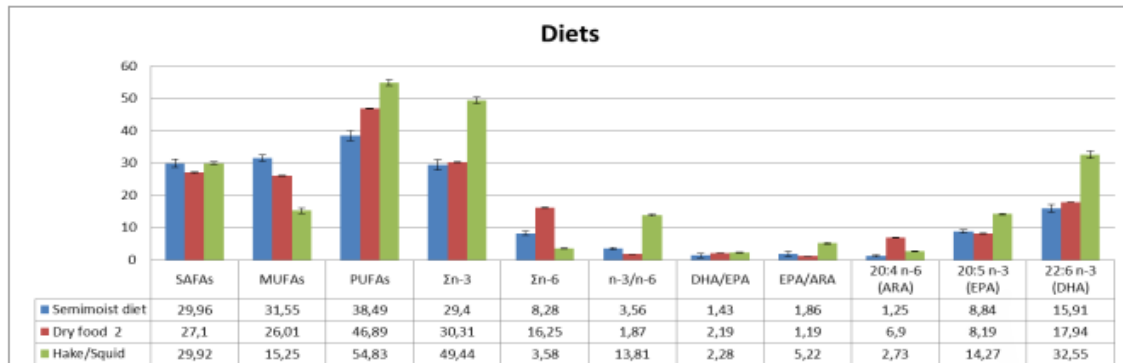


Figura 16. Perfil de ácidos grasos de las dietas: semihúmeda, seca y merluza/calamar.

Por otra parte, se obtuvieron los primeros datos del perfil de ácidos grasos del esperma de machos de diferentes lotes, observándose que no existían diferencias significativas en los principales grupos de ácidos grasos entre los distintos lotes, con valores de ácidos grasos saturados entre 32 % y 33 %, monoinsaturados entre 9 % y 11 % y poliinsaturados entre 56 % y 58 % del total. El contenido de PUFAs n-3 varió entre el 49 % y el 51 % de los ácidos grasos totales, y el de PUFA n-6 entre el 5,5 % y el 9 %. Los primeros resultados obtenidos acerca de la fecundidad relativa (nº de huevos/kg de hembra) y el número de puestas de las hembras alimentadas con las distintas dietas mostraron que las alimentadas con dieta seca presentaban la mayor fecundidad relativa y el mayor número de puestas. Estos valores se fueron incrementando entre 2015 y 2018. Sin embargo, estos resultados deben confirmarse en el futuro con un mayor número de datos.

Las conclusiones obtenidas a partir de los estudios en nutrición de la cherna son:

- ✓ Se formularon enriquecedores para el alimento vivo (rotífero y *Artemia*). Se usaron dos niveles de ARA para los enriquecedores de rotífero y uno para *Artemia*, y se evaluó el efecto de estos nuevos productos en la composición bioquímica de los rotíferos y de *Artemia*,
- ✓ La cherna presenta una elevada cantidad de proteínas en el músculo, 84 % en los peces salvajes y 78 % en los peces mantenidos en cautividad,
- ✓ Los individuos salvajes presentan menos lípidos en el músculo y el hígado (7 % y 39 % respectivamente) que los mantenidos en cautividad (25 % y 34 %), y también se observan algunas diferencias en el perfil de ácidos grasos entre las chernas salvajes y las mantenidas en cautividad, siendo el contenido de PUFAs y n-3 (% del total de ácidos grasos) mayor en los peces salvajes,
- ✓ Se encontró una clara relación entre el perfil de ácidos grasos de las dietas para reproductores (semihúmeda, seca y mezcla merluza/calamar) y el perfil de ácidos grasos de ovocitos y huevos de las hembras alimentadas con las distintas dietas,



- ✓ Los resultados obtenidos con el alimento seco mostraron que una dieta para cherna debe contener una elevada cantidad de proteínas, un bajo nivel de lípidos, un nivel elevado de PUFAs n-3, y que la relación EPA/ARA debe ser similar a la observada en las gónadas de hembras salvajes,
- ✓ Se obtuvieron los primeros datos acerca del perfil de ácidos grasos del esperma de los machos de diferentes lotes,
- ✓ La fecundidad relativa (nº de huevos/kg de hembra) y el número de puestas por hembra se incrementaron en las hembras alimentadas con dieta seca a lo largo de los años, de 2015 a 2018.

Cultivo larvario

Desarrollo del aparato digestivo en la cherna

Ioannis Papadakis, Centro Helénico de Investigación Marina, Grecia.

El cultivo larvario es en la actualidad el principal cuello de botella para el cultivo con éxito de la cherna, debido a las bajas tasas de supervivencia observadas durante este periodo. Uno de los principales objetivos en el cultivo larvario de la cherna es el desarrollo de protocolos de acuerdo con los requerimientos específicos de las larvas durante las etapas iniciales del desarrollo. El estudio del desarrollo de los órganos relacionados con el comportamiento alimentario de las larvas ofrece parte de la información necesaria para la optimización de los protocolos de cultivo larvario. Durante las fases larvarias, los sistemas estrechamente ligados al comportamiento alimentario son los órganos de la visión, a través de los cuales los peces perciben las partículas alimentarias presentes en el entorno, y el sistema digestivo, que permite a las larvas capturar, ingerir, digerir y absorber nutrientes del alimento. Estos dos sistemas y las estructuras que los componen están relacionados con los protocolos de cultivo y alimentación de las larvas. El sistema de visión (es decir, el ojo) determina la capacidad de las larvas de identificar las presas bajo las condiciones de luz presentes en el entorno, mientras que el sistema digestivo está también influenciado por la composición cualitativa y cuantitativa de los protocolos de alimentación usados en la crianza.

La mayoría de los órganos (excepto los dientes maxilares y la mandíbula superior que se hacen visibles a día 19 post-eclosión) aparecen sobre el día 8 post-eclosión (**Fig. 17**).

Desde el punto de vista ontogénico, el desarrollo del sistema digestivo hasta los 23 dpe puede categorizarse en dos períodos distintos.

1: 0-5 dpe. Este período se refiere a los estadios prelarvarios, durante los cuales la alimentación de las larvas se basa exclusivamente en las reservas lecitotróficas. Durante esta fase, el tracto digestivo aparece como un tubo cerrado y recto localizado dorsalmente al saco vitelino que consiste en un epitelio de una capa de células simples cuboidales y columnares. A los 5 dpe tiene lugar la apertura de la boca y del ano (**Fig. 18**). Al mismo tiempo, aparecen también el hígado y el páncreas. Las células hepáticas más tempranas aparecen sobre el día 5 post-eclosión y se localizan al principio bajo el saco vitelino, bajo el intestino anterior; más tarde las células



hepáticas rodean la parte anterior del intestino (**Fig. 18**). El páncreas aparece también en el 5º dpe alrededor de la región anterior del canal digestivo (**Fig. 18**).

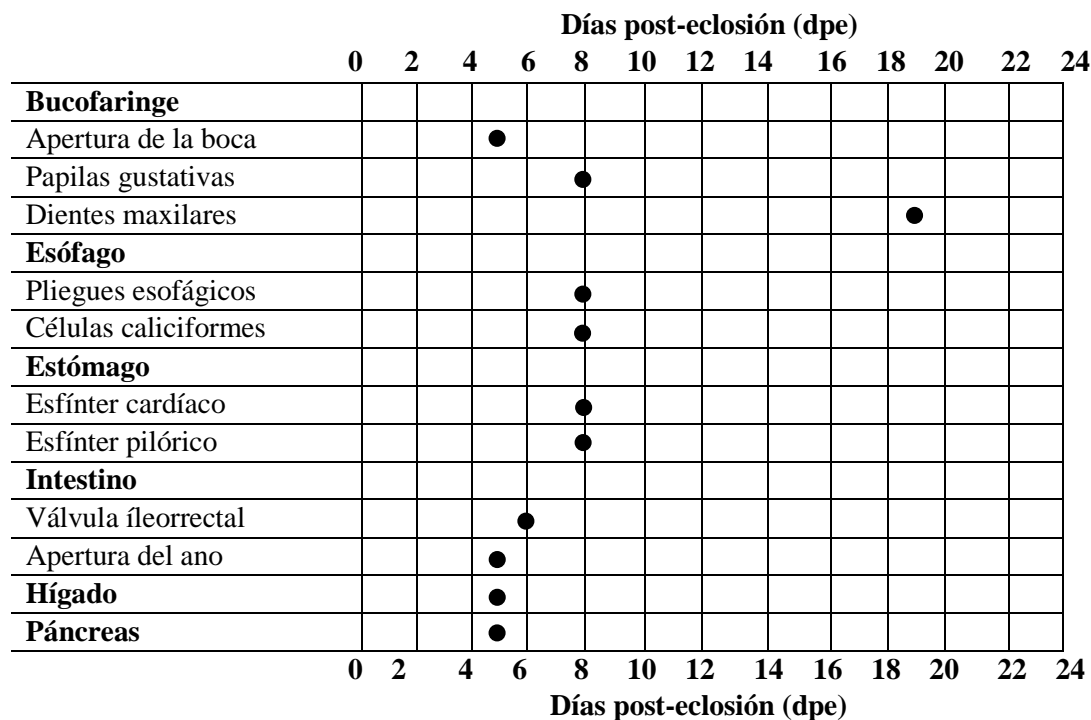


Figura 17. Representación esquemática de las principales estructuras del sistema digestivo estudiadas. El momento de aparición de cada estructura se representa como un círculo negro en función de los días post-eclosión (dpe, eje horizontal).

2: 5-23 dpe. La apertura de la boca en el día 5 post-eclosión inicia la transición del período 1 al período 2, o de la fase prelarvaria a la fase larvaria. Hasta el día 23 post-eclosión el material endógeno del saco vitelino está visible en el interior del saco lecitotrófico. La válvula íleoanal que separa el intestino medio del intestino posterior aparece a los 6 dpe (**Fig. 18**). A los 8 dpe son visibles la formación de los pliegues esofágicos y las células caliciformes en el epitelio esofágico (**Fig. 18**). Los esfínteres pilórico y cardíaco en el intestino de las larvas de cherna también aparecen el día 8 post-eclosión (**Fig. 18**) indicando el área en la que se formará el estómago. Las primeras papilas gustativas se forman alrededor de la bucofaringe el día 8 post-eclosión (**Fig. 18**). Las últimas estructuras relacionadas con la ontogenia del sistema digestivo son los dientes maxilares en la mandíbula superior, que son visibles el día 19 post-eclosión (**Fig. 18**).

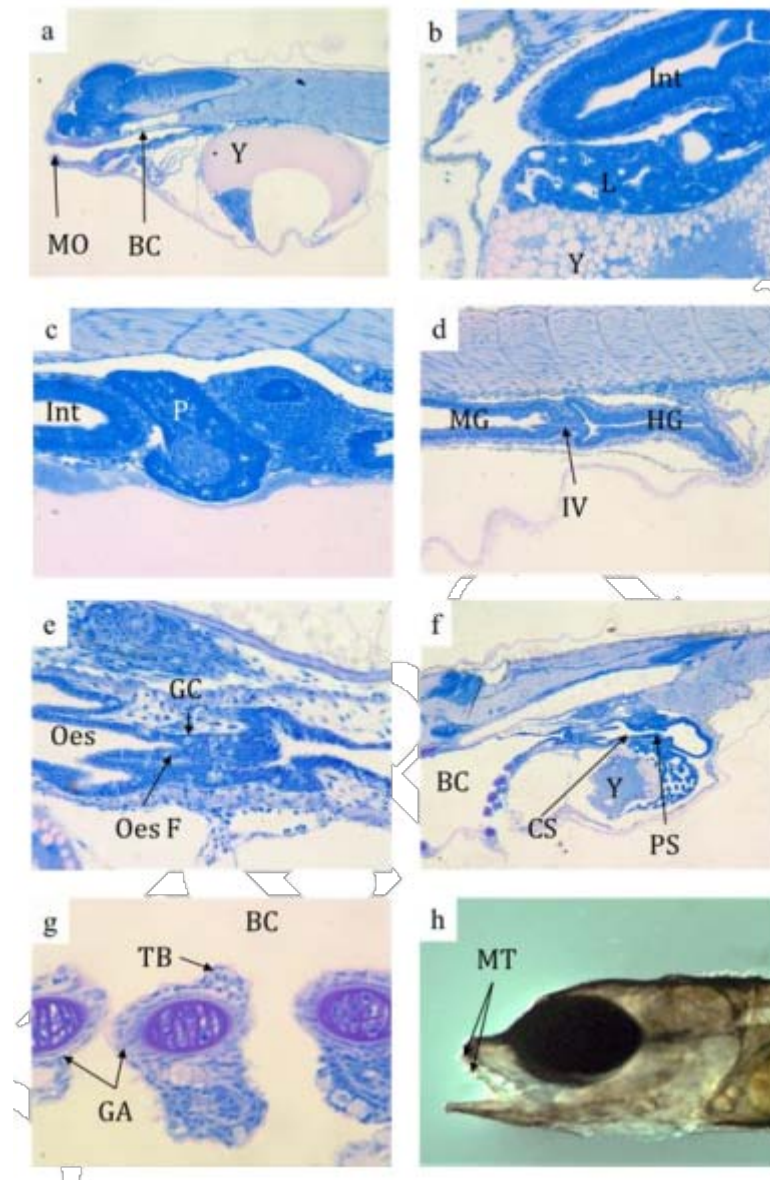


Figura 18. Microfotografías de secciones histológicas de larvas de cherna en diferentes fases de desarrollo. (a) boca abierta a día 5 post-eclosión; (b) aparición del hígado a día 5 post-eclosión; (c) aparición del páncreas a día 5 post-eclosión; (d) aparición de la válvula íleoorrectal a día 6 post-eclosión; (e) formación de los pliegues y las células caliciformes en el esófago a día 8 post-eclosión; (f) formación del área del estómago a partir de los esfínteres cardíaco y pilórico; (g) aparición de las papilas gustativas a día 8 post-eclosión; (d) formación de los dientes maxilares en la mandíbula superior a día 19 post-eclosión. BC = bucofaringe, CS = esfínter cardíaco, GA = arcos branquiales, GC = células caliciformes, HG = intestino posterior, Int = intestino, IV = válvula íleoorrectal, L = hígado, MO = apertura de la boca, MG = intestino medio, MT = dientes maxilares, Oes = esófago, Oes F = pliegues esofágicos, P= páncreas, PS= esfínter pilórico, TB = papilas gustativas, Y = vitelo.



En la cherna, la ontogénesis del sistema digestivo se considera un proceso lento en comparación con otras especies. El desarrollo del sistema digestivo está controlado por factores endógenos y generalmente está genéticamente programado, pero el momento de la aparición de las estructuras del sistema digestivo puede estar influenciado por una serie de factores exógenos, siendo la temperatura el más importante (Kamler, 2002). La ontogénesis de los órganos relacionados con los sistemas digestivos y de la visión no se completa hasta el día 23 post-eclosión. Las estructuras principales como las glándulas gástricas o los ciegos pilóricos, cuya aparición caracteriza el momento en que se completa el desarrollo del sistema digestivo, no fueron identificadas en este estudio. Sin embargo, los eventos ontogénicos que ocurren en el sistema digestivo, como la apertura de la boca en el día 5 post-eclosión, la aparición de las células caliciformes en el epitelio esofágico, la creación de los pliegues esofágicos y la aparición de los esfínteres pilórico y cardíaco, sugieren que el sistema digestivo de la cherna adquiere la capacidad de procesar organismos del zooplancton en el día 23 post-eclosión. La aparición de los dientes maxilares en el día 19 post-eclosión indica que las larvas son capaces a esta edad de capturar con éxito organismos zooplanctónicos. Esta afirmación es reforzada por el hecho de que el sistema visual de las larvas de cherna a partir del día 6 post-eclosión está ya desarrollado hasta el punto de que las larvas son capaces de distinguir objetos en el entorno en presencia de luz, ya que solamente se han desarrollado los conos.

La ontogenia de la retina de la cherna (no mostrada) resultó ser similar al patrón general observado en la mayoría de las especies de peces. En el momento de la eclosión, la retina es un tejido indiferenciado y no funcional, tal y como sucede en la mayoría de los peces marinos con fases vitales iniciales pelágicas. Los conos son los primeros fotorreceptores en aparecer. Este hecho indica que en esta fase del desarrollo las larvas de cherna son capaces de ver diferentes objetos en el entorno solamente durante las horas de luz. Por tanto, es necesario proporcionar luz a los tanques de cultivo tras el día 5 post-eclosión. La agudeza visual de la cherna –la distancia a la que el ojo puede discriminar entre dos puntos– se incrementa con el tiempo (no mostrado). Aunque la densidad de conos (n° por $100 \mu\text{m}$ de longitud) en la retina disminuye con el tiempo, el radio de la lente ocular se incrementa, lo que contribuye a un aumento de la distancia a la que los peces son capaces de ver partículas alimenticias como rotíferos y nauplios de *Artemia*. Así, la densidad de rotíferos, que se consideran las partículas alimenticias más pequeñas presentes en el tanque de cultivo, podría calcularse de forma teórica de acuerdo con las capacidades visuales de las larvas de cherna.

Resumiendo los resultados de este estudio, se observa que tras los primeros 23 días de cultivo, el sistema digestivo y el ojo de las larvas de cherna están desarrollados hasta el punto de que en este momento los peces son, en principio, capaces de detectar, capturar y utilizar diferentes tipos de organismos zooplanctónicos. Las larvas de cherna se caracterizan asimismo por el gran tamaño del saco vitelino, cuya absorción se completa el día 20 post-eclosión a $17 \pm 0,5$ °C. La presencia de un saco vitelino y de una gota lipídica ambos de gran tamaño indica la existencia de una prolongada fase larvaria autotrófica. Desde un punto de vista hidrodinámico, el gran saco vitelino y la gran gota lipídica incrementan la flotabilidad de las larvas de cherna. Este fenómeno se invierte a lo largo del tiempo, a medida que el volumen del saco vitelino se reduce por la absorción de su contenido por parte de la larva. La elevada flotabilidad puede afectar negativamente la velocidad de desplazamiento horizontal de las larvas. Esto explica por qué las larvas de cherna se sitúan cerca de la superficie del agua en los tanques de cultivo durante las primeras fases de desarrollo y muestran una capacidad de natación relativamente limitada



(observación personal en previos experimentos de cultivo larvario). Sin embargo, durante la fase de nutrición autotrófica el sistema digestivo y el sistema de visión de las larvas se desarrollan de forma que las larvas son capaces de detectar, capturar y asimilar organismos zooplanctónicos, y esto debe ser tenido en cuenta en el protocolo de alimentación. Dado que los órganos principales, como las glándulas gástricas, no aparecen hasta que las larvas tienen una longitud de 5,5 mm, el protocolo de alimentación debe incluir una combinación de presas fáciles de capturar y de digerir como rotíferos o diferentes tipos de copépodos en diferentes estadios de desarrollo. Todo ello debe combinarse con la optimización de las condiciones de cultivo como la hidrodinámica del tanque, el protocolo de temperatura durante el cultivo y las condiciones de iluminación en el agua, para el desarrollo de los protocolos de cultivo larvario de la cherna.

Condiciones óptimas para el cultivo larvario

Blanca Álvarez-Blázquez, Instituto Español de Oceanografía, Vigo, España.

Los principales objetivos durante el primer año de proyecto (2015) fueron el desarrollo de un protocolo de cultivo y el estudio de la influencia de la temperatura del agua. Los socios implicados fueron HCMR, IEO, CMRM y MC2. Una puesta del MC2 se incubó a 14,6 °C, con una tasa de eclosión del 14 %. Se aplicó el protocolo de alimentación utilizado generalmente para peces marinos y las larvas sobrevivieron hasta el día 20 post-eclosión. Se usaron dos lotes de huevos para los experimentos iniciales, uno del lote del HCMR y otro de MC2, transportándose 2.000 larvas desde Galicia a Creta en cajas de poliestireno (**Fig. 19**).

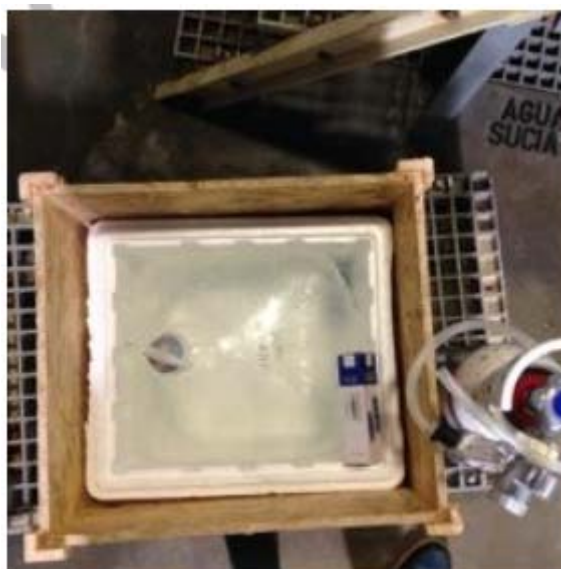


Figura 19. Huevos de cherna transportados de Aquarium Finisterrae (Galicia) al HCMR (Creta).



Los ensayos se llevaron a cabo en tanques conectados a un sistema cerrado de recirculación. Tras la incubación y durante la fase autotrófica, la temperatura se mantuvo a 16 °C, incrementándose a continuación de forma gradual hasta los 17,5 °C. La primera alimentación tuvo lugar a los 10 días post-eclosión, y se basó en rotíferos enriquecidos, *Artemia* AF (desde el día 13 post-eclosión) y *Artemia* EG (desde el día 24). El lote del HCMR sobrevivió hasta el día 24 post-eclosión. Durante el período de cultivo se observaron algunos individuos con malformaciones (**Fig. 20**).

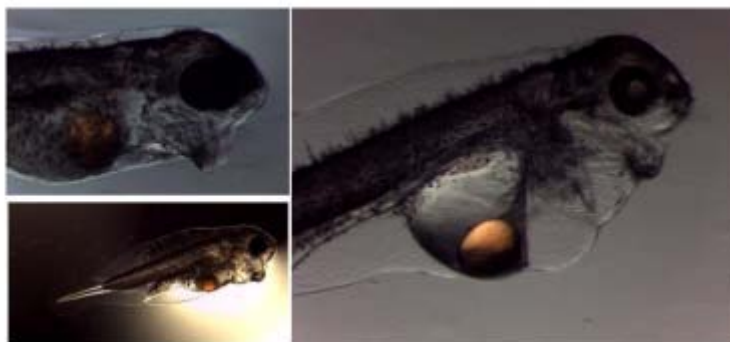


Figura 20. Larvas de cherna con malformaciones observadas durante el cultivo en el IEO.

El problema se identificó como similar al síndrome inflamatorio del saco vitelino (SYSS) descrito en el bacalao de Murray (un pez australiano de agua dulce), que está relacionada con una nutrición inadecuada de los progenitores (Gunasekera et al., 1998). Además, se ha descrito una apariencia similar en la enfermedad del saco azul (BSD), común en la trucha (Brzuzan et al., 2007). Se han propuesto varias causas, siendo la más común la toxicidad causada por compuestos nitrogenados como el amonio; el estrés oxidativo juega también un papel importante. Aunque en la cherna parece ocurrir el SYSS, son necesarios más estudios.

Las larvas de las puestas naturales en Aquarium Finisterrae (MC2) se cultivaron en tanques de 50 l en el propio MC2 (Fig. 21), con rotíferos enriquecidos con microalgas y copépodos en circuito abierto hasta el día 22 post-eclosión.

Las larvas del IEO obtenidas mediante fertilización *in vitro* se cultivaron en tanques de 500 l en circuito cerrado hasta el día 10 post-eclosión, a baja densidad (0,2 larvas/l), usando microalgas (aguas verdes) y alimentando con rotíferos enriquecidos con T-Iso hasta día 14 post-eclosión. Las larvas de las puestas naturales de MC2 se cultivaron a densidades altas (52 larvas/l), con fotoperiodo natural durante la alimentación endógena. Tras la apertura de la boca y el agotamiento del saco vitelino se usó luz artificial (410 lux) durante 12 h diarias hasta el fin del período de cultivo. Se monitorizaron las larvas, el saco vitelino y la gota lipídica (**Fig. 22**), y se tomaron fotografías (**Fig. 23**).

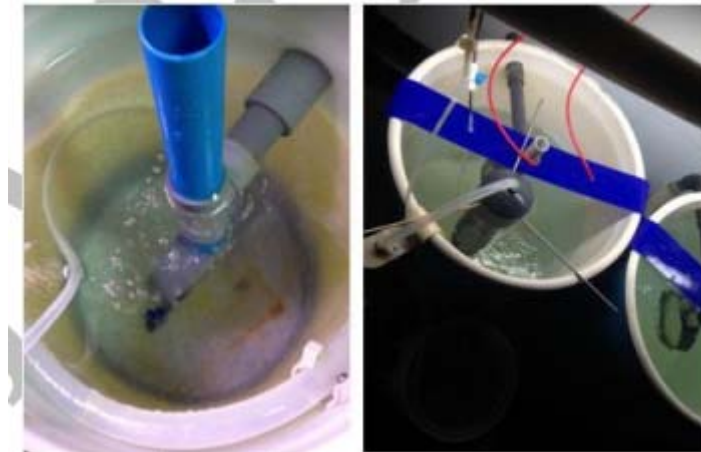


Figura 21. Tanques de cultivo con recirculación (renovación de agua) en MC2.

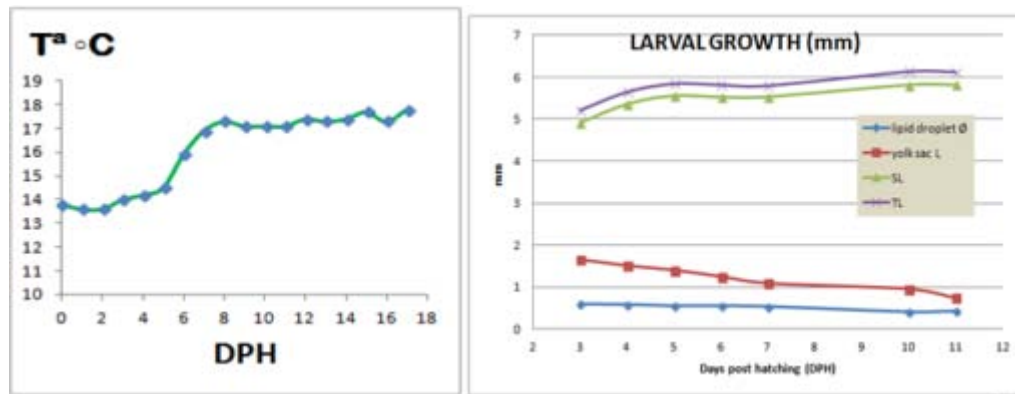


Figura 22. Temperatura del agua durante el cultivo larvario (izquierda). Crecimiento larvario y consumo del saco vitelino y la gota lipídica (derecha).

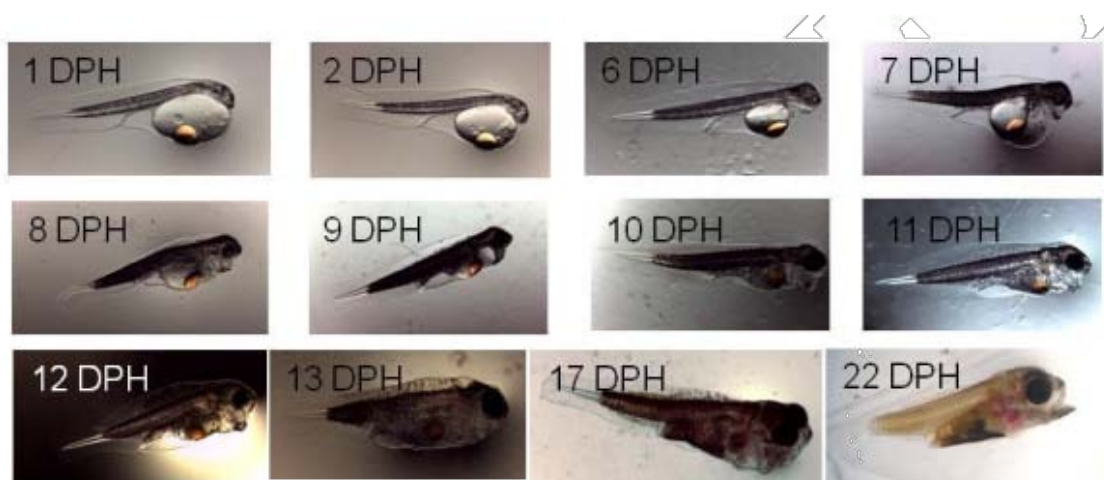


Figura 23. Desarrollo morfométrico hasta el día 22 post-eclosión.



Durante 2016, la calidad de las puestas en el MC2 se incrementó considerablemente, y los reproductores del IEO comentaron también a tener puestas de buena calidad. Las larvas fueron alimentadas con rotíferos y *Artemia* enriquecidos con T-Iso hasta el día 27 post-eclosión (Álvarez-Blázquez et al. 2016). Se calculó la eficiencia del crecimiento de las larvas hasta el día 24, con resultados similares en los lotes del Mediterráneo y del Atlántico (MC2, CMRM e IEO) (Fig. 24). La longitud de las larvas fue $4,70 \pm 0,27$ a día 1 post-eclosión. El agotamiento del saco vitelino se produjo en el día 11 post-eclosión a una temperatura del agua de 14-17 °C, y a día 8 post-eclosión a 17-20 °C. La apertura de la boca tuvo lugar a los 7 días post-eclosión a temperatura entre 14 y 17 °C, y a día 8 post-eclosión entre 17 y 20 °C (Álvarez-Blázquez, 2017).

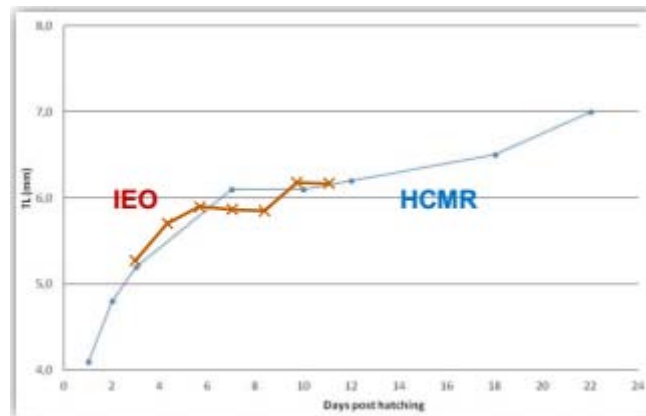


Figura 24. Crecimiento de las larvas en los experimentos de cultivo en el Mediterráneo y en el Atlántico.

Durante mayo de 2016, se realizaron dos experimentos para probar diferentes temperaturas de incubación con huevos de diferentes puestas de los reproductores del IEO (**Fig. 25**). Los mejores resultados en términos de desarrollo embrionario normal y de tasa de eclosión se obtuvieron a $16 \pm 0,8$ °C. A $14 \pm 0,5$ °C se obtuvo un 7,5 % de eclosión a los 5 días post-fecundación (dpf). A $16 \pm 0,8$ °C, la eclosión se produjo un día antes (4 dpf) y la tasa de éxito fue mayor, 11,9 % (**Fig. 25**).

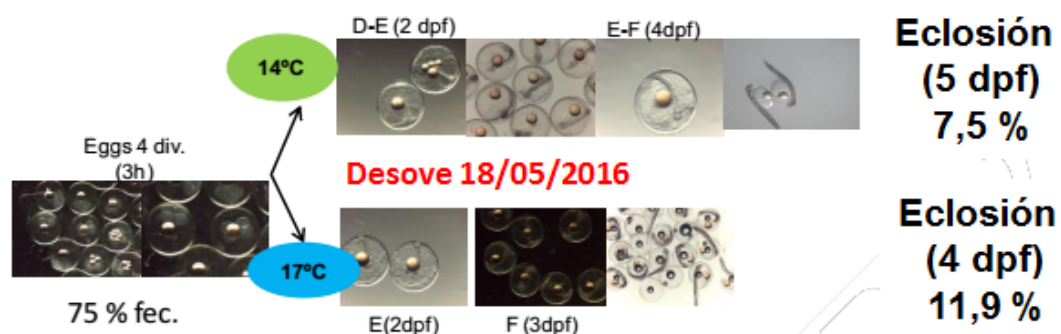


Figura 25. Primeros ensayos de incubación a dos temperaturas del agua diferentes.



En abril de 2017 se realizó un experimento de incubación a tres temperaturas (13-14°C, 16-17°C y 19-20°C) para ampliar y validar los resultados obtenidos en los experimentos anteriores (**Fig. 26**).



Figura 26. Tanques con tres temperaturas del agua diferentes, en los que se introdujeron recipientes cilíndricos con fondo de malla para incubar los huevos.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) tanto en la tasa de eclosión como en la de ocurrencia de malformaciones entre las temperaturas de 13,7 y 19,5 °C, mientras que las diferencias no fueron significativas respecto a las larvas incubadas a 16,6 °C. Estos resultados sugieren que las bajas temperaturas ocasionan tasas muy bajas de eclosión y altos porcentajes de malformaciones en las larvas (**Fig. 27**).

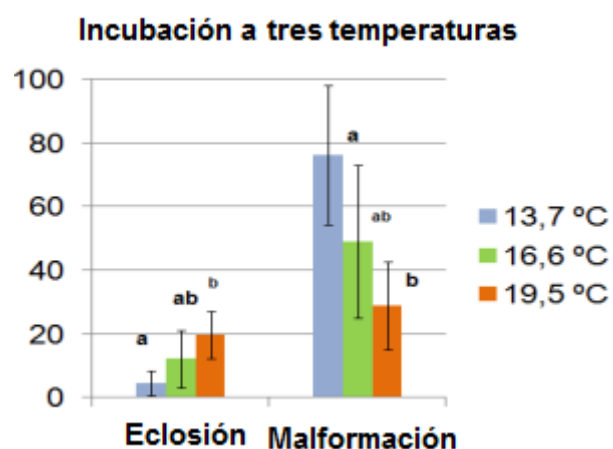


Figura 27. Tasa de eclosión (%) y calidad de las larvas (malformadas) durante el experimento con tres temperaturas del agua.

Las tasas de eclosión y el porcentaje de malformaciones a cada temperatura se calcularon de la siguiente forma:

$$\text{Eclosión (\%)} = N_L / N_H \times 100$$

$$\text{Malformaciones (\%)} = N_D / N_L \times 100$$

Donde N_L es el número total de larvas eclosionadas; N_H es el número total de huevos y N_D el número de larvas con malformaciones. El desarrollo embrionario tuvo diferente duración a cada temperatura, y fue de 4, 5 y 7 días a 19,5°C, 16,6°C and 13,7°C, respectivamente. La calidad y el número de individuos eclosionados se muestra en la **Tabla 3**.



Tabla 3. Porcentaje de huevos recogidos del fondo del tanque (huevos muertos) durante los tres primeros días de incubación en relación al número total de huevos inicialmente incubados.

T ^a	Días de incubación		
	1	2	3
13,7	24% ± 9,7%	30,2% ± 9,5%	29,5% ± 10,9%
16,6	35,4% ± 23,8%	40,8% ± 20,9%	4,7% ± 3,4%
19,5	56,8% ± 8%	18,2% ± 7,5%	

At 13,7°C, la mortalidad de los huevos se situó alrededor del 30 % por día durante los primeros tres días de incubación. A 16,6 °C, en los dos primeros días se produjo alrededor de un 75 % de mortalidad. A 19,5 °C la mayor parte de la mortalidad tuvo lugar el primer día de incubación. Este hecho indica que durante las primeras fases de desarrollo del huevo la vulnerabilidad a las condiciones externas es mayor; por tanto, los parámetros de incubación deben ser ajustados y las instalaciones y el equipamiento optimizados con el fin de promover una embriogénesis correcta e incrementar la supervivencia embrionaria y la eclosión.

Con el fin de conocer el rango óptimo de temperatura para el cultivo larvario de la cherna, se llevó a cabo un experimento durante abril y mayo de 2017, ensayando dos rangos diferentes: 15°C-17°C y 19°C-21°C, descartando la temperatura mínima de 14 °C ensayada en 2016, con la que se obtuvieron resultados muy pobres. Se introdujeron larvas de 3 días post-eclosión en los tanques de cultivo de 100 l a una concentración de 7 larvas/l, por triplicado, con flujo de agua continuo, baja renovación de agua filtrada a 1 µm y aireación suave (**Fig. 28**). Se administraron rotíferos enriquecidos con T-Iso a una concentración de 3 rotíferos/ml. Las temperaturas medias registradas durante el experimento fueron 16,4±0,6°C y 19,7±0,6°C para cada uno de los rangos usados. Se tomaron datos de la longitud total (mm) y del peso seco (mg) de 10 larvas/tratamiento a los días 3 y 10 post-eclosión (**Tabla 4**).



Figura 28. Tanques cilíndricos para los experimentos de cultivo larvario a diferentes temperaturas del agua.



La longitud media aumentó el día 10 post-eclosión en las larvas mantenidas a 16,4 °C, mientras que disminuyó en las mantenidas a 19,7 °C. El peso seco también disminuyó en ambos tratamientos a los 10 días de edad. Esto pudo deberse a la aparición en los tanques mantenidos a 19,7 °C a partir del día 8 post-eclosión de un gran número de larvas con malformación en la boca y el opérculo, lo que impidió un desarrollo, movimiento y alimentación correctos. Este mismo fenómeno se observó en los tanques a 16,4 °C a partir de los 10 días de vida (**Tabla 4**).

A medida que avanzaban los días, aparecieron malformaciones en la mayoría de las larvas de los dos tratamientos, provocando mortalidades masivas. No se observó alimento en el tracto digestivo en ninguna de las lavas muestreadas durante todo el experimento. Por este motivo, no se consideró apropiado realizar más muestreos, ya que los datos generados no serían representativos del estudio. Las larvas a 19,7 °C sobrevivieron 24 días, mientras que las mantenidas a 26,4 °C llegaron a los 29 días.

Tabla 4. Longitud media (mm) y peso seco (mg) de las larvas cultivadas a dos temperaturas diferentes, a los días 3 y 10 post-eclosión.

Edad (días)	16,4 °C		19,7 °C	
	Longitud (mm)	Peso seco (mg)	Longitud (mm)	Peso seco (mg)
3	5,582±0,364	0,3553±0,0261	5,582±0,364	0,3553±0,0261
10	5,92±0,347	0,3044±0,0164	5,49±0,289	0,2492±0,0331

Durante 2018 se lograron nuevos avances en la obtención de puestas naturales y cultivo larvario en los tres lotes de cherna mantenidos en Galicia, dando lugar a muy buenos resultados de eclosión (42 %-84 %) y en supervivencia larvaria, hasta los 34-37 dpe. En el CMRM (IGAFA) se obtuvieron supervivencias larvarias hasta los días 60-90 post eclosión de un lote de una puesta natural en el IEO y de otro lote del MC2 (**Fig. 29**). Esta fue la primera vez en el proyecto que se consiguió producir juveniles y destetarlos a alimento inerte, y representa un hito en los esfuerzos para producir chernas de acuicultura. Esta prueba proporcionó importantes datos sobre el crecimiento e incrementó nuestro conocimiento acerca de los protocolos de alimentación y el comportamiento y la metamorfosis de las larvas de cherna.



Figura 29. Juveniles de cherna cultivadas en las instalaciones del IGAFA (CMRM).



En la actualidad se están haciendo cambios en los protocolos de incubación y cultivo larvario que pueden evitar el problema de las malformaciones larvarias y mejorar los resultados de supervivencia. Durante las primeras fases de desarrollo del huevo, la sensibilidad a las condiciones externas es mayor; en la actualidad se han ajustado los parámetros de incubación y se han optimizado las instalaciones y los equipamientos para incrementar la calidad de la embriogénesis y mantener las larvas en las mejores condiciones para incrementar la supervivencia.

También se ha avanzado en el conocimiento de las temperaturas óptimas para la incubación y el cultivo larvario. El estudio de las condiciones técnicas y los parámetros apropiados en cuanto a aireación, flujo de agua y la circulación del agua, además del trabajo para reducir las malformaciones larvarias son necesidades del futuro inmediato. Los avances en manejo y cultivo larvario se publicarán en la página web de DIVERSIFY en cuanto estén finalizados.



Referencias

- Álvarez-Blázquez, B., Rodríguez, J.L., Vilar, A., Mylonas, C., Papandroulakis, C., Pérez Rial, E., N. Lluch, G. Pazos and F. Linares. Progress in the wreckfish intensive culture. new candidate species for aquaculture. Aquaculture Europe 2017 (EAS), 17-20 October, Dubrovnik, Croacia.
- Anderson, S.A., Salinas, I., Walker, S.P., Gublin, Y., Pether, S., Kohn, Y.Y., Symonds, J.E., 2012. Early development of New Zealand hapuku *Polyprion oxygeneios* eggs and larvae. Journal of Fish Biology 80, 555-571.
- Ball, A.O., Sedberry, G.R., Zatzoff, M.S., Chapman, R.W., Carlin, J.L., 2000. Population structure of wreckfish *Polyprion americanus* determined with microsatellite genetic markers. Mar. Biol. 137: 1077-1090.
- Brick Peres & Haimovi, 2003. Alimentação do cherne-poveiro *Polyprion americanus* (polyprionidae, teleostei) no sul do Brasil. Atlántica. Rio Grande 25 (2):201-208.
- Fischer, W., Bauchot, M.L., Schneider, M., 1987. Fiche FAO d'identification des especes pour les besoins de la peche, Rev 1. Mediterranee et Mer Noire (zone de peche 37) FAO, Rome.
- Kamler, E., 2002. Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective. Rev. Fish. Biol. Fish. 12, 79-103.
- Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H., Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. Aquaculture 197: 25-42.
- Linares, F., Rodríguez, J.L. Peleteiro, J. B., Cal, R., Pazos, G. and B. Álvarez-Blázquez. 2015. Biochemical composition of wild wreckfish (*Polyprion americanus*). EAS 2015
- Papandroulakis N, M. Suquet, M.T. Spedicato, A. Machias, C. Fauvel and P Divanach. 2004. Feeding rates, growth performance and gametogenesis of wreckfish (*Polyprion americanus*) kept in captivity. Aquaculture International 12: 395-407.
- Papandroulakis, N., Mylonas, C.C., Syggelaki, E., Katharios, P., Divakaran, S., 2008. First reproduction of captive-reared wreckfish (*Polyprion americanus*) using GnRH implants, European Aquaculture 2008, Krakow, Poland.
- Peleteiro, J.B., Saavedra Penas, C., Pérez Rial, E., Álvarez-Blázquez, B., Soares, E.C., Vilar Perón, A., 2011. Diversificación de especies en acuicultura. Estudio preliminar de la reproducción de la cherna (*Polyprion americanus*) en cautividad, Congreso Nacional de Acuicultura, Castelldefels, Spain.
- P Brzuzan, M Wozny, S Dobosz, H Kuzminski, M K Łuczynski and M Gora, 2007. Blue sac disease in larval whitefish, *Coregonus lavaretus* (L.): pathological changes in mRNA levels of CYP1A, ERα, and p53. Journal of Fish Diseases 2007, 30, 169–173
- Pérez Rial, E.; Giménez, I.; Rodríguez Villanueva, J.L., Álvarez-Blázquez, B.; Chaves-Pozo, E.; Lluch, N.; Pazos, G. y Linares, F. 2017. Primeras experiencias de inducción a la maduración con gonadotropinas recombinantes en reproductores de cherna (*Polyprion americanus*). CNA, Spain. 3-5 October. Zaragoza, Spain.
- R. M. Gunasekera, G. J. Gooley, S. S. De Silva, 1998. Characterisation of 'swollen yolk-sac syndrome' in the Australian freshwater fish Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*, and associated nutritional implications for large scale aquaculture. Aquaculture 169 _1998. 69–85
- Rodriguez, J.L., Alvarez-Blázquez, B., Pérez Rial, E., Martínez, J.M., Pazos, G., Fátima Linares. 2017. Evaluation of wreckfish (*Polyprion americanus*) growth in Galicia (Spain) Aquaculture Europe 2017 (EAS), 17-20 October, Dubrovnik, Croacia.
- Rodriguez-Villanueva, J.L., Peleteiro, J.B., Perez-Rial, E., Soares, E.C., Álvarez-Blázquez, B., Mariño, C., Linares, F., Mañanós, E., 2011. Growth of wreckfish (*Polyprion americanus*) in Galicia, Spain. Aquaculture Europe 2011 (EAS), 18-21 October, Rhodes, Greece.
- Roncarati, A, Cappuccinelli, R., Stocchi, L., Melotti, P. 2014. Wreckfish, *Polyprion americanus* (Bloch and Schneider, 1801), a promising species for aquaculture: Proximate composition, fatty acid profile and cholesterol content of wild Mediterranean specimens. Journal of Food Composition and Analysis, Vol.36, 1-2 pp.104-110
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The Lipids. in: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, pp. 182-257.



- Sedberry, G.R., Andrade, C.A.P., Carlin, J.L., Chapman, R.W., Luckhurst, B.E., Manooch, C.S. III, Menezes, G., Thomsen, B., Ulrich, G.F., 1999. Wreckfish *Polyprion americanus* in the North Atlantic: fisheries, biology and management of a widely distributed and long-lived fish. American Fisheries Society Symposium. Life in slow lane: ecology and conservation of long lived marine animals, n°23, pp. 27-50.
- Suquet, M., La Pomèlie, Ch., 2002. Le cernier (*Polyprion americanus*): biologie, pêche, marché et potentiel aquacole. Plouzané: IFREMER, cop. 2002. 279 h. (Ressources de la mer). ISBN 2-84433-075-4.
- Symonds, J.E., Walker, S.P., Pether, S., Gublin, Y., McQueen, D., King, A., Irvine, G.W., Setiawan, A.N., Forsythe, J.A., Bruce, M., 2014. Developing yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) and hāpuku (*Polyprion oxygeneios*) for New Zealand aquaculture. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 48, 371-384.
- Wylie, M.J., Setiawan, A.N., Irvine, G.W., Symonds, J.E., Elizur, A., Dos Santos, M., Lokman, P.M., 2018a. Ovarian development of captive F1 wreckfish (hapuku) *Polyprion oxygeneios* under constant and varying temperature regimes - Implications for broodstock management. Gen Comp Endocrinol 257, 86-96.
- Wylie, M.J., Setiawan, A.N., Irvine, G.W., Symonds, J.E., Elizur, A., Lokman, P.M., 2018b. Effects of neuropeptides and sex steroids on the pituitary-gonadal axis of pre-pubertal F1 wreckfish (hapuku) *Polyprion oxygeneios* in vivo: Evidence of inhibitory effects of androgens. Gen Comp Endocrinol 257, 113-121.



Líder de comunicación: Dr. Rocío Robles, CT AQUA, r.robles@ctaqua.es

Coordinador del proyecto: Dr. Constantinos C Mylonas, HCMR, mylonas@hcmr.gr



Cofinanciado por el Séptimo Programa Marco de la Unión Europea



Este proyecto de 5 años (2013-2018) está financiado por el Séptimo Programa Marco de la Unión Europea para la investigación, el desarrollo tecnológico y la demostración (KBBE-2013-07 single stage, GA 603121, DIVERSIFY). El consorcio se compone de 38 socios de 12 países europeos –incluyendo nueve pymes, 2 grandes empresas, 5 asociaciones profesionales y una ONG de consumidores- y está coordinado por el Centro Helénico de Investigación Marina, Grecia. Más información en la página web del proyecto “www.diversifyfish.eu”.